



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Departamento de Ingeniería Química

Obtención y caracterización de compuestos y fracciones bioactivas a partir de alperujo tratado térmicamente. Estudio de un poderoso antioxidante natural (3,4-dihidroxifenilglicol, DHFG): propiedades y purificación industrial.

Memoria que presenta
D. Antonio Lama Muñoz
para optar al Grado de Doctor

Fdo.: Antonio Lama Muñoz

Sevilla, Febrero de 2011

D. Juan Fernández-Bolaños Guzmán y **D. Guillermo Rodríguez Gutiérrez**, directores de la tesis y **Dña. Paloma Álvarez Mateos**, tutora, autorizamos la presentación de la Tesis Doctoral “Obtención y caracterización de compuestos y fracciones bioactivas a partir de alperujo tratado térmicamente. Estudio de un poderoso antioxidante natural (3,4-dihidroxifenilglicol, DHFG): propiedades y purificación industrial”, realizada por **D. Antonio Lama Muñoz**.

V. ° B. ° Los directores

Fdo.: Dr. Juan Fernández-Bolaños Guzmán

Fdo.: Dr. Guillermo Rodríguez Gutiérrez

V. ° B. ° La tutora

Fdo.: Dra. Paloma Álvarez Mateos

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Grupo de Pared Celular y Componentes Bioactivos de Alimentos del Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa de Sevilla, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.), dentro del Programa Interdepartamental ‘Estudios Avanzados en Alimentos’, del que es responsable académico el Departamento de Ingeniería Química, el cual, de conformidad con el procedimiento aprobado por su Consejo, ha autorizado su presentación en el día de la fecha.

V. ° B. ° El Coordinador del Programa

V. ° B. ° El director del Departamento

Fdo.: Dr. Fernando Romero Guzmán

Fdo.: Dr. Felipe Cordobés Carmona

Sevilla, a 1 de Febrero de 2011

Índice

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	5
2.1.- La problemática del alperujo.....	5
2.2.- Usos alternativos del alperujo.....	9
2.3.- Fraccionamiento del alperujo para su aprovechamiento integral.....	12
2.3.1.- Pretratamiento térmico con vapor y descompresión explosiva (steam explosion).....	13
2.3.2.- Recuperación de compuestos de alto valor añadido.....	15
2.4.- Compuestos fenólicos presentes en la aceituna.....	18
2.4.1.- Recuperación de compuestos fenólicos.....	20
2.4.2.- 3,4-Dihidroxifenilglicol (DHFG).....	23
2.4.3.- Propiedades de los compuestos fenólicos: hidroxitirosoles y acteosidos.....	26
2.5.- Producción de aceite de orujo de oliva.....	28
2.5.1.- Inconvenientes de la extracción de aceite de orujo.....	28
2.5.2.- Componentes menores del aceite de orujo de oliva y sus propiedades saludables.....	29
2.6.- Composición y estructura de la pared celular vegetal.....	35
2.6.1.- Composición de los polisacáridos de la aceituna.....	40
2.6.2.- Propiedades fisiológicas de los oligosacáridos.....	41
2.6.3.- Producción de oligosacáridos con actividad prebiótica.....	42
2.7.- Compuestos volátiles de la aceituna y el aceite de oliva.....	45
3.- OBJETIVOS.....	50
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
4.1.- Materias primas.....	52
4.1.1.- Alperujo.....	52
4.1.2.- Aceitunas de mesa.....	53
4.2.- Reactivos y disolventes.....	55
4.3.- Uso de un nuevo reactor para el tratamiento integral del alperujo.....	57
4.4.- Tratamientos térmicos para el análisis y máxima recuperación de DHFG e hidroxitirosoles.....	62
4.4.1.- Tratamientos térmicos a bajas temperaturas (cuantificación de DHFG). Comparación con métodos habitualmente usados para la extracción de compuestos fenólicos.....	62
4.4.2.- Tratamientos térmicos de explosión con vapor o “steam explosion” (cuantificación de hidroxitirosoles).....	62
4.5.- Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC.....	64
4.5.1.- Identificación del DHFG purificado.....	64
4.6.- Determinación de los componentes menores de los aceites de orujo.....	66
4.6.1.- Determinación del contenido de aceite de los alperujos tratados térmicamente.....	66
4.6.2.- Preparación del insaponificable y determinación de alcoholes alifáticos, esteroides y dialcoholes triterpénicos.....	66

4.6.3.- Determinación de ácidos triterpénicos.....	67
4.6.4.- Determinación de tocoferoles.	67
4.6.5.- Determinación de ceras y escualeno.....	67
4.6.6.- Determinación de compuestos polares.....	68
4.6.7.- Determinación del grado de acidez e índice de peróxidos.....	68
4.7.- Obtención de oligosacáridos de bajo grado de polimerización.	70
4.7.1.- Hidrólisis química y enzimática del liofilizado de la fase acuosa.....	70
4.7.2.- Procedimientos de aislamiento y purificación de oligosacáridos.....	71
4.7.3.- Determinaciones colorimétricas de azúcares neutros y ácidos urónicos.	74
4.7.4.- Procedimiento de derivatización y determinación de azúcares y ácidos urónicos mediante HPLC.	74
4.7.5.- Determinación de la composición de los oligosacáridos neutros mediante cromatografía de gases.....	75
4.7.6.- Caracterización de los oligosacáridos de bajo grado de polimerización.	76
4.7.6.1.- Determinación del grado de polimerización de los oligosacáridos mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia (HPAEC-PAD).	76
4.7.6.2.- Caracterización estructural de oligosacáridos neutros mediante ESI-MS.....	76
4.7.6.3.- Caracterización estructural de oligosacáridos pécticos mediante HPLC-ESI-MS/MS.	77
4.8.- Análisis de compuestos volátiles.	78
4.8.1.- Extracción líquido-líquido y microextracción en fase sólida (MEFS).....	78
4.8.2.- Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS).	80
4.9.- Propiedades del DHFG purificado.	81
4.9.1.- Medida de la capacidad antioxidante del DHFG en matrices lipídicas.....	81
4.9.2.- Medida de la agregación plaquetaria.	83
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	85
5.1.- Nuevo reactor de tratamiento térmico con vapor.....	85
5.1.1.- Pruebas preliminares sobre el alperujo.	86
5.1.2.- Estudio de las condiciones de operación sobre el alperujo.....	93
5.1.3.- Consideraciones finales sobre la puesta en marcha del nuevo reactor de tratamiento térmico.....	104
5.1.4.- Tratamientos térmicos (50-120 °C) para obtener la máxima recuperación de DHFG.	110
5.2.- Estudio y purificación del antioxidante 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG).	114
5.2.1.- Cuantificación de DHFG en aceitunas de mesa naturales.	114
5.2.2.- Comparación con otros métodos de extracción de compuestos fenólicos.....	119
5.2.3.- Estudio de estabilidad del DHFG en alpechines industriales.	123
5.2.3.1.- Estudio del origen del DHFG.	125
5.2.4.- Sistema de purificación del DHFG.....	128

5.2.4.1.- Ensayos previos de purificación de DHFG.	129
5.2.4.2.- Ensayos con resinas de intercambio iónico.....	130
5.2.4.3.- Ensayos de purificación de DHFG a nivel de laboratorio a partir de la fase acuosa obtenida del tratamiento térmico del alperujo.	134
5.2.4.4.- Selección de un sistema de purificación: análisis de los resultados obtenidos.....	144
5.2.4.5.- Experiencia de purificación de DHFG a escala de planta piloto.....	144
5.2.4.6.- Estabilidad del producto final.	149
5.2.4.7.- Regeneración de la resina Dowex MWA-1.....	151
5.2.5.- Identificación del DHFG purificado.	154
5.2.6.- Medida de la capacidad antioxidante del DHFG en matrices lipídicas.....	157
5.2.7.- Inhibición de la oxidación lipídica (primaria y secundaria) de una emulsión de ácido linoleico.....	158
5.2.8.- Inhibición de la agregación plaquetaria.	161
5.3.- Caracterización de las fracciones volátiles de los destilados de alperujo.	163
5.4.- Estudio de los aceites de orujo de oliva crudos extraídos de alperujos tratados térmicamente.....	168
5.4.1. Evolución del contenido en componentes menores.	168
5.4.2.- Ventajas del tratamiento térmico sobre el nuevo aceite de orujo.....	180
5.5.- Obtención y purificación de oligosacáridos a partir del tratamiento térmico del alperujo..	182
5.5.1.- Obtención de oligosacáridos neutros y pécticos.	182
5.5.2.- Aislamiento y purificación de los oligosacáridos pécticos.	200
5.5.3.- Caracterización estructural de los oligosacáridos pécticos mediante HPLC-ESI-MS/MS.....	203
5.5.4.- Aislamiento y purificación de los oligosacáridos neutros.....	207
5.5.5.- Caracterización estructural de los oligosacáridos neutros mediante ESI-MS.	223
6.- CONCLUSIONES.	248
AGRADECIMIENTOS	249
7.- BIBLIOGRAFÍA.	250

1.- INTRODUCCIÓN.

El cultivo del olivo se remonta a los tiempos de la prehistoria, cuando comenzó en las etapas paleolítica y neolítica, en Oriente Próximo y Asia Menor. Esta antigüedad junto con su facilidad de propagación es causa de la amplia difusión de la especie. A partir de aquí y por medio de los flujos comerciales y militares de la historia se fue extendiendo alrededor del Mediterráneo y, posteriormente al resto del mundo con clima similar ([García Berenguer, 1995](#)). La extensión de la cultura del olivo en la cuenca mediterránea se confunde con la historia de sus civilizaciones y ha estado estrechamente relacionada con las necesidades religiosas, socioculturales, medicinales y nutricionales del hombre. Hoy en día se mantiene como una parte esencial de las prácticas agrícolas en la región mediterránea. La producción de aceite de oliva es, por lo tanto, una de las industrias agrícolas más tradicionales, y todavía es de principal importancia para la economía de la mayoría de sus países ([Vlyssides y col., 2004](#)).

Las numerosas propiedades beneficiosas para la salud que aportan la aceituna y el aceite de oliva no son un descubrimiento reciente; el aceite de oliva ha sido durante siglos usado no solo como un aceite comestible, sino también para muchos otros fines. Los antiguos egipcios, griegos y romanos fueron los primeros en usar el aceite de oliva para propósitos no comestibles. El aceite de oliva se usaba para tratar casos de intoxicación, dolores de cabeza, problemas estomacales, picaduras de insectos o para la desinfección de cualquier parte del cuerpo y cuidado de la piel ([Zeev Wiesman, 2009a](#)). Las investigaciones actuales y las extensas pruebas científicas corroboran estos usos y muestran ahora que la dieta mediterránea, en la que la aceituna y el aceite de oliva representan importantes componentes, previene la aparición y desarrollo de enfermedades coronarias, desórdenes metabólicos y varios tipos de cáncer. Los efectos beneficiosos bien conocidos de la ingesta de aceite de oliva han sido atribuidos no sólo a su composición en ácidos grasos monoinsaturados (mayoritariamente ácido oleico) sino también a las propiedades antioxidantes de sus componentes minoritarios, entre ellos y fundamentalmente los compuestos fenólicos ([Pérez-Jiménez y col., 2007](#)). Tras el proceso de extracción del aceite de oliva sólo una muy baja cantidad de compuestos fenólicos pasa al aceite, mientras que la mayor parte de los componentes minoritarios (aproximadamente el 98-99 %) permanecen en el subproducto ([Vierhuis y col., 2001a](#)).

Los estudios realizados han demostrado que la aceituna y el aceite de oliva contienen un gran número de compuestos como tocoferoles, escualeno, alcoholes grasos, esteroides, ácidos y dialcoholes triterpénicos (maslínico, oleanólico, eritrodíol y uvaol), compuestos fenólicos (hidroxitirosol, tirosol, ácido cafeico, ácido vainílico, verbascósido, oleuropeína, rutina, luteolin-7-glucósido, ligustrósido, pinosinol, etc.) y compuestos volátiles. Todos estos compuestos contribuyen a su carácter saludable, convirtiéndolo en un componente altamente deseable en muchos productos además de sus convencionales fines comestibles. En estudios experimentales,

estos componentes menores de la fracción insaponificable han mostrado importantes propiedades biológicas. Tales compuestos están siendo ampliamente estudiados por sus actividades antioxidantes, antiagregantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antivirales, anticancerosas, cardioprotectoras y antihipertensivas ([Benavente-García y col., 2000](#); [Manach y col., 2005](#); [Middleton y col., 2000](#)). A pesar de la importancia dada a estos compuestos por sus propiedades, los subproductos generados en la extracción del aceite de oliva se tratan como residuos contaminantes, cuando en realidad constituyen importantes fuentes de compuestos de alto valor añadido que pueden ser convertidos en compuestos farmacológicamente activos. Algunos de los antioxidantes comerciales más importantes encontrados en aceituna y aceite de oliva son el hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína. Otros importantes compuestos orgánicos que pueden ser selectivamente recuperados son los lípidos, los carbohidratos hidrosolubles y las proteínas.

Aunque la producción de aceite de oliva tiene una gran tradición, inevitablemente el transcurso del tiempo y el surgimiento de nuevas tecnologías han supuesto un mayor grado de automatización y mejoras en su obtención, pero no en el tratamiento y eliminación de los residuos. Actualmente, la extracción de aceite se hace esencialmente por el sistema de centrifugación, bien sea en tres o dos fases (el sistema de extracción por presión está desapareciendo). El sistema de tres fases genera dos residuos, el alpechín (fase acuosa) y el orujo (fase sólida), mientras que el sistema de dos fases sólo uno, el alperujo (mezcla de alpechín y orujo), que merece especial atención. La industria de la producción del aceite de oliva genera enormes cantidades de este residuo que puede tener un gran impacto medioambiental a causa de su alta fitotoxicidad. Como fuente contaminante, los subproductos de la extracción del aceite de oliva (orujo y alpechín) han existido durante miles de años, pero sus efectos sobre el medio ambiente son en este momento más evidentes a causa de las siguientes razones: la producción ha aumentado notablemente durante los últimos años y la sensibilidad de la población a los problemas medioambientales es mucho mayor ahora que en el pasado ([Rozzi y Malpei, 1996](#)). La eliminación de estos materiales representa un problema que se ha agravado por las restricciones legales de su vertido. Por lo tanto, se ha convertido en imperativo resolver este problema mediante el desarrollo de sistemas para el tratamiento de los subproductos del aceite de oliva.

Las peculiares propiedades fisicoquímicas del nuevo subproducto (alperujo) causan problemas específicos de gestión en las almazaras que han llevado a la adaptación y transformación de las estrategias tradicionales de valorización. Aunque algunos métodos de tratamiento están fuertemente consolidados en este sector, como la combustión, otras opciones, más respetuosas con el medioambiente, deberían también ser consideradas. Sin embargo, la investigación ha tenido por el momento poco éxito en encontrar una solución medioambiental y económicamente viable de adopción general. Los usos potenciales de los subproductos del aceite de oliva están relacionados con la salud (cosméticos, farmacéuticos, aditivos alimentarios, etc.), biofertilizantes y/o compost, alimentación animal y con la producción de energía alternativa

(biodiesel, gasificación, producción de metano, etc.) ([Zeev Wiesman, 2009b](#)). En este contexto, las tecnologías de tratamiento de residuos centradas en la recuperación de compuestos bioactivos representan una interesante alternativa. De hecho, los residuos sólidos de dos y tres fases de la extracción del aceite de oliva (alperujo, orujo y alpechín) están adquiriendo una importancia creciente en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética debido a su rico contenido en biofenoles (polifenoles, flavonoides, lignanos, etc.), pero todavía hay una falta de información acerca de sus propiedades biológicas *in vivo* y de su recuperación cuantitativa a partir de estos subproductos. Puesto que estos compuestos proceden de una fuente natural y tienen efectos beneficiosos como antioxidantes, podrían ser valiosos como aditivos en alimentos así como ingredientes en algunos productos cosméticos y farmacéuticos, dado que las especies de oxígeno reactivo están implicadas en la aparición de varias enfermedades humanas y en la degradación oxidativa de alimentos. Los extractos ricos en compuestos fenólicos de estos subproductos han mostrado una actividad antioxidante comparable e incluso superior a la de los antioxidantes sintéticos. Bien es sabido que hay un interés creciente por la incorporación a los alimentos de antioxidantes naturales, los cuales son generalmente considerados más seguros, más saludables, y sujetos a menos riesgos que los alimentos que contienen aditivos sintéticos.

Los aspectos prácticos de la extracción y producción de suficientes cantidades de antioxidantes naturales a partir de estas fuentes aún no se han resuelto (con excepciones como la del hidroxitirosol). Por lo tanto, avanzar en el estudio de la recuperación y purificación de dichos compuestos a partir de estos subproductos sería de gran interés ya que no están disponibles comercialmente en grandes cantidades. La falta de disponibilidad de los mismos supone una barrera para la investigación en el campo de la nutrición y la farmacología. En consecuencia, disponer de cantidades suficientes permitirá el estudio de su biodisponibilidad, estabilidad, interacción con otros componentes y toxicología, así como de sus posibles propiedades bioactivas. También sería posible ensayar en estudios *in vivo* su influencia sobre determinadas enfermedades, habida cuenta de los emergentes y prometedores estudios sobre los compuestos antioxidantes como terapéuticos en enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer y el Parkinson ([Ramassamy, 2006](#)). Asimismo, podrían ser sustancias de partida para la síntesis de otros compuestos bioactivos que los hagan más solubles en matrices lipofílicas (satisfaciendo las demandas de la industria) o que potencien su actividad. Por ejemplo, los alquil ésteres y éteres de hidroxitirosilo son compuestos lipofílicos preparados por síntesis química a partir de hidroxitirosol que muestran efecto protector contra la oxidación causada por radicales peroxilos en sistemas modelo *ex vivo* ([Trujillo y col., 2006](#); [Pereira-Caro y col., 2009](#)).

La dificultad fundamental para la recuperación de compuestos a partir de alperujo, radica en la complejidad de la estructura de la matriz de la pared celular y en las interacciones entre multicomponentes. Entre los varios procesos propuestos para el tratamiento y valorización del alperujo como sustrato de bajo coste para la producción de compuestos valiosos, recientemente,

se ha desarrollado una nueva tecnología alternativa para la mejora de sus métodos de extracción. La tecnología se basa en un tratamiento térmico con vapor a alta presión y temperatura, probado a escala planta piloto y técnicamente aplicable en un proceso industrial, que consigue la separación de los principales componentes del alperujo (celulosa, hemicelulosa, sustancias pécticas y lignina) y de una fracción acuosa en la que se solubilizan compuestos de interés (fenoles antioxidantes y polisacáridos). Durante el tratamiento las hemicelulosas son hidrolizadas y se hacen solubles en agua, la celulosa se despolimeriza un poco lo que facilita su hidrólisis enzimática y la lignina se degrada y despolimeriza. Se produce la solubilización de carbohidratos fermentables y mejora la digestibilidad *in vitro* del alperujo para su uso en alimentación animal. Se solubilizan también compuestos bioactivos facilitando su recuperación y aislamiento ([Rodríguez y col., 2007a](#)). Por ejemplo, permite la recuperación de productos de alto valor añadido tales como hidroxitirosol (uno de los más abundantes y muy interesante desde el punto de vista funcional, que ha sido estudiado ampliamente demostrando sus propiedades antioxidantes y saludables así como su buena biodisponibilidad), manitol, polisacáridos hemicelulósicos tipo xilanos y oligosacáridos con propiedades funcionales ([Fernández-Bolaños y col., 2002a](#); [Fernández-Bolaños y col., 2004](#)). Además, el tratamiento térmico produce la reducción de la fase sólida remanente con un alto contenido de aceite enriquecido en componentes menores.

Este sistema permitirá recuperar y concentrar otra serie de sustancias fenólicas, como el 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG), avanzando en el aprovechamiento integral del alperujo. El tratamiento térmico facilita la separación del alperujo en dos fases, sólida y líquida, y la liberación y solubilización del DHFG en esta última. Muy recientemente se ha demostrado que este compuesto tiene *in vitro* una actividad antirradical libre y un poder reductor mayor que el principal fenol en forma libre presente en la aceituna, el hidroxitirosol. Además, muestra una actividad similar a la vitamina E en la inhibición de la oxidación lipídica ([Rodríguez y col., 2007b](#)). Estos antioxidantes contribuyen no sólo a la estabilidad oxidativa de los alimentos grasos durante su procesado y almacenamiento, sino también al estatus oxidativo del propio consumidor, por lo que el DHFG puede tener un importante papel desde el punto de vista nutricional y tecnológico. En la búsqueda de compuestos naturales extraídos del alperujo, este fenol proveniente de la aceituna podría ser usado por sus posibles propiedades bioactivas. Así pues, el estudio de las mismas podría ser de importancia en el campo de la nutrición y la farmacología.

2.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

2.1.- La problemática del alperujo.

La industria del aceite de oliva representa uno de los sectores más importantes a nivel productivo en nuestro país. España es el mayor productor mundial de aceite de oliva, aportando un 39 % de la producción total (www.internationaloliveoil.org). La tecnología para la extracción del aceite de oliva en España ha progresado significativamente desde principios de los años setenta, cuando apareció el sistema de centrifugación de tres fases. La producción de aceite de oliva mediante este sistema genera dos subproductos; el primero, un residuo líquido o “alpechín” altamente contaminante, es una mezcla del agua de vegetación de las aceitunas más el agua añadida en los diferentes pasos del proceso de extracción. El segundo subproducto, un residuo sólido u “orujo” (tiene una humedad aproximada del 45 %), es una combinación de piel, pulpa, hueso y un resto graso. El uso de un nuevo y moderno sistema de procesamiento de dos fases, desarrollado durante la década de los años noventa ([Alba y col., 1996](#)), ha reducido enormemente el volumen de alpechín, y con ello su carga contaminante (sólidos en suspensión, alta concentración de compuestos orgánicos y sales minerales), pero genera un nuevo subproducto semisólido muy húmedo (el contenido de agua oscila entre 65-70 %) que es una mezcla del residuo líquido (alpechín) y sólido (orujo), denominado “alperujo”, que no resuelve los problemas de contaminación y plantea otros nuevos. En la [Figura 1](#) se muestran los esquemas de los dos procesos básicos de producción.

Figura 1. Sistemas de centrifugación de dos (izquierda) y tres fases (derecha) para la elaboración del aceite de oliva virgen (Adaptado de [Alba, 2008a](#)).

Debido a la rápida y generalizada implantación del sistema de centrifugación de dos fases, la producción anual de alperujo en España oscila entre los 3,5 y 6 millones de toneladas por campaña ([Aragón y Palancar, 2001](#)), de las cuales el 90 % se obtienen sólo en Andalucía. La gestión y eliminación de los enormes volúmenes generados de estos subproductos de la producción del aceite de oliva representa un antiguo problema de polución medioambiental que permanece todavía sin resolver. El almacenamiento en balsas aprovechaba la evaporación natural para concentrar el residuo pero con el tiempo se mostró como una técnica inadecuada ya que contaminaba las aguas subterráneas y producía malos olores por la descomposición de la materia orgánica. El nuevo sistema de centrifugación de dos fases ha supuesto una buena solución para las almazaras frente a los vertidos que ocasionaba el alpechín y que eran causa de serios problemas ambientales debido a su alta demanda química de oxígeno y sus efectos antimicrobianos y fitotóxicos ([Pérez y col., 1992](#)). Pero el alperujo no parece ser más adecuado desde el punto de vista medioambiental; no sólo tiene más humedad (65-70 %) que el orujo de tres fases (alrededor del 45 %) sino una mayor carga contaminante, debido a su alto contenido de sustancias orgánicas, que incluyen azúcares, taninos, polifenoles, polialcoholes, pectinas, lípidos, proteínas ([Lesage-Meessen y col., 2001](#)) y cantidades significativas de N y K ([Cegarra y col., 2000](#)). Por lo tanto, el destino más común del alperujo es ser almacenado en balsas ([Figura 2](#)) a causa de la prohibición de su vertido.



Figura 2. Almacenamiento de alperujo en balsas de una planta de cogeneración.

El nuevo sistema de dos fases no produce prácticamente fase acuosa o alpechín y soluciona el problema planteado por el mismo, pero el alperujo presenta otros inconvenientes: dificultad de manejo por su alto contenido de humedad y consistencia; mayor coste de secado en las orujeras, donde se extrae el aceite de orujo, dificultades en el funcionamiento de los secaderos y disminución del rendimiento de obtención de aceite. En concreto, los problemas de gestión y aprovechamiento del alperujo están relacionados con la producción de grandes cantidades en un

corto periodo estacional (para la misma cantidad de aceituna supone un aumento del 60 % respecto al orujo de tres fases), la variabilidad de su composición y su alto contenido en determinados compuestos. El considerable número de variedades de aceituna y, en consecuencia, la extrema variabilidad de la composición del alperujo es uno de los motivos que limitan posibles usos como la alimentación animal ([Alcaide y col., 2003](#)). Por otro lado, la presencia de compuestos fenólicos de carácter fitotóxico hace difícil la implementación de métodos de tratamiento biológico convencionales (aeróbicos y anaeróbicos). El problema se ha trasladado a las industrias orujeras, encargadas del tratamiento del nuevo residuo y que han tenido que adaptarse a su recepción y difícil manejo. El alperujo es a menudo tratado en una segunda centrifugación para extraer el aceite residual (o de repaso). Las orujeras reciben alperujo con un contenido graso medio en torno al 2,5 %. Pero gran parte es repasado en las almazaras de origen, por lo que en muchos casos llegan partidas con un contenido inferior al 1 % de aceite. La eficiencia de las almazaras en la extracción del aceite está haciendo que el contenido graso medio esté disminuyendo cada vez más con cada campaña. Esto pone de manifiesto la inviabilidad económica de la extracción con un sólido tan húmedo y agotado. El subproducto resultante de esta segunda extracción se seca, y luego es extractado con hexano para producir una cantidad extra de aceite (aceite de orujo). Finalmente, tras la extracción del aceite aprovechable, el resultante (“orujillo”) se destina, como biocombustible, a la cogeneración de energía eléctrica ([Bas y col., 2002](#)) (*Figura 3*). Actualmente, el kW/h producido por este método está subvencionado por las autoridades públicas mediante el [Real Decreto 436/2004](#) por el que se establecen las primas a la producción de energía eléctrica en régimen especial (cogeneración y renovables). De este modo, las orujeras están haciendo frente al nuevo residuo.



Figura 3. *Planta de cogeneración para el secado del alperujo y producción de energía eléctrica con la biomasa residual en Ponte Genil (Córdoba).*

El alto nivel de humedad del alperujo aunque facilita la extracción del aceite residual por centrifugación dificulta la operación básica de secado, pues los azúcares de la aceituna, la mayoría de los cuales pasaban al alpechín, quedan ahora en el alperujo y se caramelizan con las altas temperaturas de operación de los secaderos, recubriéndose las partículas sólidas del alperujo de dicho caramelo, que dificulta la penetración del disolvente utilizado en la extracción del aceite (menor rendimiento del proceso) ([Antolín y col., 1997](#)). La detección de hidrocarburos aromáticos policíclicos, consecuencia de las condiciones más drásticas en que hay que realizar el secado, ha obligado a las orujeras a un paso de refinación posterior, lo que incrementa los costes de producción. Los problemas mencionados (el bajo contenido residual de aceite, la aparición de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, el aumento en el costo del proceso de secado, etc.) obligan en algunos casos a prescindir de la extracción del aceite residual, bien del total o de parte del alperujo que se procesa, y destinarlo directamente a su uso como biocombustible ([Celma y col., 2002](#)). Por lo tanto, el alperujo generado por el nuevo sistema de dos fases, supone (como suponía el alpechín y el orujo) una carga económica para la industria del aceite de oliva (además de su bajo contenido graso, plantea serios problemas de manejo y mayor coste de secado por su alta humedad) y está considerado un subproducto con un impacto negativo sobre el medioambiente debido a su alto contenido de sustancias orgánicas. Se hace necesario pues el estudio de usos alternativos para este subproducto semisólido.

2.2.- Usos alternativos del alperujo.

Actualmente se han intentado diferentes métodos para hacer un mejor uso del alperujo, alternativos a la generación de energía eléctrica. Los esfuerzos para disminuir el impacto medioambiental del alperujo incluyen tratamientos físico-químicos y biológicos. Varios métodos han sido propuestos para su eliminación. Sin embargo, muchos coinciden en la presencia de sustancias inhibitorias que pueden reducir el rendimiento de los procesos en estudio y que deben ser tenidas en cuenta para minimizar el potencial efecto negativo. Los componentes fitotóxicos que contiene el alperujo capaces de inmovilizar el N disponible ([Saviozzi y col., 1991](#)) e inhibir el crecimiento microbiano ([Ramos-Cormenzana y col., 1996](#)) y la germinación y crecimiento vegetativo en plantas han llevado a obtener sólo éxitos limitados. Las propiedades fitotóxicas que dificultan la aplicación de procesos biotecnológicos para el aprovechamiento del alperujo son principalmente atribuidas a los compuestos fenólicos (particularmente los fenoles simples) presentes en el mismo ([Linares y col., 2003](#)). Hasta ahora los esfuerzos para disminuir el impacto medioambiental del alperujo han estado centrados en su detoxificación, ya que no es fácilmente degradable por procesos naturales, pues la presencia de fenoles le confiere una elevada capacidad antimicrobiana que inhibe el desarrollo de la flora responsable de los procesos biológicos de depuración ([Antolín y col., 1997](#)).

Biofertilizantes y/o compost

Algunos autores han tratado la detoxificación de este subproducto, y adecuarlo al uso agrícola, mediante su biotratamiento con microorganismos; así, tras 20 semanas de incubación con hongos saprofitos se consigue la eliminación de los fenoles simples del alperujo ([Sampedro y col., 2008](#)). Por lo tanto, se considera más recomendable su aplicación directa a suelos agrícolas después de un proceso de compostado ([Madejón y col., 1998](#)). El compostado del alperujo es una opción muy prometedora, dado sus bajos costes técnicos y económicos, para preparar fertilizante orgánico (por su alto contenido en C y nutrientes minerales) ([Alburquerque y col., 2007](#)). Las sustancias potencialmente fitotóxicas en el alperujo son biológicamente degradadas durante el proceso, permitiendo el uso seguro del compost elaborado en campos agrícolas. Tras 12-20 semanas de compostado desaparecen el 93 % de los fenoles totales, y como indicador de la efectividad del proceso se observa un aumento de la concentración de nutrientes y ácidos húmicos ([Baddi y col., 2009](#)). El inconveniente de este proceso de compostado es el tiempo tan largo necesario para que se complete, lo que implica la acumulación de grandes volúmenes y el riesgo de infiltraciones a las aguas subterráneas. Además, tiene la limitación de no ser capaz de eliminar completamente la biotoxicidad de algunos componentes, que interfieren con los procesos oxidativos aeróbicos de la producción de compost.

Alimentación animal

Se ha ensayado su uso como sustrato en alimentación animal. Un grupo de la unidad de Nutrición Animal de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) ha desarrollado una fórmula para pienso concentrado de rumiantes a partir de alperujo. Su eficacia ha sido probada de forma experimental en ganado caprino y ovino ([Yáñez-Ruiz y Molina-Alcaide, 2007](#)). Se ha probado la incorporación de un 10 % de alperujo seco a pienso para corderos en base de cebada, maíz y soja, sin observarse anomalías patológicas en el cebo de estos animales tras su ingesta ([López Gallego, 2003](#)). Sin embargo, los datos existentes sobre la tecnología de tres fases indican que el orujo de oliva es poco digestible, especialmente en lo relativo a las proteínas. Además, el orujo contiene compuestos fenólicos, como los taninos, que pueden resultar adversos si se emplean en la alimentación animal ya que limitan la disponibilidad de nitrógeno ([Mangan, 1988](#)).

Energía alternativa

También se están llevando a cabo estudios sobre la digestión anaeróbica del alperujo con microorganismos bajo condiciones mesófilas mediante el uso de reactores mezcla completa, obteniéndose un alto rendimiento en la degradación de la materia orgánica y en la producción de metano ([Rincón y col., 2010](#)). El metano puede ser usado como combustible en la producción de electricidad. El alperujo degradado es apto para su uso como sustrato agrícola. El alperujo es rico en carbohidratos, y por esta razón ha sido empleado también como un sustrato ideal de bajo coste para la producción de energía en forma de etanol ([Ballesteros y col., 2002](#)). El problema reside en la lenta bioquímica del proceso anaeróbico, que requiere algunos meses para iniciarse, asociado al hecho de que el alperujo solo está disponible durante 3-6 meses al año, no lo hace adecuado para el tratamiento de estos residuos estacionales ([Niaounakis y Halvadakis, 2006](#)).

Obtención de compuestos de alto valor añadido y conversión en productos útiles

Las grandes cantidades de alperujo que producen las industrias del aceite de oliva, pueden ser usadas para la recuperación de compuestos o sustancias valiosas y la conversión en productos útiles mediante el desarrollo de nuevos procesos. Esto sería de gran relevancia no sólo desde el punto de vista medioambiental y económico, sino también para diferentes sectores de la industria (alimentaria, cosmética y farmacéutica) en los que dichos compuestos podrían tener aplicación. Debido a su alto contenido, el alperujo es un prometedor sustrato para la producción de diferentes productos orgánicos, siendo quizás los compuestos antioxidantes (polifenoles, flavonoides, etc.) de los más importantes. Los polifenoles presentes en el alperujo han mostrado tener actividad antioxidante, antibiótica, antimicrobiana y antifúngica. Algunos antioxidantes comerciales encontrados en el alperujo son tirosol, hidroxitirosol y oleuropeína, los cuales pueden ser usados como aditivos alimentarios o cosméticos. Por ejemplo, el hidroxitirosol es usado en



farmacología y cosmética a causa de su acción antiinflamatoria y antienvjecimiento ([Evagelia y col., 2006](#)).

Por lo tanto, avanzar en el estudio del aprovechamiento integral a partir de este subproducto mediante la recuperación, aislamiento y purificación de compuestos o productos de alto valor añadido (como antioxidantes altamente purificados), los cuales podrían ser convertidos en compuestos farmacológicamente activos, es una alternativa económicamente atractiva que sería de gran ayuda para el sector del aceite de oliva. Es necesario poner a punto procesos industriales técnicamente viables y económicamente rentables que permitan abordar el tratamiento del alperujo y la valorización de sus diversos componentes, para dar salida a la creciente cantidad de este subproducto.

2.3.- Fraccionamiento del alperujo para su aprovechamiento integral.

La utilización del alperujo mediante el aprovechamiento de sus principales componentes (celulosa, hemicelulosa y compuestos polifenólicos) requiere de un paso de pretratamiento para romper las diversas barreras físicas y químicas de su complejo entramado estructural y aumentar así la accesibilidad a estos componentes, posibilitar la separación de las fases (líquida y sólida) y la solubilización de compuestos de interés, como son los compuestos fenólicos y oligosacáridos, para su posterior recuperación. Tratamientos a tener en cuenta deben ser los aplicados a los materiales lignocelulósicos. Los materiales lignocelulósicos son los principales constituyentes de los vegetales y sus residuos, es decir, los constituyentes de las paredes celulares, compuestos por polímeros como la celulosa, hemicelulosa, lignina, pectinas y almidón. Los materiales lignocelulósicos son fuentes renovables que pueden ser directa o indirectamente usadas para la producción de productos químicos bioactivos. Sin embargo, algunas de estas aplicaciones están limitadas por la íntima asociación e interacción que existe entre los tres principales componentes de la pared celular vegetal (celulosa, hemicelulosa y lignina). Los materiales lignocelulósicos pueden ser fraccionados en sus principales componentes mediante tratamientos biológicos, físicos, químicos y fisicoquímicos. Aunque el alperujo no es un material puramente lignocelulósico, es de gran interés el estudio de estos tratamientos para su aprovechamiento, maximizando los beneficios de un subproducto renovable y complejo de importancia creciente. Una gran variedad de métodos han sido evaluados por su eficacia técnica y económica en el pretratamiento de residuos lignocelulósicos ([Hendriks y Zeeman, 2009](#)):

- Los pretratamientos biológicos dan como resultado la degradación parcial de la lignina de los materiales lignocelulósicos usando microorganismos tales como hongos y bacterias ([Ghosh y Singh, 1993](#)). Se han descrito reducciones de hasta el 65 % en el contenido de lignina en paja de algodón ([Eriksson y col., 1980](#)). Sin embargo, la biodegradación de la lignina es un proceso muy lento que solo puede ser considerado económicamente viable si es aplicado en combinación con otros métodos físicos y/o químicos ([Sawada y Nakamura, 2001](#); [Akhtar y col., 1998](#)).
- Los pretratamientos físicos, tales como la molienda ([Rivers y Emert, 1987](#)) y la irradiación con microondas ([Zhu y col., 2006](#)), han sido también utilizados para facilitar la hidrólisis de materiales lignocelulósicos. Sin embargo, la principal desventaja de estos métodos es el alto requerimiento energético. Con la molienda, no aplicable al alperujo, generalmente se pretende una reducción del tamaño de partícula del sustrato (aumenta el área superficial disponible) y una disminución en la cristalinidad y grado de polimerización de la celulosa ([Furcht y Silla, 1990](#)). La exposición de residuos celulósicos a radiación gamma también ha supuesto una disminución sustancial en el grado de polimerización de la celulosa ([Sinitsyn y col., 1991](#)).

- Los pretratamientos químicos tienden a solubilizar la hemicelulosa y la lignina para exponer la celulosa a la hidrólisis ácida y/o enzimática ([Wood y Saddler, 1988](#)). Una amplia variedad de productos químicos han sido propuestos en la bibliografía para tal fin: hidróxido sódico ([Sewalt y col., 1992](#)), dióxido de azufre ([Schwald y col., 1989](#)), peróxido de hidrógeno ([Sun y Cheng, 2002](#)), ácido fosfórico ([Deschamps y col., 1996](#)) y ácido sulfúrico ([Miller y col., 2007](#)), entre otros.

2.3.1.- Pretratamiento térmico con vapor y descompresión explosiva (steam explosion).

El éxito relativo de cada método normalmente depende de su eficacia para transformar el material inicial y mejorar sus propiedades para aplicaciones específicas tales como la extracción de compuestos fenólicos y/o la hidrólisis enzimática de celulosa. Sin embargo, la aplicación a gran escala de alguno de ellos resulta muy costosa. Por ese motivo, muchos investigadores trabajan para reducir los costes de inversión y el consumo de energía, y conseguir tratamientos económicamente competitivos y lo suficientemente efectivos como para hacer viable su utilización. Las mejores opciones de tratamiento son aquellas que combinan elementos de los métodos físicos y químicos. Éste es el caso del tratamiento con vapor ([Garrote y col., 2007](#)). A este respecto, entre los diferentes métodos de pretratamientos existentes, el tratamiento con vapor de agua a alta presión y temperatura, con descompresión rápida (explosiva), es uno de los más importantes y comúnmente usados para el fraccionamiento de los tres principales componentes del material lignocelulósico ([McMillan, 1994](#); [Vlasenko y col., 1997](#)).

En el pretratamiento “steam explosion” (autohidrólisis) la biomasa es tratada con vapor saturado a alta presión seguido por una rápida reducción de la presión, lo cual hace que el material experimente una descompresión explosiva. Los principales factores que afectan al pretratamiento “steam explosion” son el tiempo de residencia y la temperatura ([Duff y Murray, 1996](#)). El pretratamiento “steam explosion” es generalmente llevado a cabo a temperaturas dentro del intervalo de 160-240 °C (correspondientes a presiones comprendidas entre 0,69-4,46 MPa) durante cortos períodos de tiempo, desde varios segundos hasta unos pocos minutos antes de que el material sea expuesto a la presión atmosférica. Los estudios indican que temperaturas más bajas y tiempos de residencia más largos son más favorables ([Wright, 1998](#)). Las condiciones de presión y temperatura provocan la disociación del agua generándose un medio ácido (pH 3-4) por la presencia de los iones hidronio y de los compuestos generados in-situ a partir de los componentes del residuo durante el proceso, como el ácido acético. Aunque el ácido acético liberado a partir de la desacetilación de las hemicelulosas ha sido considerado el principal ácido responsable de la acción catalítica en la autohidrólisis, otros ácidos tales como el ácido fórmico y el levulínico son también producidos y pueden tener un importante papel en la eficacia total del pretratamiento ([Ramos, 2003](#)).

El efecto del pretratamiento “steam explosion” sobre el material es una combinación de modificaciones físicas y químicas debido a la alta presión y temperatura. Las modificaciones físicas (reducción del tamaño de partícula y expansión de los microporos), consecuencia de la rápida despresurización, causan el resquebrajamiento de la estructura lignocelulósica; separación de las fibras de celulosa (desfibración), principalmente de las regiones más débiles (celulosa amorfa) (*Figura 4*). Desde un punto de vista químico, los cambios estructurales que tienen lugar en el tratamiento con vapor y descompresión rápida, también denominado tratamiento “steam explosion” son similares a aquellos que ocurren en el tratamiento con vapor sin descompresión ([Košíková y col., 1995](#)). Generalmente, el resultado del proceso steam explosión es una hidrólisis de los enlaces glicosídicos de las hemicelulosas y, en menor extensión, de la celulosa. También lleva a una ruptura de los enlaces hemicelulosa-lignina y facilita el acceso de los enzimas a las fibras de celulosa. La hidrólisis de la fracción hemicelulósica y la despolimerización de los componentes de la lignina ([Sawada y col., 1995](#)) han sido consideradas como las principales modificaciones químicas. Por lo tanto, la accesibilidad de la celulosa a la degradación enzimática aumenta en gran medida ([Moniruzzaman, 1996](#)).

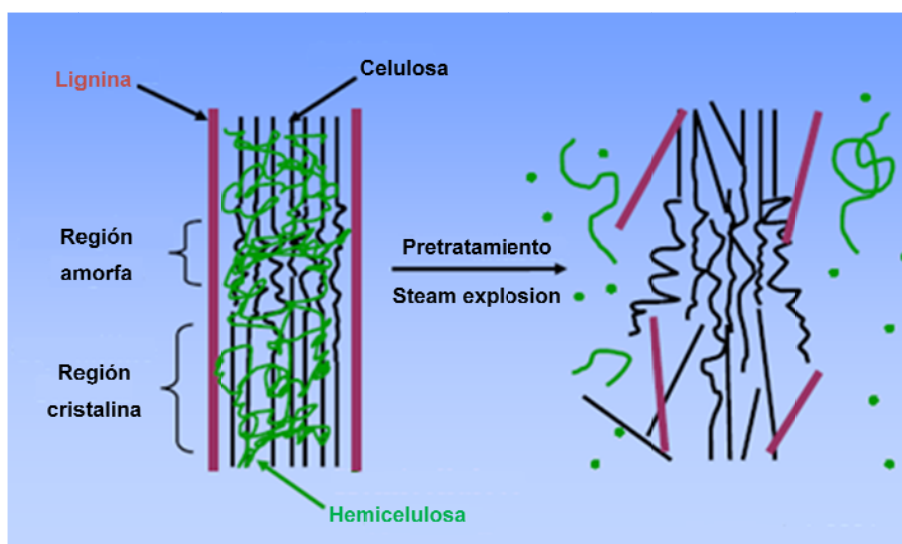


Figura 4. Representación esquemática del efecto del pretratamiento “steam explosion” sobre los materiales lignocelulósicos (Adaptado de [Mosier y col., 2005](#)).

Comparado con los métodos de pretratamiento alternativos (procesos de hidrólisis ácida y oxidativos para la producción de azúcares o la fermentación de etanol), las ventajas del pretratamiento “steam explosion” incluyen el potencial para reducir significativamente el impacto ambiental, los costes económicos y el consumo energético. Además, elimina el uso de cantidades significativas de productos químicos, ácidos y/o bases ([Li y col., 2007](#)) y es posible una recuperación más completa de todos los biopolímeros (celulosa, hemicelulosa, lignina y pectinas) en una forma útil ([Avellar y Glasser, 1998](#)). El pretratamiento puede llevarse a cabo con o sin adición de un catalizador ácido. La adición de catalizador puede eficazmente mejorar una hidrólisis

enzimática posterior, disminuir la producción de compuestos inhibitorios de los microorganismos usados para la fermentación, y conducir a una más completa eliminación de la hemicelulosa. Si no se añade un catalizador ácido, el tratamiento “steam explosion” es un proceso autohidrolítico. Los procesos y productos basados en la autohidrólisis así como en el tratamiento con vapor o “steam explosion” han sido por lo tanto revisados conjuntamente ([Jakobsons y col., 1995](#)).

La ventajosa utilización del sistema “steam explosion” para el aprovechamiento de materiales puramente lignocelulósicos ha sido demostrada sobre otras varias opciones de pretratamiento ([Ramos y Saddler, 1994](#)). Mayores rendimientos de recuperación de los materiales pretratados y mejores sustratos para la hidrólisis han sido obtenidos a partir de los residuos lignocelulósicos usando el pretratamiento “steam explosion” en vez de hidróxido sódico ([Playne, 1984](#)), ácido nítrico ([Saddler y col., 1982](#)) y dióxido de azufre ([Wayman y Parekh, 1988](#)). También ha sido comparado con otros métodos usados para el pretratamiento de residuos de madera, tales como irradiación de microondas, molienda, hidrólisis con ácido sulfúrico diluido ([Gretlein y Converse, 1991](#)) y pretratamiento con amoníaco ([Dale y Moreira, 1982](#)), y demostró ser más efectivo.

El pretratamiento “steam explosion” puede ser aplicado a una gran variedad de biomásas vegetales e incrementar la susceptibilidad de la celulosa al ataque enzimático ([Ramos y col., 1992](#)) incluyendo residuos agrícolas y forestales tales como bagazos de caña de azúcar ([Kaar y col., 1998](#)), fibras de cáñamo ([Vignon y col., 1995](#)), cáscaras de cacahuete ([Sewalt y col., 1992](#)), tallos de girasol ([Sharma y col., 2002](#)) y huesos de aceituna ([Fernández-Bolaños y col., 2001](#)). El pretratamiento “steam explosion” se ha usado para la separación de compuestos antioxidantes fenólicos a partir de bambú ([Kurosumi y col., 2007](#)), para la recuperación de hidroxitirosol a partir de orujo de aceituna de tres fases ([Felizón y col., 2000](#)), para la producción de xilooligosacáridos a partir de subproductos ricos en maíz ([Yuan y col., 2004](#)), cáscaras de arroz ([Vegas y col., 2004](#)), madera de eucalipto ([Kabel y col., 2002](#)), como paso previo para la recuperación de lignina ([Fernández-Bolaños y col., 1999](#)), para liberar materiales digeribles de la pared celular y adecuar los materiales lignocelulósicos para procesos de sacarificación y alimentación animal. Los cambios que tienen lugar durante el tratamiento “steam explosion” permiten una bioutilización más eficiente del contenido de carbohidratos de los materiales lignocelulósicos por parte de los componentes microbiológicos del rumen y las enzimas libres ([Castro y col., 1994](#)).

2.3.2.- Recuperación de compuestos de alto valor añadido.

La viabilidad del aprovechamiento y utilización de los subproductos de la extracción del aceite de oliva, como de otros subproductos de origen vegetal, y del alperujo en particular, pasa por encontrar procesos industriales técnicamente viables y económicamente rentables para alcanzar una eficiente recuperación de sus componentes. Los usos alternativos del alperujo, frente a su uso como biocombustible, están recibiendo una especial atención y se centran en dos

posibles aplicaciones: la recuperación de componentes naturales de alto valor añadido y la bioconversión en productos útiles. En relación al interés suscitado por los compuestos naturales con actividades biológicas, los investigadores empezaron a considerar la posibilidad de recuperar los compuestos presentes en los subproductos de extracción del aceite de oliva, como compuestos con potenciales propiedades biológicas. Varios grupos de investigación están trabajando en la recuperación de compuestos valiosos para dar salida a la creciente cantidad de este subproducto, con un alto potencial contaminante que hay que eliminar. A pesar de que la mayoría de las tecnologías propuestas han sido probadas en laboratorio sólo algunas de ellas podrían tener aplicación a escala industrial.

Entre los diferentes métodos de pretratamiento existentes, el pretratamiento térmico con vapor de agua a alta presión y temperatura, con o sin descompresión rápida (explosiva), representa una alternativa simple y puede suponer un paso clave para la recuperación de estos compuestos naturales, la mayoría fenólicos antioxidantes, y el desarrollo de nuevas aplicaciones. El tratamiento térmico con vapor a alta presión del alperujo solubiliza gran parte de los compuestos fenólicos. En esta línea, el grupo de Pared Celular del departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa (C.S.I.C.) está trabajando desde hace algunos años en el estudio del aprovechamiento de los subproductos de extracción del aceite de oliva, usando vapor de agua a alta presión mediante un sistema de tratamiento “steam explosion” (*Figura 5*) para el aislamiento de compuestos de alto valor añadido ([Fernández- Bolaños y col., 2001](#); [Rodríguez y col., 2007a](#)). El pretratamiento steam explosion se ha usado para la separación de compuestos antioxidantes fenólicos a partir de orujo de aceituna de dos y tres fases, para la recuperación y aislamiento de hidroxitirosol y otros compuestos de interés como oligosacáridos y manitol ([Felizón y col., 2000](#); [Fernández-Bolaños y col., 2002a](#); [Fernández-Bolaños y col., 2004](#)).

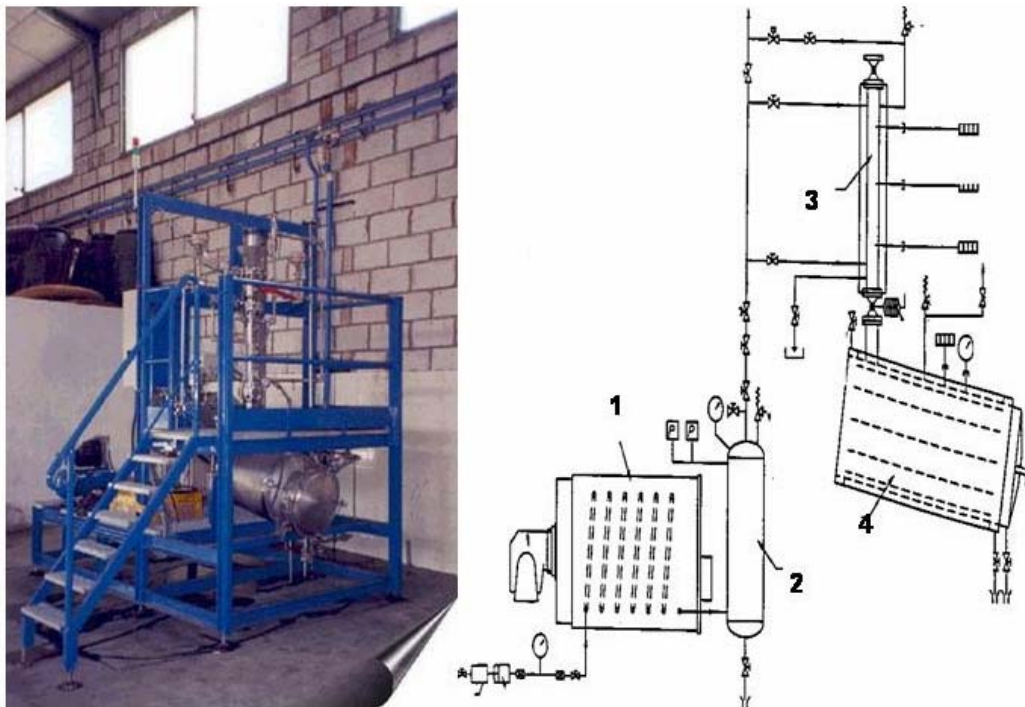


Figura 5. Fotografía y esquema del reactor “steam explosion” del Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa (C.S.I.C.), Sevilla, utilizado en este trabajo de investigación. En el esquema pueden verse los componentes del reactor: (1) caldera de producción de vapor, (2) acumulador de vapor, (3) cámara de reacción y (4) depósito de expansión.

2.4.- Compuestos fenólicos presentes en la aceituna.

Las aceitunas contienen una amplia variedad de compuestos fenólicos ([Brenes y col., 1999](#); [Mateos y col., 2001](#); [Ryan y col., 2002a](#); [Bianchi, 2003](#); [Owen y col., 2003](#)). Recientes estudios, *in vitro* e *in vivo*, demuestran que los compuestos fenólicos son poderosos antioxidantes y poseen otras potentes actividades biológicas que podrían explicar en parte los efectos saludables observados en la dieta Mediterránea ([Covas, 2007](#); [Trichopoulou y Dilis, 2007](#); [Fitó y col., 2008](#)). Estos compuestos también juegan un importante papel en la estabilidad (inhiben la peroxidación lipídica) y en las propiedades químicas y organolépticas de los productos de la aceituna (aceite de oliva y aceituna de mesa), y tienen significativos efectos nutricionales, fisiológicos y farmacéuticos sobre la salud humana ([Pérez-Jiménez, 2005](#)). Estudios epidemiológicos han asociado la baja incidencia de enfermedades coronarias, aterosclerosis, y algunos tipos de cáncer con el consumo de aceite de oliva en la dieta Mediterránea. La ingesta habitual de aceite de oliva proporciona un continuo aporte de antioxidantes, que pueden reducir el estrés oxidativo en el cuerpo humano. Un gran número de artículos relacionan los efectos beneficiosos del aceite de oliva con su contenido fenólico ([Owen y col., 2000](#); [Visioli y col., 2005](#)). Numerosos estudios muestran que el aceite de oliva virgen extra contiene gran variedad de antioxidantes fenólicos incluyendo fenoles simples, secoiridoides, flavonoides y lignanos ([Oliveras-López y col., 2007](#); [Brenes y col., 2002](#)). Todas estas sustancias fenólicas son potentes inhibidores del ataque de especies de oxígeno reactivas. Actualmente, hay evidencias que las especies oxidantes (oxígeno activo, radicales libres, etc.) están implicadas en la etiología de enfermedades tales como el cáncer de mama ([Aruoma, 2003](#)) y colon ([Gerber, 1994](#)).

Las aceitunas tienen una composición fenólica característica ([Figura 6](#)). La existencia y cantidad de fenoles específicos en la aceituna y, por ende, en el alperujo, depende de la variedad y estado de madurez, condiciones climáticas, estacionales y geográficas ([Romero y col., 2004a](#)). La oleuropeína, un éster glucósido de 3,4-dihidroxifeniletanol (hidroxitirosol) y ácido elenólico, es el principal compuesto secoiridoide en aceitunas verdes/no maduras; su concentración disminuye con la maduración del fruto. En paralelo con la disminución de la oleuropeína hay un aumento de la desmetiloleuropeína, de la forma dialdehídica del ácido elenólico unida a hidroxitirosol (3,4-DHPEA-DEA) y del glucósido de hidroxitirosol. Esta última sustancia llega a ser predominante en aceitunas maduras ([Romero y col., 2002a](#)). Otros compuestos secoiridoides encontrados en aceitunas son glucósido de ácido elenólico, ligustrósido y los derivados agliconas de oleuropeína y ligustrósido y sus formas dialdehídicas descarboximetiladas ([Obied y col., 2007a](#)). Entre los fenoles que también han sido identificados en la aceituna se encuentran el verbascósido y el salidrósido (glucósido de tirosol) y, en concentraciones relativamente altas, los flavonoides apigenin 7-glucósido, luteolin 7-glucósido, quercetina y rutina y las antocianinas cianidin 3-glucósido y cianidin 3-rutinósido, pigmentos que proporcionan el intenso color violeta oscuro a las aceitunas maduras ([Romero y col., 2002b](#)). Otros compuestos fenólicos encontrados en pulpa de

aceituna son catecol, metilcatecol, derivados de los ácidos cinámico (ácido cafeico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico) y benzoico (ácido 3,4-dihidroxifenilacético y ácido 4-hidroxibenzoico) y los alcoholes fenólicos simples 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG), tirosol e hidroxitirosol (*Figura 6*). Los principales compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen son tirosol, hidroxitirosol, las agliconas de oleuropeína y ligustrósido y los lignanos 1-acetoxipinoresinol y pinoresinol ([Brenes y col., 2002](#)).

El alperujo es rico en biofenoles y típicamente contiene el 98 % de los fenoles totales de la aceituna ([Rodis y col., 2002](#); [Vierhuis y col., 2001a](#)). Sólo el 2 % restante comprende la fracción fenólica del aceite de oliva. El contenido fenólico está estrechamente relacionado con el proceso de extracción, el cual determina el comportamiento de los fenoles y por lo tanto su distribución entre el aceite y las fracciones residuales. La mayoría de los fenoles tienen bajos coeficientes de reparto (aceite/agua) comprendidos entre 6×10^{-4} y 1,5 ([Rodis y col., 2002](#)), así es que se distribuyen preferiblemente en la fase acuosa o alpechín ([Obied y col., 2005a](#)). Por lo tanto, el perfil fenólico del alperujo es complejo y hasta la fecha la recuperación de los compuestos fenólicos no ha sido completamente aprovechada para la valorización del subproducto.

Durante los últimos años el interés en la recuperación de los compuestos fenólicos, en concentraciones hasta 100 veces más altas en los residuos del aceite de oliva que en el propio aceite ([Lesage-Meessen y col., 2001](#)), ha aumentado enormemente. El consumo de aceite de oliva y aceitunas de mesa ha mostrado estar asociado con algunos efectos saludables, incluyendo una más baja incidencia de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer ([Pérez-Jiménez, 2005](#); [Covas, 2007](#); [López-Miranda y col., 2010](#)). Estos hallazgos han impulsado considerablemente la investigación de la composición de las aceitunas, y señalan a los compuestos fenólicos como importantes responsables de los beneficiosos efectos observados en la salud humana. La recuperación de estos compuestos a partir del alperujo, como parte de su aprovechamiento, puede cambiar la visión negativa que se tiene de este subproducto y reconocerlo como una fuente barata y una valiosa materia prima para la producción de compuestos bioactivos y antioxidantes naturales con un amplio espectro de actividades biológicas, particularmente para las industrias alimentarias, cosméticas y farmacéuticas. Ciertamente, su recuperación, aparte de por su valor económico intrínseco, podría también ser beneficiosa por la consiguiente reducción del contenido fenólico en vista de futuros tratamientos y/o aplicaciones ([Allouche y col., 2004](#)), dados los efectos fitotóxicos y antimicrobianos que poseen los compuestos fenólicos. Por lo tanto, la extracción de estos compuestos fenólicos como productos de alto valor añadido podría ser considerada como una interesante alternativa para hacer provechosos los residuos de las almazaras. Los compuestos fenólicos son un grupo heterogéneo de compuestos naturales presentes en todas las plantas superiores, que poseen la característica química común de contener al menos un grupo fenol. Entre ellas, el olivo y su fruto han sido reconocidos como una extraordinaria fuente de biofenoles. En las plantas, los compuestos fenólicos son metabolitos

secundarios y desempeñan importantes funciones fisiológicas: actúan como agentes que reducen el crecimiento de plantas competidoras, por su carácter anti-microbiano son productos de defensa ante microorganismos patógenos como bacterias, hongos y virus ([Ryan y Robards, 1998](#)), y absorben la radiación ultravioleta en las capas más superficiales protegiendo a los tejidos internos de sus efectos perjudiciales.

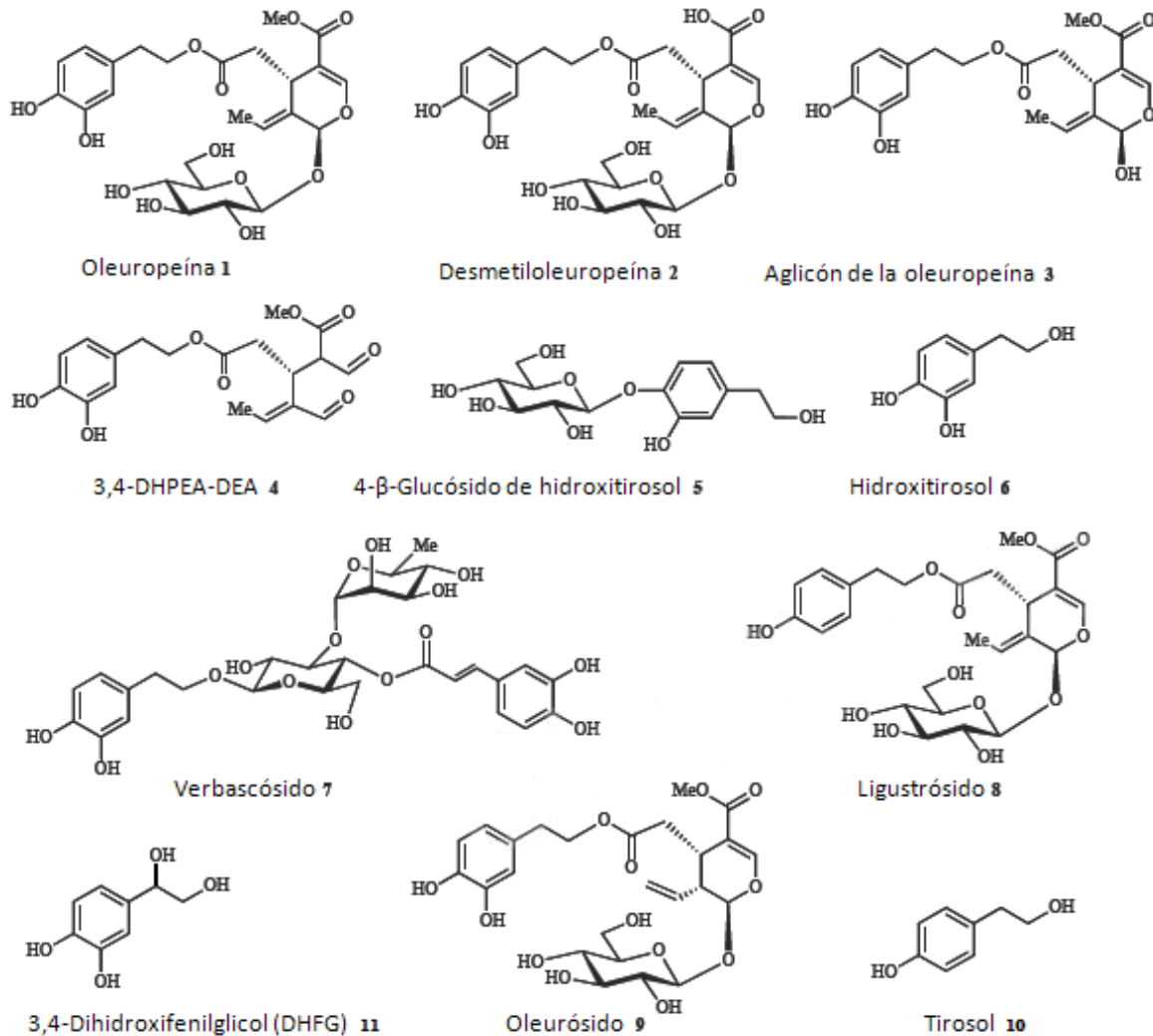


Figura 6. Estructuras de los principales compuestos fenólicos presentes en la aceituna.

2.4.1.- Recuperación de compuestos fenólicos.

Los principales sistemas propuestos para recuperar fenoles a partir de muestras de origen vegetal y aguas residuales de procesos industriales son: extracción sólido-líquido y líquido-líquido con disolventes ([Tura y Robards, 2002](#)); métodos cromatográficos ([Capasso y col., 1999](#); [Crea, 2002](#); [Fernández-Bolaños y col., 2002b](#)); concentración selectiva por ultrafiltración, ósmosis

inversa y extracción con fluido supercrítico ([González-Muñoz y col., 2003](#); [Reis y col., 2006](#)). Estas técnicas pueden ser usadas individualmente o de un modo integrado.

De los diferentes métodos de extracción mencionados, las técnicas de adsorción-desorción para la extracción de compuestos fenólicos de los alpechines usando resinas adsorbentes son las más útiles. [Setti y col., 2003](#) describen una planta para el tratamiento de alpechines y la recuperación de compuestos de interés industrial sobre adsorbentes sintéticos. [Johannisbauer y col., 2003](#) proporcionan un procedimiento para el aislamiento de antioxidantes a partir de los residuos de la producción de aceite de oliva. El agua de vegetación de las aceitunas se somete a una adsorción en lecho fluidizado, en adsorbentes poliméricos y en resinas de intercambio iónico en particular, Amberlite® XAD y Lewatit® EP. Los antioxidantes adsorbidos se eluyen con un disolvente apropiado. [Cuomo y Rabovskiy, 2002](#) describen un método de obtención de extractos ricos en compuestos fenólicos antioxidantes a partir de aceitunas frescas, pulpas (orujo y alperujo), alpechín, y aceite de oliva. El método incluye una extracción con un solvente acuoso polar (agua o una mezcla de agua con cualquier solvente polar miscible con ella), acidificado o no, y el pase del extracto por resinas Amberlite® XAD o Duolite® para separarlos de la fase acuosa con solvente orgánico polar y obtener una solución de componentes fenólicos antioxidantes. La principal desventaja que presentan estos métodos es el uso de disolventes orgánicos que disminuye su viabilidad económica.

Los compuestos fenólicos poseen propiedades secuestrantes de radicales libres y quelatantes de iones metálicos, y se ha probado *in vitro* que algunos de ellos son más efectivos como antioxidantes que las vitaminas C y E en sistemas lipofílicos ([Rice-Evans y col., 1996](#)). El interés en los antioxidantes naturales está aumentando debido a la evidencia de la implicación de los radicales libres y especies reactivas de oxígeno en varios procesos patológicos (enfermedades hepáticas, renales e inflamatorias) y como los alimentos ricos en fenoles pueden prevenir las enfermedades asociadas al estrés oxidativo. El hidroxitiroso es uno de los principales compuestos fenólicos presentes en aceituna y se ha mostrado como el más interesante debido a su notable actividad farmacológica y antioxidante. Se han llevado a cabo muchos estudios sobre su biodisponibilidad y metabolismo en humanos para establecer sus efectos saludables ([Miró-Casas y col., 2003](#); [Visioli y col., 2005](#)). Sin embargo, los estudios han estado limitados, hasta el presente, porque el compuesto no estaba disponible comercialmente.

Varios métodos han sido desarrollados y patentados para su recuperación a partir de la aceituna y sus subproductos usando extracción líquido-líquido en contracorriente ([Fki y col., 2005](#)), extracción con fluido supercrítico con columnas operando en modo contracorriente ([Crea, 2002](#)), técnicas de separación por membranas de ultrafiltración y nanofiltración ([Ibarra y Sniderman, 2005](#)), resinas adsorbentes ([Beverungen y col., 2005](#)) y adsorción en resinas no iónicas ([Brenes y Castro, 2003](#)). También han sido descritos procedimientos de síntesis, como la oxidación catalítica para convertir tiroso en hidroxitiroso ([Villanova y col., 2006](#)), la conversión diferencial de isómeros

de tirosol usando microorganismos ([Allouche y Sayadi, 2005](#)) y la síntesis enzimática ([Espín y col., 2001](#)). Sin embargo, uno de los sistemas de purificación de hidroxitirosol patentados más simples, prácticos y económicos (únicamente requiere dos pasos cromatográficos) que ha tenido éxito y hecho posible su producción comercial a nivel industrial con un alto grado de pureza (99,6 %), ha sido desarrollado en el grupo de Pared Celular del Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa (C.S.I.C.) ([Fernández-Bolaños y col., 2002b](#)). En una primera etapa, la fuente que contiene hidroxitirosol (alpechín, fase acuosa del proceso hidrotérmico del alperujo, aguas de lavado de la elaboración de aceitunas de mesa o cualquier otra fuente acuosa) se hace pasar a través de una columna rellena con una resina de intercambio aniónico Amberjet[®] 4200. Después de eluir con agua se obtiene una solución de hidroxitirosol, conteniendo el 85 % del producto introducido, con una pureza que oscila entre el 30 y el 60 %. En una segunda etapa, el producto obtenido de la primera columna, se carga sobre una columna con resina adsorbente Amberlite[®] XAD16. En la elución se utiliza una mezcla etanol o metanol-agua al 30 % (v/v) y la fracción de eluido rica en hidroxitirosol purificado (pureza mínima del 95 %) es recuperada.

Extractos fenólicos comerciales

El sistema de purificación de hidroxitirosol patentado por [Fernández-Bolaños y col., 2002b](#) ha hecho posible su producción a nivel industrial y su comercialización a cargo de la empresa Genosa I+D, S.A., y permite obtener dos productos. El primer producto denominado Hytolive[®] 2 contiene hidroxitirosol con una pureza del 50 %, el segundo, Hytolive[®] 1, es hidroxitirosol puro (99,6 %). Hytolive[®] 1 aumenta 1,7 veces la estabilidad oxidativa del aceite de oliva medida por el método Rancimat ([Fernández-Bolaños y col., 2002a](#)) y tiene aproximadamente 9 veces más capacidad antioxidante que el ácido ascórbico medida por el método ORAC. En la actualidad son muchas las empresas que están estudiando y valorando incorporar Hytolive[®] a sus productos con el fin de enriquecer y aportar un mayor valor nutricional a los mismos (www.genosa.com/hytolive/).

[Crea y col., 2008](#) proporcionan una invención para producir una formulación rica en hidroxitirosol, denominada comercialmente HIDROX[®], y preparada por incubación de un alpechín (preferiblemente obtenido de aceitunas deshuesadas) acidificado a un pH entre 1 y 5 durante 6-12 meses para hidrolizar la oleuropeína originalmente presente a hidroxitirosol. Entre los fenoles encontrados en el extracto, el principal constituyente de importancia biológica es el hidroxitirosol (50-70 %). El extracto no causa toxicidad a niveles de 2 g/kg/día ([Soni y col., 2006](#)). De los mismos autores ([Crea y col., 2005](#)) es otro método patentado para producir un extracto acuoso de pulpa de aceituna que contiene oleuropeína sustancialmente libre de compuestos monofenólicos a partir de pulpa de aceituna deshuesada. El extracto es secado para obtener un polvo liofilizado estandarizado que puede ser encapsulado. La empresa CREAGRI[®] vende un suplemento dietético en pastillas (OLIVENOL[™]) que contiene polifenoles antioxidantes procedentes de la pulpa de las aceitunas y que es útil como terapéutico y antioxidante en una gran variedad de enfermedades,

incluyendo el tratamiento del daño de la piel por exposición a radiación ultravioleta o el tratamiento de los desordenes neurológicos asociados con el SIDA ([Crea y col., 2003](#)).

2.4.2.- 3,4-Dihidroxifenilglicol (DHFG).

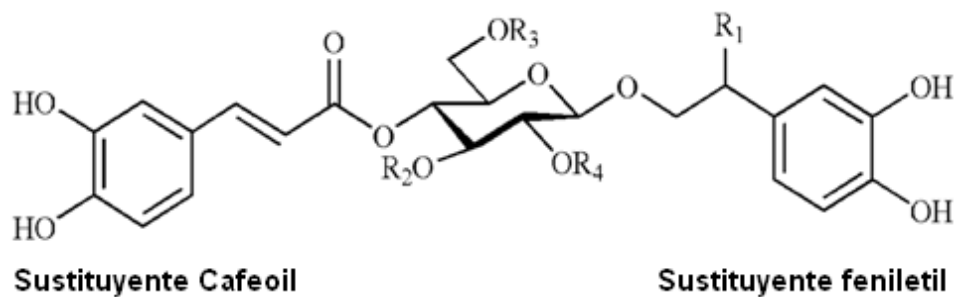
Entre los compuestos fenólicos interesantes del alperujo, se encuentra el 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG). El DHFG, es un fenol simple que presenta un alto poder antioxidante, incluso superior al del principal compuesto fenólico presente en la aceituna, el hidroxitirosol ([Rodríguez y col., 2007b](#)). De hecho, su estructura sólo se diferencia en la presencia de un grupo hidroxilo en la posición β del hidroxitirosol. El DHFG fue descrito por primera vez como un componente principal de la fracción fenólica de las aguas de vegetación e identificado por GC-MS ([Bianchi y Pozzi, 1994](#)). Posteriormente, su presencia ha sido confirmada por el análisis de los espectros RMN de ^1H de alpechines ([Limioli y col., 1996](#)). Recientemente, este catecol, ha sido detectado en aceitunas de mesa ([Marsilio y col., 2005](#)), aunque su concentración final depende del método de elaboración, y en el aceite de oliva en una concentración inferior a 35 $\mu\text{mol/kg}$, aunque más alta que la detectada para los flavonas luteolina y apigenina ([Medina y col., 2006](#)).

Esta sustancia no había sido nunca descrita como metabolito libre en plantas. Un derivado del ácido hidroxicinámico, similar al verbascósido, que contiene al DHFG en su estructura ha sido aislado a partir de plantas de la familia *Oleaceae* ([Nishibe, 2002](#)) y recientemente identificado y caracterizado estructuralmente en *Olea europaea*, en forma de dos diastereoisómeros del β -hidroxiacteósido ([Innocenti y col., 2006](#); [Mulinacci y col., 2005](#)). También recientemente, ha sido descrita por primera vez en aceituna la presencia de 2-hidroxioluropeína, con el grupo hidroxilo localizado en la fracción feniletanólica ([Di Donna y col., 2007](#)).

El DHFG podría tener un notable interés en el campo de la nutrición y la farmacología porque presenta un alto poder antioxidante y es el principal metabolito producido por la desaminación del neurotransmisor humano noradrenalina ([Venneri y Del Rio, 2004](#)). El DHFG es un compuesto susceptible de ser incluido en una dieta saludable para ejercer una acción protectora frente al estrés oxidativo mediante el bloqueo de los radicales libres y/o la interrupción de la cadena de peroxidación lipídica. El enriquecimiento de productos alimentarios con DHFG puede emplearse como una estrategia para desarrollar alimentos funcionales capaces de conferir beneficios sobre funciones del organismo, en la conservación de alimentos y en aplicaciones cosméticas como agente antienvjecimiento y antioxidante. Por lo tanto, puede ayudar al emergente y prometedor papel de los antioxidantes como herramienta terapéutica en la prevención y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Otras fuentes de DHFG

El DHFG no se ha encontrado como compuesto libre en plantas y sí formando parte de la estructura de los glicósidos fenilpropanoides o familia de los acteósidos, concretamente de los β -hidroxiacteósidos (*Figura 7*). Las plantas son fuentes potenciales de antioxidantes naturales y los glicósidos fenilpropanoides son sustancias naturales ampliamente distribuidas como metabolitos secundarios en diferentes especies de plantas comestibles y productos alimenticios derivados de plantas. Varias plantas usadas en la medicina tradicional china, japonesa y coreana contienen considerables cantidades de estos compuestos. La bibliografía sobre la distribución en plantas de los fenilpropanoides más importantes indica que las plantas pertenecientes a las familias *Compositae*, *Lamiaceae*, *Oleaceae*, *Orobanchaceae* y *Plantaginaceae* son fuentes ricas en estos compuestos. Muchos glicósidos fenilpropanoides han sido aislados a partir de ellas y sus extractos son usados por sus actividades antioxidantes, antiproliferantes y neurosedativas; por sus efectos relajantes y sobre la producción/liberación de NO endotelial; por sus propiedades inmunomoduladoras; y en enfermedades neurodegenerativas ([Nishibe, 2002](#); [Tozuka y col., 2005](#); [Li y col., 2008](#)). Sus estructuras están funcionalizadas con una gran variedad de sustituyentes fenólicos (feniletíl y cafeoil) unidos al núcleo principal de disacárido o trisacárido. En la *Figura 7* el grupo ramnosil (R_2) está unido mediante un enlace tipo α -L-glicosídico a la posición 3 de la glucosa. En la naturaleza, el grupo cafeoil está por lo general unido a la posición 4 de la glucosa y menos comúnmente a la posición 6. Los sustituyentes anoméricos son las agliconas feniletíl (hidroxitirosil), 2-hidroxifeniletíl (3,4-dihidroxifenilglicol) y β -oxofeniletíl. Las dos primeras estructuras existen predominantemente en los vegetales en ese orden. Por contra, la aglicona de β -oxofeniletíl es poco frecuente. Los sustituyentes fenólicos son los responsables de las actividades biológicas en estos compuestos oligoglicosídicos, incluso algunos autores sugieren que el grupo feniletíl podría ser más importante en las actividades del acteósido que el grupo cafeoil ([Tozuka y col., 2005](#)). La actividad secuestrante del β -hidroxiacteósido es más alta que la del acteósido debido a la hidroxilación ([Harput y col., 2006](#)).



β -Hidroxiacteósido	$R_1 = \text{OH}$	$R_2 = \text{Ramnosa}$	$R_3 = \text{H}$	$R_4 = \text{H}$
Hellicosido	$R_1 = \text{OH}$	$R_2 = \text{Glucosa}$	$R_3 = \text{H}$	$R_4 = \text{H}$
Orobanchosido	$R_1 = \text{OH}$	$R_2 = \text{H}$	$R_4 = \text{Ramnosa}$	$R_3 = \text{H}$
Suspensasido	$R_1 = \text{OH}$	$R_2 = \text{H}$	$R_3 = \text{Ramnosa}$	$R_4 = \text{H}$
Wedelosin	$R_1 = \text{OH}$	$R_2 = \text{Apiofuranosa-Rha}$	$R_3 = \text{H}$	$R_4 = \text{H}$
Acteósido (Verbascósido)	$R_1 = \text{H}$	$R_2 = \text{Ramnosa}$	$R_3 = \text{H}$	$R_4 = \text{H}$

Figura 7. Estructura de glicósidos fenilpropanoides o acteósidos que contienen al DHFG.

2.4.3.- Propiedades de los compuestos fenólicos: hidroxitirosol y acteosidos.

El hidroxitirosol es el alcohol fenólico más abundante en la aceituna, en forma libre o conjugada ([Fabiani y col., 2002](#); [Visioli y col., 2004](#)). Su estructura orto-difenólica, característica de los biofenoles, le confiere una alta capacidad antioxidante. La actividad antioxidante del hidroxitirosol ha demostrado ser más efectiva que la del butilhidroxitolueno (BHT) o la de la vitamina E ([Aruoma y col., 1998](#)). Las propiedades antioxidantes de los o-difenoles están relacionadas con la donación de hidrógeno, es decir, con su capacidad para estabilizar radicales mediante la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre los hidrógenos libres de su grupo hidroxilo y sus radicales fenoxilos ([Visioli y Galli, 1998](#)).

En los últimos años, la actividad biológica del hidroxitirosol se ha demostrado en numerosos estudios *in vitro*. Su actividad antioxidante inhibe la oxidación de la lipoproteína de baja densidad LDL humana, uno de los pasos clave en la iniciación de la aterosclerosis ([Briante y col., 2004](#); [Covas y col., 2006](#)). El hidroxitirosol es capaz de modular la acción de las enzimas ciclooxigenasa, lipoxigenasa y óxido nítrico-sintasa contribuyendo a paliar procesos inflamatorios y de trombosis ([Bitler y col., 2005](#)). Además reduce la formación de radicales libres como el anión superóxido y, por tanto, previene la aparición de procesos mutagénicos y carcinogénicos ([Tuck y col., 2002](#); [Goya y col., 2007](#)). El hidroxitirosol induce la apoptosis de células de leucemia promielocítica humana (HL-60) ([Fabiani y col., 2006](#)) y proporciona protección contra la citotoxicidad inducida por especies de oxígeno reactivas en una variedad de modelos celulares: oxígeno activo en células Caco-2 ([Manna y col., 1997](#)), peróxidos en eritrocitos humanos ([Manna y col., 1999](#)) y en microsomas hepáticos de rata ([Gutiérrez y col., 2001](#)). Se ha probado su efecto sobre la inhibición de la agregación plaquetaria ([Bogani y col., 2007](#)) y la producción de leucotrieno para neutrófilos humanos ([De la Puerta y col., 1999](#)). También se ha demostrado que actúa contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en infecciones intestinales y del tracto respiratorio ([Obied y col., 2007b](#)), y contra el virus VIH ([Lee-Huang y col., 2007ab](#)).

La absorción postprandial de compuestos fenólicos del aceite de oliva y su incorporación en lipoproteínas humanas ([Bonanome y col., 2000](#)) ha sido descrita; su absorción depende de la dosis y son excretados por la orina como conjugados del ácido glucurónico ([Visioli y col., 2000](#); [Miró-Casas y col., 2003](#)). Recientemente, en estudios *in vivo*, se ha descrito la buena biodisponibilidad de hidroxitirosol lo cual aconseja su inclusión en la dieta ([Manna y col., 2000](#)). El hidroxitirosol, administrado a ratas como el único componente bioactivo de un extracto de alpechín, es capaz de aumentar la capacidad antioxidante del plasma ([Gutiérrez y col., 2000](#)). Actualmente, son numerosas las investigaciones que se realizan sobre el hidroxitirosol, como su uso en la prevención y tratamiento del ictus cerebral isquémico ([De la Cruz Cortés y col., 2006](#)), de enfermedades neurodegenerativas ([Schaffer y col., 2007](#)) y del melanoma ([D'Angelo y col., 2005](#)).

Otros compuestos que han atraído la atención de los investigadores por sus prometedoras propiedades biológicas y por la síntesis de efectivos medicamentos a partir de ellos son los glicósidos fenilpropanoides. Los estudios biológicos y particularmente medicinales de los glicósidos fenilpropanoides han progresado significativamente. Muchas propiedades biológicas interesantes que dependen de la estructura fenilpropanoide y que pueden ser explicadas, al menos en parte, por su actividad antioxidante, han sido atribuidas a la familia de los fenilpropanoides: actividad antiproliferante ([Ohno y col., 2002](#)), anti-inflamatoria *in vitro* ([Díaz y col., 2004](#)), anti-viral ([Kim y col., 2001](#)), hepatoprotectora ([Xiong y col., 1998](#)), fuerte actividad anti-radical ([Gao y col., 1999](#)), inhibición de la agregación plaquetaria ([Cano y col., 1990](#)) y citotoxicidad contra células tumorales ([Inoue y col., 1998](#)), entre otras propiedades. Además, estos compuestos podrían ser valiosos terapéuticos para el tratamiento de desórdenes neurodegenerativos ([Koo y col., 2006](#)).

A pesar de los muchos estudios que muestran la amplia variedad de actividades biológicas que tienen el hidroxitirosol y los glicósidos fenilpropanoides, sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios sobre las posibles propiedades bioactivas y funcionales del DHFG (la presencia de un grupo hidroxilo adicional en su estructura respecto al hidroxitirosol le podría conferir más propiedades biológicas, o mejorar las que éste último ya posee). En nuestro grupo de investigación se han llevado a cabo los ensayos de la capacidad antioxidante del DHFG mediante cuatro ensayos *in vitro*: capacidad anti-radical, poder reductor e inhibición de la oxidación primaria y secundaria en sistemas lipídicos ([Rodríguez y col., 2007b](#)). Se ha demostrado por primera vez que el DHFG tiene, en fase acuosa, una capacidad antioxidante 2-3 veces superior al hidroxitirosol y la vitamina C. Tiene también más capacidad antirradical y poder reductor que el hidroxitirosol y las vitaminas C y E. Se ha observado también que, en fase lipídica, tiene una capacidad similar a la vitamina E en la inhibición de la oxidación, a pesar de su alta polaridad.

2.5.- Producción de aceite de orujo de oliva.

El aceite de orujo, tradicionalmente producido y consumido en España, es otro importante subproducto en el procesado del aceite de oliva virgen y su obtención se ha transformado considerablemente en los últimos tiempos debido a los avances tecnológicos que han experimentado las almazaras. En la actualidad, se pueden considerar tres tipos de orujos de aceituna, dependiendo del sistema de extracción usado: tradicional o por presión y mediante los sistemas continuos de separación centrífuga en dos y tres fases. La principal diferencia entre los tres se debe al contenido de agua (25-30, 70 y 45 %, respectivamente). Según el método tradicional y a partir de los orujos del sistema de tres fases, el aceite de orujo es extraído a partir de orujo seco (aproximadamente 8 % de humedad) con disolvente (normalmente hexano). El producto obtenido se denomina “aceite de orujo de oliva crudo”. Por otra parte, si el orujo fresco o almacenado de dos fases es sometido a una segunda centrifugación o extracción física usando centrifugas horizontales o decanters, es posible extraer entre el 40 y el 60 % del aceite residual retenido. El aceite obtenido es conocido como “aceite de segunda centrifugación” y se comercializa también como “aceite de orujo de oliva crudo” ([Moral y Méndez, 2006](#)). La siguiente operación consiste en secar el alperujo para proceder a la extracción del aceite residual. Posteriormente, el alperujo se usa como biocombustible para las plantas de cogeneración.

2.5.1.- Inconvenientes de la extracción de aceite de orujo.

La operación de secado se realiza en cilindros horizontales rotatorios, de gran consumo energético, y plantea grandes dificultades debido a la alta humedad del alperujo y a los compuestos orgánicos que anteriormente (sistema de tres fases) se encontraban en el alpechín (azúcares, polialcoholes, ácidos orgánicos, etc.) y que ahora permanecen en él. El proceso de secado provoca, con las altas temperaturas de operación, la caramelización de ciertos azúcares, siendo después más difícil la extracción del aceite, y se generan compuestos de degradación indeseados (hidrocarburos aromáticos policíclicos) que después se detectan en el aceite de orujo.

El alperujo es transportado desde las almazaras a las orujeras. En éstas se recepciona y almacena. La duración de la fase de secado del alperujo retrasa el final de la campaña y aumenta notablemente el periodo de almacenamiento. Cuando el almacenamiento del alperujo es prolongado se producen reacciones de fermentación que originan compuestos indeseados y, que además, reducen el contenido graso. En definitiva, los inconvenientes del actual sistema de procesado y secado, hacen necesaria la búsqueda de alternativas capaces de disminuir la humedad del alperujo y, al mismo tiempo deben contemplar favorecer la extracción de sus componentes, como es el caso del aceite de orujo de oliva. Un producto, el aceite de orujo de oliva, que puede ser considerado un alimento funcional ya que presenta unas propiedades saludables que van más allá de su función nutricional y que, por ejemplo, al ser un alimento rico en

componentes minoritarios bioactivos puede ser destinado a mejorar el estado de salud de poblaciones con riesgo de lesiones ateroscleróticas ([Ruiz Gutiérrez y col., 2005](#)).

2.5.2.- Componentes menores del aceite de orujo de oliva y sus propiedades saludables.

La fracción insaponificable o no glicerídica (fracción extractada con disolventes después de la saponificación) del aceite de orujo de oliva es una buena fuente de componentes menores, procedentes de las hojas, la piel y la semilla de la aceituna, con interesantes propiedades biológicas. Los componentes menores representan el 1-2 % del contenido total de un aceite de oliva. El aceite de orujo de oliva contiene elevadas cantidades de alcoholes grasos, esteroides, hidrocarburos (escualeno), tocoferoles, ceras y ácidos y alcoholes triterpénicos ([De la Puerta y col., 2009](#)) y algunos de estos componentes menores están presentes en concentraciones más altas en el aceite de orujo de oliva que en el aceite de oliva virgen ([Pérez-Camino y Cert, 1999](#)).

Esteroides

Los esteroides, que comprenden una porción principal de la materia insaponificable del aceite de orujo de oliva, son posiblemente los más importantes de los componentes menores. La investigación ha mostrado que cada aceite tiene un perfil de esteroides característico que hace de su determinación una importante herramienta para detectar adulteraciones o comprobar la autenticidad de un aceite ([Gutiérrez y col., 2000](#)). Los esteroides son estructuralmente similares al colesterol pero con algunas modificaciones. Estas modificaciones implican a la cadena lateral e incluyen la adición de un doble enlace y/o un grupo metilo o etilo ([Figura 8](#)). Los principales esteroides encontrados en aceite de oliva virgen son β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol y campesterol. El papel nutricional de estos compuestos se basa en ayudar a reducir el nivel de colesterol en el plasma sanguíneo humano, porque inhiben competitivamente la absorción intestinal de colesterol ([Plat y Mensink, 2001](#); [Jiménez-Escrig y col., 2006](#)). Como resultado estos compuestos están siendo usados como ingredientes de alimentos funcionales ([Ostlund, 2002](#)).

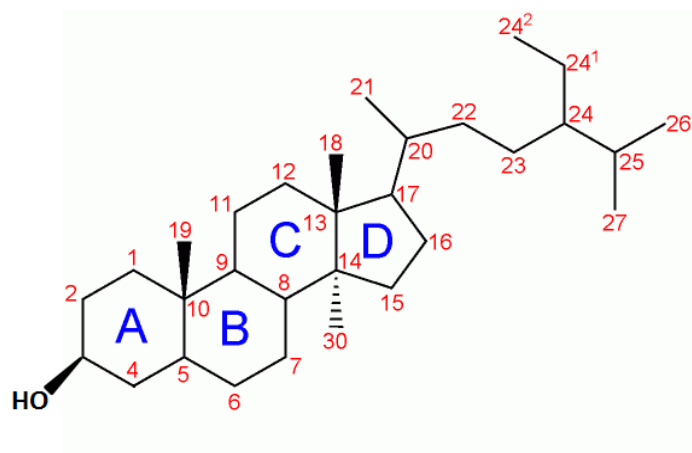


Figura 8. Estructura química general de los esteroides. El β -sitosterol se obtiene añadiendo un doble enlace entre los carbonos 5 y 6. Al quitar el carbono 24^2 se obtiene campesterol. Al quitar los carbonos 24^1 y 24^2 se obtiene colesterol. Al quitar un hidrógeno de los carbonos 22 y 23 se obtiene estigmasterol. Al quitar un hidrógeno de los carbonos 24^1 y 24^2 se obtiene Δ -5-avenasterol.

Tocoferoles

Otro grupo de compuestos de la fracción insaponificable son los tocoferoles (*Figura 9*). Los tocoferoles son compuestos isoprenoides y antioxidantes liposolubles abundantes en la mayoría de los aceites vegetales. El aceite de oliva contiene α -tocoferol en cantidades más altas que otros tocoferoles (β y γ -tocoferol). El α -tocoferol es un micronutriente esencial involucrado en varios procesos relacionados con el estrés oxidativo tales como aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, envejecimiento acelerado y cáncer ([Mardones y Rigotti, 2004](#)). El α -tocoferol está considerada la forma de la vitamina E más activa biológicamente a consecuencia de su mayor actividad antioxidante y más altos niveles en sangre. Sin embargo, las investigaciones han reconocido que los otros tocoferoles, principalmente el γ -tocoferol, tienen también interesantes actividades biológicas. El γ -tocoferol, debido a su fuerte actividad antiinflamatoria ([Reiter y col., 2007](#)) y otras actividades antineoplásicas y natriuréticas ([Hensley y col., 2004](#)), puede ser la forma más efectiva de la vitamina E en la prevención del cáncer, así como en enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Recientes estudios han demostrado que una mezcla de tocoferoles rica en γ -tocoferol inhibe la génesis de tumores de colon, próstata, mama y pulmón en modelos animales ([Ju y col., 2010](#)).

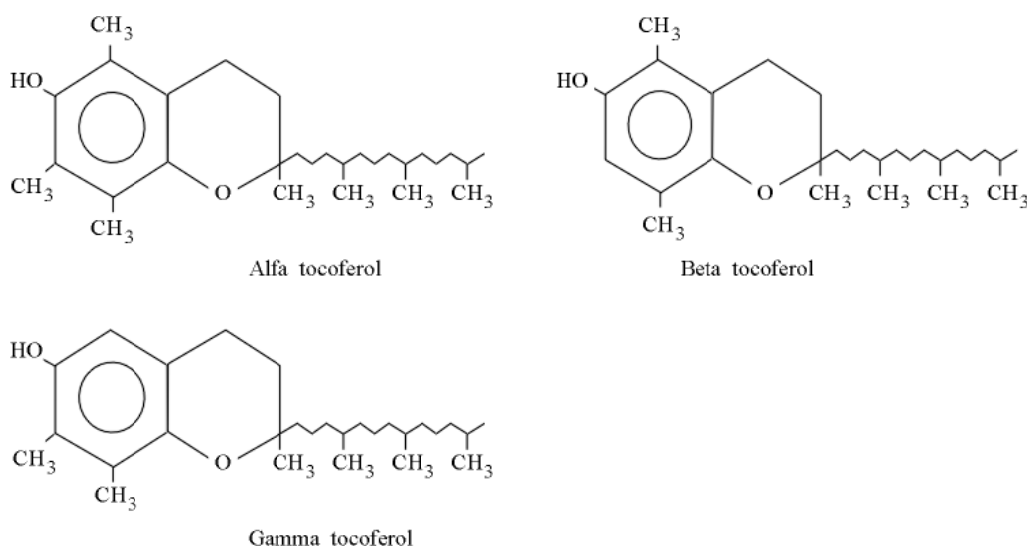


Figura 9. Estructura química de los tocoferoles encontrados en el aceite de orujo de oliva. El número de grupos metilos en las posiciones sustituidas del anillo difiere entre diferentes tocoferoles.

Escualeno

El escualeno es un hidrocarburo alifático (*Figura 10*) perteneciente a la familia terpenoide y un precursor de la biosíntesis del colesterol y de todas las hormonas esteroideas. Se encuentra de forma característica en el aceite de oliva. Comparado con otros aceites vegetales, el escualeno aparece en proporciones elevadas en aceite de oliva, hasta 0,7 % (7 g/kg). Entre las interesantes propiedades de este compuesto destaca el efecto sobre el desarrollo de la aterosclerosis. Los resultados indican que la administración de escualeno reduce la lesión aterosclerótica en ratones macho de manera específica ([Guillén y col., 2008](#)). Administrado oralmente a ratas demuestra tener un considerable efecto quimiopreventivo sobre el cáncer de colon, pulmón y piel ([Rao y col., 1998](#); [Smith y col., 1998](#)). [Budiyanto y col., 2000](#) describen un efecto protector del aceite de oliva aplicado tópicamente a ratones para inducir tumor de piel por exposición a luz ultravioleta. Se sugiere que el escualeno, por su actividad antioxidante, suprime el efecto fotocarcinogénico de la luz ultravioleta. En este sentido, se sabe que el escualeno se acumula principalmente en la piel y aquí neutraliza el oxígeno reactivo protegiendo a la piel humana de la peroxidación lipídica producida por la exposición a la luz ultravioleta u otras fuentes de daño oxidativo.

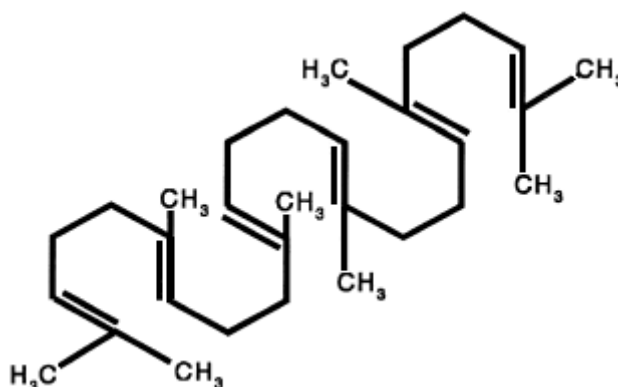


Figura 10. Estructura química del escualeno, un triterpeno poliinsaturado que contiene seis unidades de isopreno.

Alcoholes alifáticos

En el aceite de orujo de oliva se encuentran también los alcoholes grasos de cadena larga o alifáticos (C_{18} - C_{28}). Los principales alcoholes alifáticos presentes son docosanol, tetracosanol, hexacosanol y octacosanol (C_{22} , C_{24} , C_{26} y C_{28} , respectivamente). También, triacontanol (C_{30}) está presente en menor cantidad (*Figura 11*). A estos compuestos se le atribuyen una serie de beneficiosas actividades fisiológicas como inhibición de la agregación plaquetaria, reducción del daño endotelial y efectos reductores del colesterol ([Singh y col., 2006](#)), útiles para reducir la formación de trombos y por tanto prevenir el desarrollo de la aterosclerosis. Todos estos estudios ha sido llevados a cabo usando “policosanol”, una mezcla comercial de octacosanol (60 %), triacontanol (12-14 %) y hexacosanol (6-12 %). El octacosanol debido a sus efectos citoprotectores podría ser una alternativa a la aspirina en pacientes que sufren de irritación gástrica ([Taylor y col., 2003](#)). Los alcoholes alifáticos de cadena larga aislados de la fracción insaponificable del aceite de oliva de orujo también reducen significativamente la liberación de diferentes mediadores celulares proinflamatorios *in vitro* involucrados en procesos inflamatorios ([Fernández Arche y col., 2009](#)).

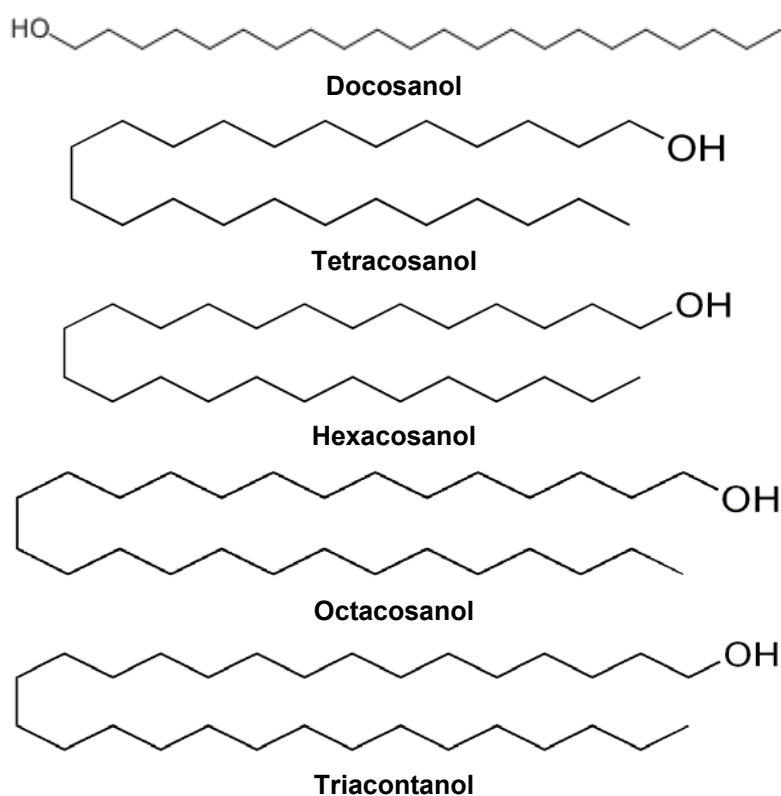


Figura 11. Estructura química de los alcoholes alifáticos.

Ácidos y alcoholes triterpénicos

Otra fracción de los componentes menores del aceite de orujo de oliva que ha recibido atención en recientes investigaciones es la fracción triterpénica. Los ácidos maslínico y oleanólico y los alcoholes eritrodiool y uvaol son triterpenos pentacíclicos (*Figura 12*) abundantes en el aceite de orujo de oliva, que han revelado tener importantes propiedades biológicas. Entre estas, antiinflamatorias ([Márquez-Martín y col., 2006](#)), actividad antihiper glucémica ([Sato y col., 2007](#)) y anticancerosa ([Martín y col., 2007](#)). La ingesta continuada de dietas enriquecidas con aceite de orujo de oliva con altas concentraciones de ácido oleanólico mejora la función endotelial asociada con la hipertensión ([Rodríguez-Rodríguez y col., 2007](#)). Eritrodiool y ácido oleanólico protegen contra la peroxidación lipídica de microsomas hepáticos en ratas alimentadas con aceite de orujo de oliva ([Perona y col., 2005](#)). Los dioles eritrodiool y uvaol proporcionan acción anticarcinogénica que puede tener potencial en la prevención y tratamiento de tumores cerebrales y otros cánceres ([Martín y col., 2009](#)). Los componentes triterpénicos del aceite de orujo de oliva inducen “*in vitro*” vasorelajación en la aorta de ratas hipertensas ([Rodríguez-Rodríguez y col., 2006](#)). Estos datos contribuyen a definir las potenciales propiedades nutricionales del aceite de orujo de oliva, identificándolo como una fuente de compuestos vasodilatadores.

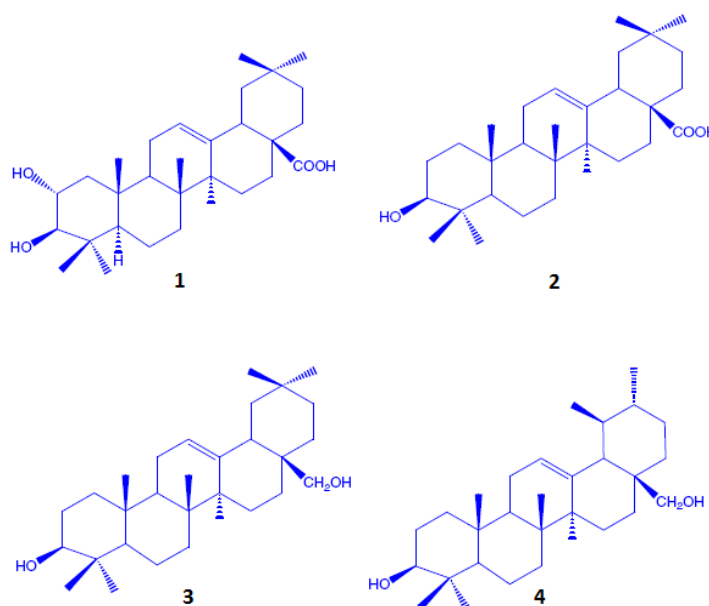


Figura 12. Estructuras químicas de los ácidos y alcoholes triterpénicos del aceite de orujo de oliva: (1) ácido maslínico; (2) ácido oleanólico; (3) eritrodiool y (4) uvaol.

2.6.- Composición y estructura de la pared celular vegetal.

La pared celular es un componente principal de la célula vegetal que le confiere protección, tanto de naturaleza física, como química y mecánica, y es esencial para muchos procesos del crecimiento vegetal, desarrollo, mantenimiento y reproducción. La pared celular está compuesta de polisacáridos complejos y proteínas estructurales en una serie de capas. La primera que se forma es la lámina media, la región que actúa de unión entre las paredes de células adyacentes, es particularmente abundante en polisacáridos pécticos (pectinas). Entre la lámina media y la membrana plasmática se deposita la pared primaria que se forma en células en crecimiento incrementado rápidamente su superficie. La pared primaria está formada por microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de polisacáridos altamente hidratada. La celulosa es el polisacárido vegetal más abundante y está formada por una cadena lineal de unidades de D-glucosa unidas covalentemente por enlaces glucosídicos β -(1 \rightarrow 4). Los enlaces de hidrógeno intermoleculares entre cadenas de celulosa adyacentes hacen que se dispongan en paralelo 60-70 cadenas formando las microfibrillas (*Figura 13*). La matriz está compuesta por otros dos grupos principales de polisacáridos, llamados hemicelulosas y pectinas, y una pequeña cantidad de proteínas estructurales y puentes de iones calcio, que refuerzan la pared celular. Las microfibrillas de celulosa están interconectadas por hemicelulosas (como el xiloglucano o el arabinoxilano).

Existe otra red formada por polisacáridos pécticos (homogalacturonanos, ramnogalacturonanos I y II y arabinogalactanos) que actúan como matriz de interconexión y que contribuyen a la rigidez de la pared mediante enlaces por puentes de calcio entre las cadenas de homogalacturonano o entre los arabinogalactanos. Los polisacáridos pécticos son ricos en ácido D-galacturónico (GalA), L-ramnosa (Ram), L-fucosa, L-arabinosa, D-galactosa y D-glucurónico (*Figuras 14 y 15*) ([O'Neill y col., 1990](#); [Whitcombe y col., 1995](#)). Por otra parte, la célula totalmente diferenciada incluye una tercera capa debajo de la pared primaria denominada pared secundaria compuesta principalmente por polisacáridos estructurales tipo hemicelulosas, unidos mediante enlaces glucosídicos a las moléculas de celulosa y lignina que se entrecruzan para mantener las microfibrillas unidas reforzando la pared celular y determinando su rigidez y resistencia (*Figura 16*). La lignina es un polímero tridimensional amorfo constituido a partir de unidades fenilpropano que se unen entre sí por enlaces tipo alquil-aril-éter o carbono-carbono ([García y col., 1984](#)). Su estructura, composición y contenido relativo en el material lignocelulósico, dependen de las diferentes especies.

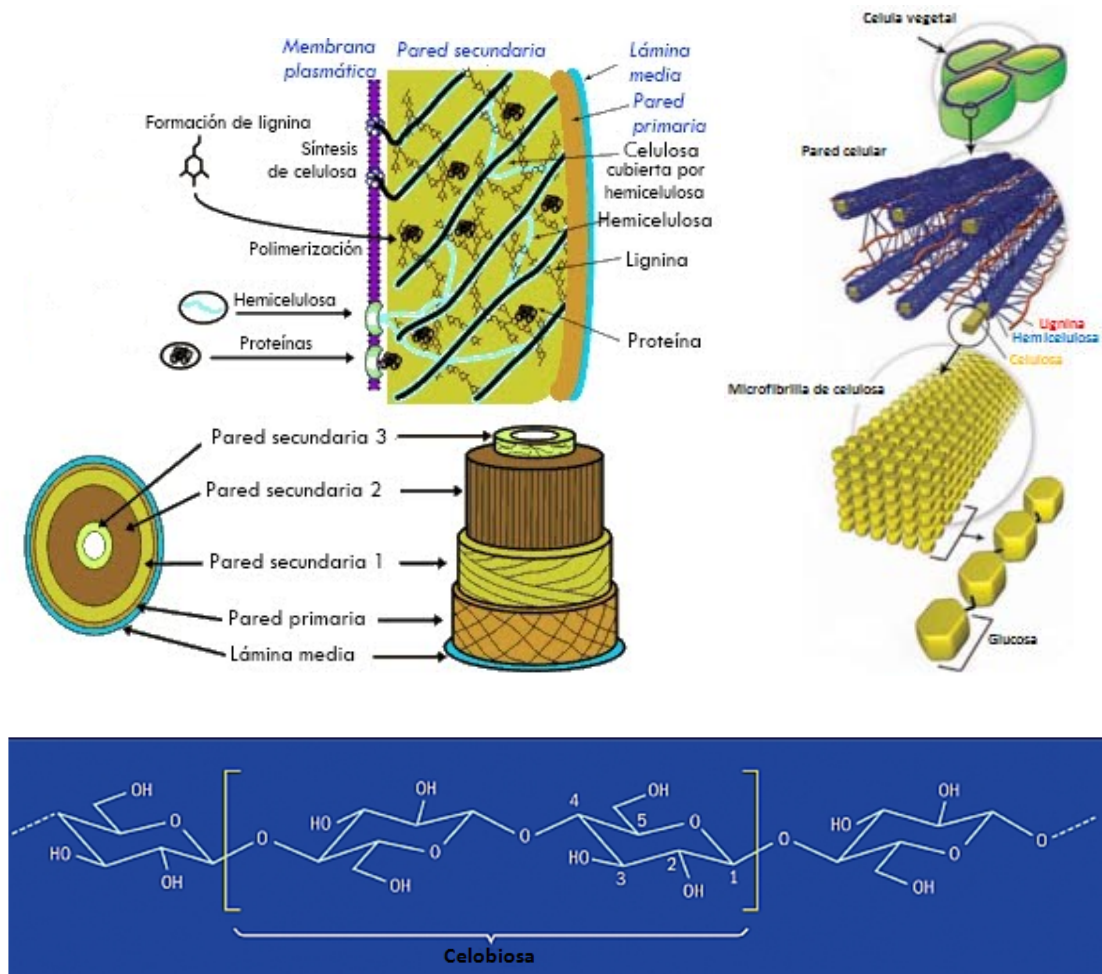


Figura 13. Modelo de la estructura de la pared celular vegetal (arriba a la izquierda) y asociación química en la misma: (abajo) la celulosa, indicando su unidad estructural básica, la celobiosa de 1 nm de longitud; (arriba a la derecha) estructura cristalina de las cadenas de celulosa en una microfibrilla.

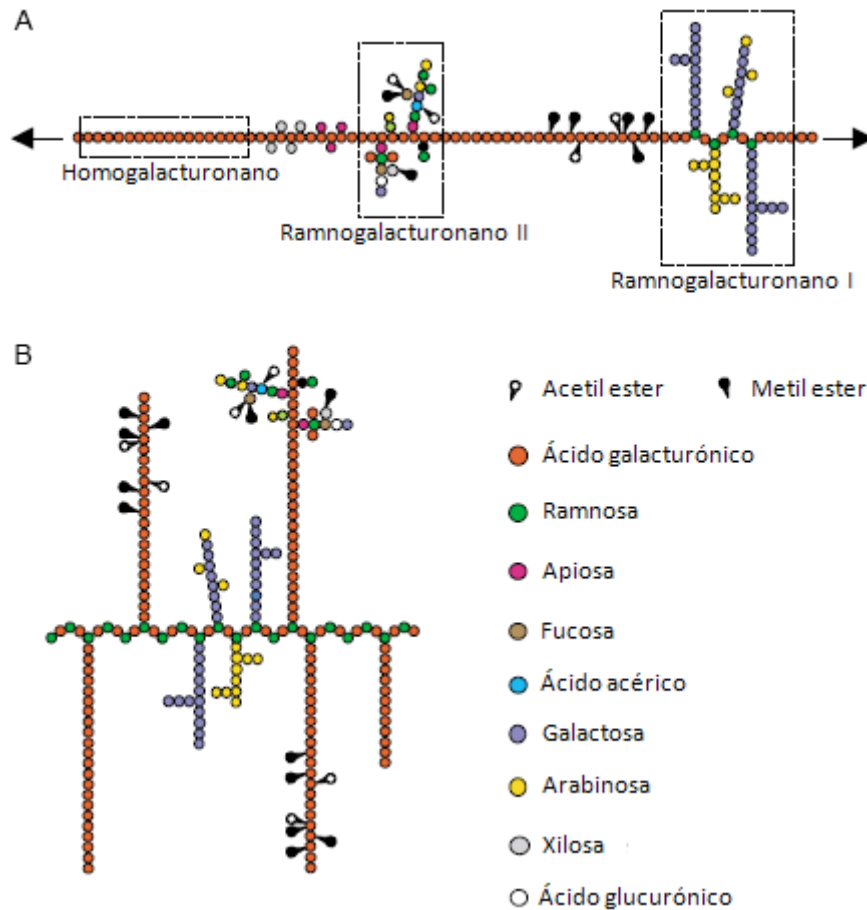


Figura 14. Estructura básica de pectina. Representaciones esquemáticas de las estructuras convencional (A) y otra alternativa propuesta (B) (Vincken y col., 2003). Los polímeros que se muestran aquí son solo algunos de los principales encontrados en la mayoría de las pectinas más que estructuras definitivas. Homogalacturonano es un polímero lineal formado por unidades de α -D-GalA enlazadas (1→4), mientras ramnogalacturonano I consiste en la repetición del disacárido $[-\rightarrow 4)-\alpha$ -D-GalA-(1→2)- α -L-Ram-(1→], al cual están unidas una variedad de diferentes cadenas de glicanos (principalmente arabinanos y galactanos) a los residuos de ramnosa. El denominado ramnogalacturonano II tiene, en realidad, un esqueleto de homogalacturonano, con cadenas laterales complejas unidas a las unidades de ácido galacturónico (Tomada de Willats y col., 2006).

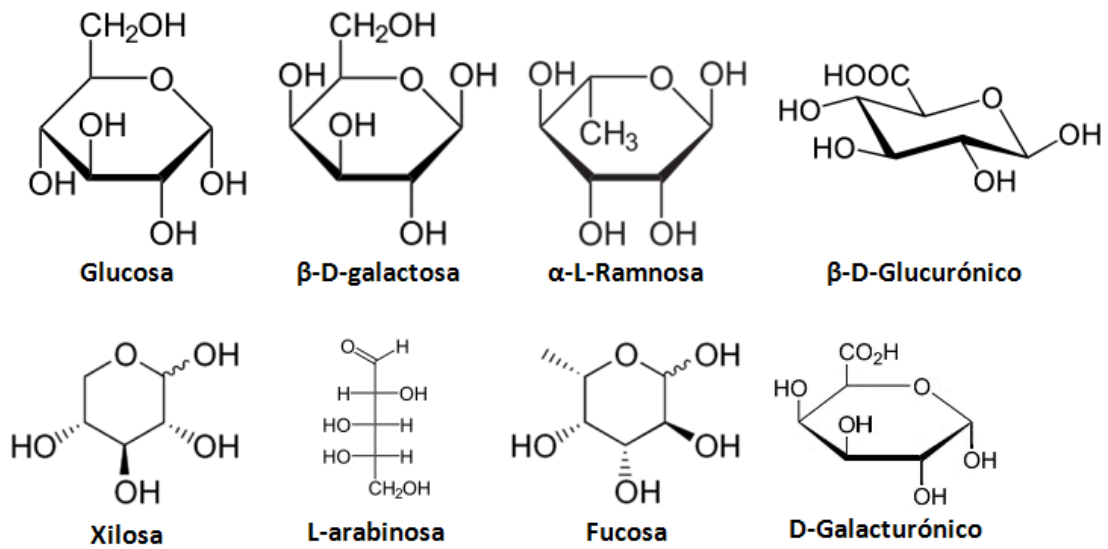


Figura 15. Algunos de los monómeros constituyentes de las paredes celulares vegetales.

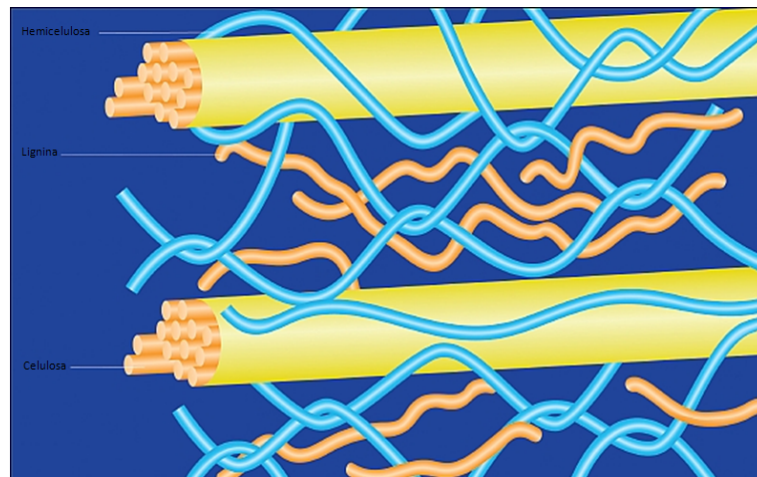


Figura 16. Sección en detalle mostrando fibras de celulosa embebidas en una matriz de hemicelulosa y lignina.

2.6.1.- Composición de los polisacáridos de la aceituna.

Los polisacáridos pécticos son importantes componentes de la pared celular vegetal de la aceituna ([Tabla 1](#)). Aunque la composición de las pectinas varía con las condiciones de extracción, el tipo de célula, la especie vegetal y otros factores, la característica estructural dominante de estos polisacáridos es una cadena lineal de unidades de ácido α -D-galacturónico enlazadas por enlaces (1 \rightarrow 4). Además, regiones de ramnogalacturonanos altamente sustituidos (esterificados) están presentes ([Voragen y col., 2001](#)). Estas regiones de ramnogalacturonanos pueden ser sustituidas con cadenas laterales de arabinanos, galactanos y arabinogalactanos de varias configuraciones y tamaños ([Carpita y Gibeaut, 1993](#)). Estas pectinas consisten de una parte importante de regiones de homogalacturonanos lineales, están esterificadas con grupos metilo (grado de metilación 56-65) y el grado de acetilación varía de 17-32. ([Vierhuis y col., 2003](#)). Los polisacáridos pécticos en aceituna también son ricos en arabinosa. Los resultados de análisis indican que los arabinanos tienen un relativo bajo grado de ramificación y están principalmente compuestos de unidades de arabinosa enlazadas (1 \rightarrow 5). Alrededor del 30 % de las unidades están sustituidas en la posición C-3. La cantidad relativa aumenta cuando se usan solventes más fuertes para extraer los polímeros pécticos ([Coimbra y col., 1994](#)). En extractos ricos en pectinas de aceituna se han encontrado dos tipos de galactanos. La mayoría de la unidades de galactosa parecen estar unidas mediante enlaces (1 \rightarrow 3)/(1 \rightarrow 6) ([O'Neill y col., 1990](#)). Pueden también presentarse como cadenas laterales unión covalente a ramnogalacturonanos o como homopolisacáridos separados ([Voragen y col., 1995](#)).

El material de la pared celular de la aceituna contiene además de material péctico considerables cantidades de hemicelulosas ([Huisman y col., 1996](#); [Vierhuis y col., 2000](#)). Los principales componentes hemicelulósicos en aceituna son los xilanos y los xiloglucanos ([Coimbra y col., 1994](#)). En general, la presencia de xilanos en la aceituna comestible es muy limitada porque estos polisacáridos están relacionados con el crecimiento secundario en la pared celular ([Jiménez y col., 2001a](#)). Los xilanos tienen un esqueleto de unidades de xilosa enlazadas en posición β -(1 \rightarrow 4), que pueden estar sustituidas con unidades de ácido glucurónico o su 4-O-metil derivado, unidades de arabinosa y grupos O-acetilo. Los xilanos presentes en aceituna muestran baja sustitución, menos del 10 % de las unidades de xilosa están monosustituidas en los carbonos 2 y 3 ([Vierhuis y col., 2000 y 2001b](#)). Los xiloglucanos son polisacáridos constituidos por una cadena lineal de unidades de glucosa enlazadas β -(1 \rightarrow 4) que pueden estar ramificadas / sustituidas en la posición 6 con unidades de xilosa mediante enlaces α -(1 \rightarrow 6). En aceituna se puede distinguir el siguiente patrón de ramificación, XXXG. Las letras "G" y "X" se refieren a unidades de glucosa no ramificada y un segmento xilosa-(1 \rightarrow 6)-glucosa, respectivamente. Estudios de degradación con endo-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucanasas revela la presencia de unidades de arabinosa unidas a xilosa en los xiloglucanos de la aceituna ([Vincken y col., 1997](#); [Vierhuis y col., 2001b y 2001c](#)). Los análisis de

los xiloglucanos de aceituna indican que están mono- y di-O-acetilados y que los grupos acetilos se localizan en las unidades de arabinosa.

Tabla 1. Composición de polisacáridos de la pared celular de la aceituna (tomada de [Vierhuis, 2002](#)).

Composición de la aceituna (%)	
Polisacáridos pécticos	39
<i>Galacturonanos</i>	20
<i>Arabinanos</i>	13
<i>Ramnogalacturonanos</i>	3
<i>Galactanos</i>	3
Xiloglucanos	15
Glucuronoxilanos	14
Mananos	2
Celulosa	30

2.6.2.- Propiedades fisiológicas de los oligosacáridos.

Actualmente, el consumo de alimentos que mejoran la salud y reducen el riesgo de enfermedades se ha popularizado entre los consumidores. En este sentido, se ha prestado especial atención a un tipo específico de carbohidratos dietéticos, los oligosacáridos no digeribles. El término “oligosacárido” está reservado normalmente para grados de polimerización comprendidos en el intervalo de 3-10 unidades de azúcar como son definidos según la nomenclatura IUB-IUPAC. Los oligosacáridos no digeribles son prebióticos y presentan importantes propiedades fisiológicas beneficiosas para la salud de los consumidores y, por esta razón, su uso como ingredientes en alimentos funcionales se ha incrementado rápidamente ([Mussatto y Mancilha, 2007](#)).

Los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles que actúan beneficiosamente en el organismo estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o varias especies de bacterias residentes en el colon, que puede modular funciones entéricas y proporcionar resistencia a cánceres colorectales. La ingesta de prebióticos puede modular significativamente la microflora del colon aumentando el número de bacterias específicas y cambiar así la composición de la microflora intestinal. Los oligosacáridos estimulan el crecimiento de las bifidobacterias endógenas, que, después de un corto periodo de alimentación, llegan a ser predominantes en las heces humanas. Los resultados sugieren que los xilooligosacáridos como suplementos dietéticos pueden ser beneficiosos para la salud gastrointestinal ([Hsu y col., 2004](#)). Las propiedades de fermentación *in vitro* de los oligosacáridos pécticos han sido estudiadas y se

han calculado velocidades de crecimiento más altas en varios géneros de bifidobacterias ([Olano-Martín y col., 2002](#)). Ciertos oligosacáridos no digeribles pueden ser selectivamente utilizados por varias especies de bifidobacterias y reducir el riesgo de cáncer de colon ([Pool-Zobel y col., 2002](#)). Los oligosacáridos pécticos han mostrado inducir apoptosis en células humanas del colon con adenocarcinoma ([Olano-Martín y col., 2003](#)). Además, los prebióticos modulan el metabolismo lipídico, muy probablemente vía productos de fermentación ([Gibson y Roberfroid, 1995](#)), provocan un aumento de la disponibilidad de minerales, tales como calcio y magnesio ([Younes y col., 1996](#)), y tienen un importante papel en el control de la diabetes. Sus efectos son favorables en la diabetes mellitus ([Kaufhold y col., 2000](#)).

Los efectos inmunomoduladores de preparaciones de oligosacáridos para el desarrollo de alimentos infantiles (combinaciones de galactooligosacáridos, fructooligosacáridos de cadena larga y oligosacáridos ácidos derivados de pectinas) sugiere que la aplicación de estos oligosacáridos en fórmulas infantiles será beneficioso para el desarrollo del sistema inmune del bebé ([Vos y col., 2007](#)).

Los oligosacáridos se asocian también con un menor riesgo de infecciones y diarreas. Debido a la disminución del pH intestinal causado por la fermentación, los oligosacáridos provocan una reducción de la flora patógena ([Bielecka y col., 2002](#)). Los oligosacáridos pécticos, por ejemplo, tienen la capacidad de inhibir la adhesión e invasión de patógenos del tracto gastrointestinal a células Caco-2 ([Ganan y col., 2010](#)).

2.6.3.- Producción de oligosacáridos con actividad prebiótica.

Los oligosacáridos no digeribles de varios tipos ([Tabla 2](#)) pueden ser encontrados como componentes naturales en múltiples alimentos (leche de vaca, remolacha, fécula, etc.) y obtenidos por extracción mediante procesos industriales a partir de sus fuentes naturales, hidrolizando polisacáridos (tales como almidón, inulina o xilanos) de forma controlada y por síntesis química y enzimática a partir de azúcares simples (tales como sucrosa o lactosa) mediante reacciones de transglucosilación ([Mussatto y Mancilha, 2007](#)). Con la excepción de la rafinosa y de los oligosacáridos de semilla de soja, producidos mediante extracción directa usando agua o soluciones acuosas de metanol o etanol, y lactulosa, producida por reacción de isomerización, los oligosacáridos (fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, maltooligosacáridos, etc.) son producidos usando procedimientos enzimáticos. [Olano-Martín y col., 2001](#) han producido en un reactor en continuo oligosacáridos pécticos de dos tipos obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática controlada de pectinas cítricas con alto (66 %) y bajo (8 %) grado de metilación.

A causa del rápido crecimiento de la industria de alimentos funcionales existe un interés creciente en los polisacáridos de las paredes celulares vegetales como fuentes de nuevos oligosacáridos prebióticos. En este contexto, por ejemplo, los xilooligosacáridos son producidos a

escala industrial a partir de materiales lignocelulósicos (paja, bagazos, maíz, etc.). Tres diferentes propuestas han sido utilizadas para la producción a partir de estos residuos: (a) fraccionamiento químico para aislar xilanos (o solubilizarlos), con posterior hidrólisis enzimática de este polímero a xilooligosacáridos; (b) tratamientos enzimáticos de los polisacáridos hemicelulósicos (xilanos) a xilooligosacáridos; y (c) degradación hidrolítica mediante procesos hidrotérmicos (o autohidrólisis) con vapor, agua o soluciones diluidas de ácidos minerales ([Garrote y col., 2003](#)). Apuntando en la línea de los procesos autohidrolíticos, el tratamiento térmico con vapor permitirá la recuperación de polisacáridos y oligosacáridos, disueltos a partir de los componentes de la pared celular de la aceituna, presentes en el alperujo. En trabajos previos se ha aislado una mezcla de oligosacáridos mediante cromatografía de exclusión molecular de la fracción líquida obtenida después del tratamiento térmico del alperujo. Los oligosacáridos estaban constituidos por unidades de xilosa y en menor proporción por arabinosa, glucosa y ramnosa ([Fernández-Bolaños y col., 2004](#)). El proceso de tratamiento con vapor del alperujo también ha permitido la recuperación de hemicelulosas de bajo peso molecular ([Rodríguez y col., 2007a](#)).

En general, los oligosacáridos producidos no son productos puros, sino mezclas conteniendo diferentes grados de polimerización, el polisacárido original, azúcares libres y otras impurezas no sacáridos (furfural, compuestos inorgánicos solubles, productos proteicos, etc.). Para obtener los oligosacáridos que puedan ser útiles para aplicaciones alimentarias se requiere alta pureza, los acompañantes en la mezcla de reacción necesitan ser eliminados. Pasos de purificación múltiples pueden ser necesarios para alcanzar una alta pureza. Varias técnicas han sido utilizadas para purificar los oligosacáridos. El fraccionamiento de los componentes de alto y bajo peso molecular en general es llevado a cabo mediante precipitación con soluciones alcohólicas ([Ku y col., 2003](#); [Moerman y col., 2004](#)), pero han sido también empleados acetona y 2-propanol.

La adsorción ha sido también usada en combinación con otros tratamientos para la purificación de licores que contienen oligosacáridos ([Sanz y col., 2005](#)), para la separación de los monosacáridos y la eliminación de compuestos indeseados, mientras que las resinas de intercambio iónico son útiles para desalinizar y eliminar otros compuestos indeseados ([Vázquez y col., 2005](#)). Sin embargo, las tecnologías de membranas, tales como la ultrafiltración y la nanofiltración, también resultan ser efectivas para la recuperación de oligosacáridos de cualquier naturaleza ([Pinelo y col., 2009](#)) y están ganando importancia en la tecnología de obtención, purificación y concentración de oligosacáridos ([Yang y col., 2003](#)). Por ejemplo, la ultrafiltración y la precipitación con etanol pueden ser utilizadas para el aislamiento de arabinoxilooligosacáridos con diferentes estructuras a partir de hidrolizados de arabinoxilanos producidos enzimáticamente ([Swennen y col., 2005](#)). Pasos secuenciales en membranas de ultrafiltración y nanofiltración se usan para la concentración y el fraccionamiento de oligosacáridos en procesos de purificación de varias fases ([Izumi y col., 2004](#)). Estudios relacionados con las técnicas de membranas han sido

descritos para la purificación de galactooligosacáridos y fructooligosacáridos por nanofiltración, eliminación de monosacáridos de fracciones de oligosacáridos de la miel, recuperación de oligosacáridos de la leche y la separación de oligosacáridos pécticos de pectinas hidrolizadas enzimáticamente, entre otros procesos ([Moure y col., 2006](#)).

Las técnicas de separación cromatográfica (de intercambio aniónico y de exclusión por tamaño) han sido empleadas para la purificación de los oligosacáridos a nivel analítico, proporcionando fracciones de alta pureza antes de la caracterización estructural, por ejemplo mediante HPLC-MS, RMN-¹H y ¹³C y MALDI-TOF, permitiendo la identificación y cuantificación de sustituyentes en los oligosacáridos, así como sus posiciones en la cadena y en los anillos ([Moure y col., 2006](#)).

Tabla 2. Oligosacáridos no digeribles con funciones bifidogénicas y comercialmente disponibles (tomado de [Mussatto y Mancilha, 2007](#)).

Oligosacáridos	Estructura molecular ^a	
Lactulosa	Gal-Fru	β-1,4
Lactosucrosa	Gal-Glc-Fru	β-1,4
Rafinosa	Gal-Glc-Fru	α-1,6
Galacto-oligosacáridos	(Gal) _n -Glc	β-1,4, β-1,6
Fructo-oligosacáridos	(Fru) _n -Glc	β-1,2
Oligosacáridos de soja	(Gal) _n -Glc-Fru	α-1,6
Isomalto-oligosacáridos	(Glc) _n	α-1,6
Xilo-oligosacáridos	(Xil) _n	β-1,4
Palatinosa-oligosacáridos	(Glc-Fru) _n	α-1,6
Glicosilucrosa	(Glc) _n -Fru	α-1,4
Malto-oligosacáridos	(Glc) _n	α-1,4
Ciclodextrinas	(Glc) _n	α-1,4 estructura cíclica
Gentio-oligosacáridos	(Glc) _n	β-1,6

^a Fru: fructosa; Gal: galactosa; Glc: glucosa; Xil: xilosa.

2.7.- Compuestos volátiles de la aceituna y el aceite de oliva.

El flavor (aroma y sabor) único del aceite de oliva se atribuye a los compuestos volátiles que se desarrollan durante y después de su extracción ([Kiritsakis, 1998](#)). Algunos de los volátiles encontrados en el aceite de oliva virgen están presentes en el tejido intacto de la aceituna, y otros se originan por la destrucción de la estructura celular durante la producción de dicho aceite debido a reacciones enzimáticas en presencia de oxígeno. Los compuestos volátiles en aceite de oliva son principalmente producidos por oxidación de los ácidos grasos (particularmente linoleico y α -linolénico), a través de la ruta metabólica de la lipoxigenasa y enzimas endógenas ([Figuras 17 y 18](#)), y generalmente se admite que son responsables de las percepciones positivas del aroma mientras que la oxidación química y enzimas exógenas, normalmente de la actividad microbiana, se asocian con defectos sensoriales ([Angerosa, 2002](#)). Otros precursores de compuestos volátiles son los aminoácidos leucina, isoleucina y valina ([Morales y Tsimidou, 2000](#)). El aroma característico del aceite de oliva, en particular, está formado por una mezcla de compuestos orgánicos que, por ser volátiles y estar presentes en muy bajas concentraciones, no ha podido ser estudiada hasta fechas recientes. La aplicación de la espectrometría de masas en conjunción con la cromatografía de gases en columnas capilares de gran resolución y con la aplicación de técnicas específicas de obtención de concentrados de aromas permite el análisis de este tipo de componentes en la actualidad. De estas investigaciones se deduce que el aceite de oliva tiene un aroma complejo, en el que han podido identificarse, por el momento, más de un centenar de componentes volátiles ([Alba, 2008b](#)).

Los compuestos volátiles son compuestos de bajo peso molecular (menos de 300 Da). Aldehídos, alcoholes, ésteres, hidrocarburos, cetonas, furanos y otros compuestos han sido identificados y cuantificados por CG-MS. El aroma es atribuido a estos compuestos y otros aún no identificados. Los principales compuestos volátiles descritos en aceites de oliva virgen son los compuestos de 5 y 6 átomos de carbono. Los aldehídos lineales saturados e insaturados, representan la fracción de compuestos volátiles más importante en el aceite de oliva. Hexanal, *trans*-2-hexenal, 1-hexanol y 3-metil-1-butanol se encuentran en la mayoría de los aceites de oliva vírgenes ([Figura 19](#)) ([Angerosa, 2002](#); [Aparicio y col., 1997](#)). Los ésteres butirato, isobutirato, 2-metilbutirato, 3-metilbutirato y ciclohexilcarboxilato de etilo son abundantes en aceites marroquíes ([Reiners y Grosch, 1998](#)). Según [Solinas y col., 1988](#), los contenidos de octanal, nonanal y 2-hexenal son característicos de la variedad, así como los alcoholes volátiles propanol, amilo alcoholes, 2-hexenol, 2-hexanol y heptanol, se relacionan con ella. 2-Pentanal y 2-heptenal se forman en aceites oxidados. Otros compuestos identificados son los cíclicos y acíclicos mono- y sesquiterpenos hidrocarburos como el α -pineno, (*E-E*)- α -farneseno, 1,8-cineol y limoneno ([Temime y col., 2006](#)). [Luna y col., 2006](#) han llevado a cabo la caracterización de 39 aceites de oliva vírgenes de 8 países productores por su composición volátil, cuantificando hasta 64 compuestos volátiles.

La variedad, región geográfica, madurez de la aceituna y los métodos de procesamiento son factores que influyen en la composición volátil del aceite de oliva ([Benincasa y col., 2003](#); [Prenzler y col., 2002](#)). La concentración más alta de componentes volátiles aparece en la etapa de madurez óptima del fruto. Durante el almacenamiento de la aceituna, componentes volátiles tales como aldehídos y ésteres, disminuyen.

Figura 17. *Rutas enzimáticas y químicas involucradas en la producción de los compuestos volátiles del aceite de oliva virgen (Adaptado de [Angerosa y col., 2004](#)).*

Figura 18. *Rutas metabólicas de la lipoxigenasa (LOX) involucradas en la producción de los compuestos volátiles de 5 y 6 átomos de carbono. Las siglas HPL, ADH y AAT corresponden a hidroperóxido liasa, alcohol deshidrogenasa y alcohol acetil transferasa (Adaptado de [Angerosa y col., 2004](#)).*

Propiedades y aplicaciones de los compuestos volátiles de la aceituna y el aceite de oliva

[Kubo y col., 1995](#) han evaluado la actividad antimicrobiana de los compuestos volátiles identificados en el destilado obtenido de un extracto de aceituna y aceite de oliva y algunos de sus compuestos puros han mostrado actividad antimicrobiana. La mayoría de estos compuestos (hexanal, nonanal, 1-hexanol, 3-hexanal, 2-heptanal y α -farneseno) ejercen actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos, entre ellos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Aspergillus niger*. Los compuestos volátiles del aceite de oliva exhiben actividad inhibitoria de la tirosinasa. Una serie de aldehídos α,β -insaturados, denominados (*E*)-2-alkenales, caracterizados a partir del aroma del aceite de oliva inhiben la oxidación de L-DOPA catalizada por tirosinasa de hongo. La tirosinasa es responsable del pardeamiento en vegetales y se considera perjudicial para la calidad del color de alimentos vegetales y bebidas. El oscurecimiento enzimático generalmente implica una pérdida de valores nutricionales y comerciales. La tirosinasa es también responsable de melanización en animales ([Kubo y Kinst-Hori, 1999](#)). Se ha estudiado la actividad antimicrobiana de aldehídos alifáticos volátiles [hexanal, (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-heptenal, (*E*)-2-octenal, nonanal, (*E*)-2-nonenal, (*E*)-2-decenal y (*E,E*)-2,4-decadienal] y algunos muestran actividad antibacteriana ([Bisignano y col., 2001](#)) y actividad antifúngica y anti-elastasa *in vitro*. Los aldehídos saturados no muestran actividad antibacteriana significativa, mientras que los aldehídos α,β -insaturados actúan sobre un amplio espectro y muestran similar actividad contra microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos. La actividad antifúngica de estos aldehídos de la aceituna justifica el uso del aceite de oliva en enfermedades de la piel y sugiere que estos compuestos naturales podrían ser agentes útiles en el tratamiento tópico de infecciones cutáneas fúngicas ([Battinelli y col., 2006](#)). El interés en el posible uso de compuestos volátiles para prevenir el crecimiento microbiano ha aumentado notablemente en respuesta a reducir o eliminar los aditivos químicamente sintetizados en alimentos. La aplicación de compuestos volátiles, tales como hexanal, (*E*)-2-hexenal, acetato de hexilo y otros para mejorar la caducidad y la seguridad de alimentos mínimamente procesados ([Lanciotti y col., 2004](#)) ha suscitado el interés en la recuperación de aromas naturales en la industria alimentaria ([Lipnizki y col., 2002](#); [Ribeiro y col., 2004](#)).

Aunque los compuestos volátiles han sido descritos en pulpa de aceituna fresca, pastas molidas y batidas ([Figura 19](#)) y en el aceite de oliva ([Flamini y col., 2003](#); [Servili y col., 2007](#)), con respecto a la composición volátil del alperujo ninguna investigación ha sido llevada a cabo por el momento. Consecuentemente, el estudio y recuperación de la fracción volátil como posible fuente de compuestos bioactivos puede contribuir a revalorizar este subproducto y suponer un paso más en su aprovechamiento integral.

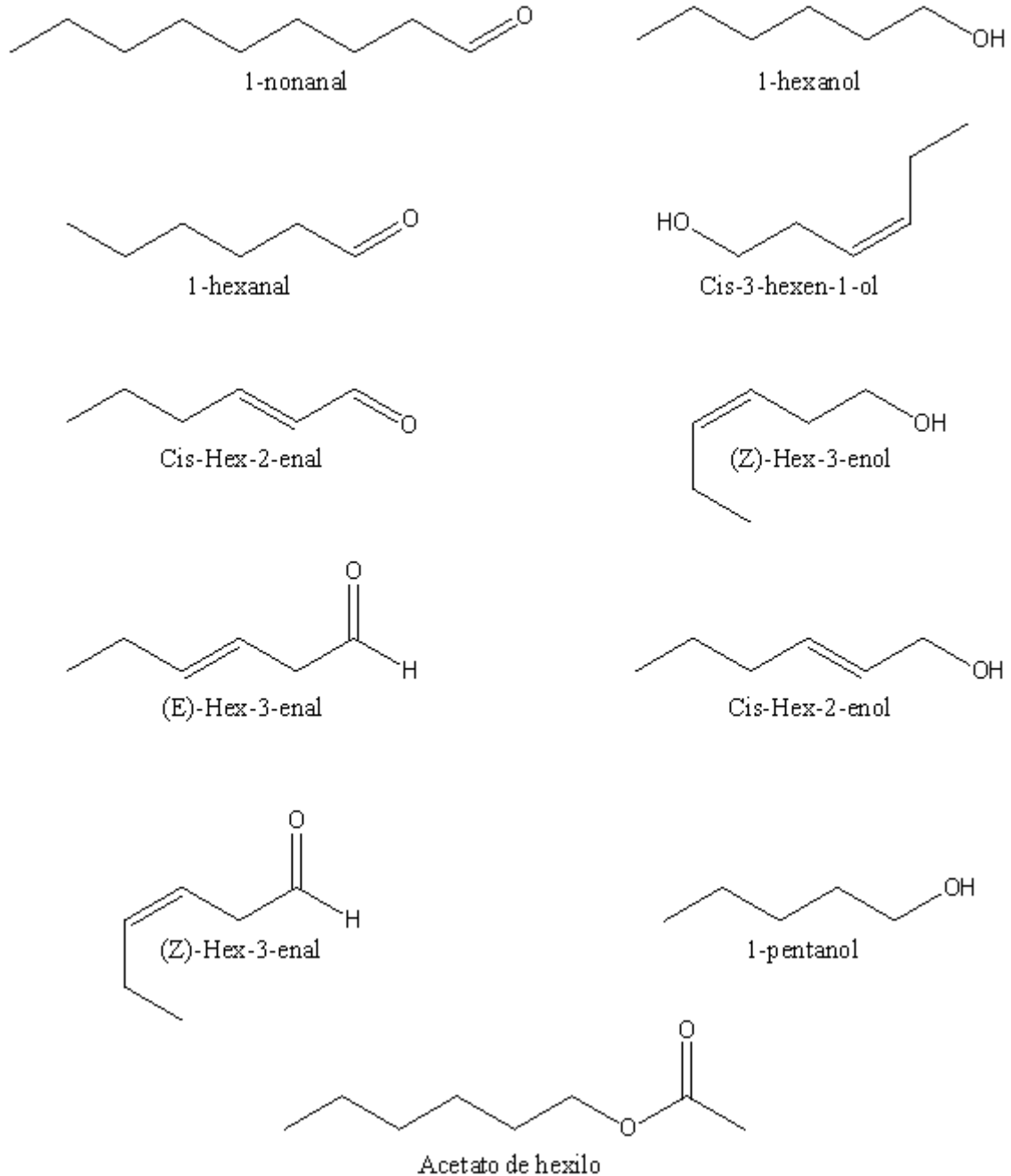


Figura 19. Estructuras químicas de algunos de los compuestos volátiles identificados en pulpa fresca y pastas molidas y batidas de aceituna.

3.- OBJETIVOS.

El objetivo principal es ampliar y adecuar la utilización total del alperujo después de un nuevo tratamiento térmico. Las investigaciones previas en el uso y aprovechamiento integral del alperujo mediante el sistema de tratamiento con vapor “steam explosion” han permitido un fraccionamiento eficaz de dicho subproducto y la recuperación de algunos compuestos bioactivos, como el hidroxitirosol. Una vez demostrada la eficacia del sistema, el paso siguiente es la adecuación del pretratamiento para responder a las exigencias técnicas de las orujeras y facilitar su implementación industrial. Para ello se ha diseñado un nuevo reactor de tratamiento térmico que opera en condiciones más suaves de presión y temperatura y menos oxidantes que el actual “steam explosion” y permite una recuperación más efectiva de compuestos de interés. Para llevar a cabo el objetivo principal se desarrollarán los siguientes objetivos más específicos:

1. Estudiar los efectos del tratamiento térmico con el nuevo reactor sobre el alperujo.

Se realizarán una serie de tratamientos teniendo en cuenta el tiempo y la temperatura como variables principales y sus efectos sobre la separación sólido-líquido, la solubilización de compuestos fenólicos (DHFG, hidroxitirosol, glucósido de hidroxitirosol y tirosol), la reducción de sólido y el enriquecimiento graso. Se pondrá en marcha el sistema de recogida de compuestos volátiles.

2. Analizar los compuestos presentes y recuperados en los distintos extractos.

Se procederá a identificar, cuantificar y caracterizar los compuestos bioactivos en las tres fracciones obtenidas tras el tratamiento térmico (acuosa, sólida y volátil).

2.1. Oligosacáridos.

En la fracción acuosa se obtendrán oligosacáridos de bajo grado de polimerización (DP 2-9), con posible actividad prebiótica, mediante tratamientos químicos y enzimáticos. Estos serán aislados y purificados mediante técnicas de precipitación, ultrafiltración y cromatográficas para su posterior caracterización (HPLC-DAD, ESI-MS, RMN de ^1H y ^{13}C y HPLC-ESI-MS/MS).

2.2. Aceite de orujo.

En el aceite de orujo extraído de la fase sólida se analizará el efecto del tratamiento térmico sobre la evolución del contenido en componentes menores de la fracción insaponificable (alcoholes grasos, esteroides, escualeno, tocoferoles y ácidos y alcoholes triterpénicos).

2.3. Compuestos volátiles.

Para el análisis de los compuestos volátiles se recurrirá a las técnicas de microextracción en fase sólida y a la CG-MS para la identificación y cuantificación. Será la primera vez que se estudien los compuestos volátiles a partir de los alperujos.

2.4. 3,4-dihidroxifenilglicol

Se estudiará su solubilización con la severidad del tratamiento térmico. Se optimizarán las condiciones en el nuevo reactor y se comparará con métodos ordinarios de extracción de compuestos fenólicos. Como posible fuente industrial y principal fuente nutricional se cuantificará su contenido en aceitunas de mesa. Después se diseñará un sistema para su purificación a nivel de laboratorio que posibilite posteriormente su implementación a nivel de planta piloto y permita por primera vez purificar el compuesto en grandes cantidades con una elevada pureza.

Se determinarán ciertas propiedades biológicas tales como la capacidad antioxidante del DHFG en matrices lipídicas mediante el método Rancimat, su capacidad para inhibir las reacciones de peroxidación u oxidación primaria y secundaria de una emulsión de ácido linoleico y los efectos de este compuesto sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP, colágeno y TRAP.

4-. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1.- Materias primas.

4.1.1.- Alperujo.

Las muestras de alperujo almacenado, un subproducto semisólido muy húmedo de las almazaras obtenido durante la extracción del aceite de oliva a partir del sistema de centrifugación de dos fases, han sido suministradas por la industria orujera Oleícola El Tejar (Córdoba, España) (*Figura 20*). Estas muestras de alperujo tenían un alto porcentaje de humedad (65-70 %), estaban parcialmente deshuesadas (10-18 % de hueso referido a materia seca), desgrasadas (después de un segundo proceso de centrifugación para obtener el aceite residual) y llevaban almacenadas un cierto periodo de tiempo. El alperujo se ha tomado en tres fechas distintas de dos campañas de la producción de aceite de oliva (2005-2006 y 2006-2007), en Noviembre, Enero y Marzo, al principio, a mediados y final de campaña, respectivamente. Otra muestra se recogió en Febrero de 2008. Las muestras de alperujo fresco (no almacenado ni sometido a un segundo proceso de centrifugación) se obtuvieron en Noviembre (aceitunas de la variedad Arbequina) y Diciembre de 2007 (aceitunas de la variedad Martaña) y Febrero de 2009 (aceitunas de la variedad Picual) a partir de los procesos de extracción industrial del aceite de oliva virgen en la almazara experimental del Instituto de la Grasa (C.S.I.C.) (Sevilla, España). Estas muestras de alperujo se tomaron directamente a la salida de la centrífuga horizontal del proceso de extracción de dos fases y no estaban deshuesadas (35-50 % de hueso referido a materia seca). Todas las muestras se conservaron a -20 °C hasta el momento de su uso. Los alpechines industriales, obtenidos mediante centrifugación de alperujos sometidos a un tratamiento térmico suave (del que no se conocen datos ni detalles), han sido suministrados por la cooperativa Oleícola El Tejar.



Figura 20. Muestra de alperujo procedente de “Oleícola El Tejar” (Córdoba, España), y detalle a la derecha.

4.1.2.- Aceitunas de mesa.

Se ha estudiado el contenido fenólico de 32 muestras de aceitunas de mesa, algunas procedentes de cultivo ecológico, pertenecientes a ocho variedades diferentes de España y dos importantes variedades de Grecia, enlatadas o en botes de vidrio, adquiridas en supermercados locales de Sevilla. Las muestras han sido seleccionadas según la disponibilidad y fecha de envasado. Los estilos, variedades y presentaciones comerciales de cada tipo de aceituna se presentan en la [Tabla 3](#). Todas las muestras estaban procesadas sin tratamiento alcalino, la mayoría por fermentación natural en salmuera según el estilo griego para aceitunas negras sin tratar; las aceitunas se colocan en una solución de salmuera y la fermentación puede llevarse a cabo en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. En el sistema tradicional o anaeróbico, la fermentación natural es principalmente realizada por levaduras, debido a la alta concentración de sal usada (5-10 %) ([Pereira y col., 2006](#)). Además, también se han estudiado aceitunas verdes y de color cambiante naturales en salmuera.

Las variedades Empeltre y Cuquillo se destinan principalmente a la obtención de aceite, pero también se utilizan cada vez más en aderezo. Empeltre es la variedad más extendida en la comunidad de Aragón o comarcas del Bajo Aragón. Kalamata es la segunda variedad más importante en Grecia principalmente usada para la producción de aceitunas de mesa en salmuera. Las aceitunas Kalamata son un tipo especial de aceitunas negras naturales al estilo griego. Son producidas por tratamiento con salmuera durante 5-8 días (el líquido se cambia dos o tres veces cada día) y preservadas en aceite de oliva virgen y vinagre ([Blekas y col., 2002](#); [Garrido y col., 1997](#)). Las variedades Manzanilla y Hojiblanca son muy utilizadas en España para la producción de aceitunas de mesa para aderezo verdes, al estilo español, o maduras al estilo californiano. Las aceitunas de mesa Thassos son aceitunas negras (completamente maduras) naturales o sin tratar. Se disponen en cestas alternando con capas de sal seca. El tratamiento causa la deshidratación y las aceitunas quedan arrugadas ([Bianchi, 2003](#)).

4.1.2.1.- Determinación de los compuestos fenólicos del jugo de aceitunas.

La pulpa de aproximadamente 50 g (10-20 aceitunas) de cada muestra de aceitunas ha sido separada del hueso mediante una deshuesadora manual, y pesados por separado para estimar la relación pulpa/hueso. La pulpa se tritura en un homogeneizador Ultra-Turrax T25 (IKA Werke, Staufen, Alemania) e inmediatamente se liofiliza para la determinación de la humedad. Los compuestos fenólicos se analizaron en la salmuera y en el jugo de la pulpa de las aceitunas mediante extracción acuosa en condiciones suaves. De 5 a 10 g de pasta de pulpa homogénea se mezclan con 15 mL de agua. Después de 30 minutos de agitación a temperatura ambiente, la mezcla se centrifuga a 12000 rpm durante 10 minutos. La fase acuosa se separa del aceite con una pipeta y se centrifuga de nuevo a 12000 rpm, durante 5 minutos. El sobrenadante de esta segunda centrifugación se filtra a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm. Una

alícuota de 20 μ L se usa para el análisis de los fenoles mediante HPLC. Todas las extracciones se han realizado por duplicado. Las salmueras se han analizado directamente después de una centrifugación a 12000 rpm y posterior filtración a través de 0,45 μ m. El procedimiento para el análisis de los compuestos fenólicos ha sido el mismo en jugo y salmuera.

Tabla 3. Características de las 32 muestras de aceitunas de mesa producidas por el método tradicional, y analizadas en el presente trabajo.

Muestra	Variedad	Tipo y procesamiento	Estilo y características
1E-6E	Empeltre		Cultivo ecológico. En salmuera y aderezadas con vinagre
7E	Empeltre	Negras de Aragón en salmuera	Paté
8E-10E	Empeltre		Sin líquido
11E-12E	Empeltre		Aderezadas con aceite de oliva virgen, ajo, cebolla, orégano, tomillo y pimentón
13K-15K	Kalamata	Negras en salmuera	Rajadas y aderezadas con aceite de oliva virgen y vinagre
16T-20T	Thassos	Negras sal seca	Arrugadas sin líquido
21C-23C	Cuquillo	Negras en salmuera	Aderezadas con hierbas aromáticas y vinagre
24Co	Cornicabra	Negras en salmuera	Rajadas y aderezadas con hierbas aromáticas y vinagre
25H	Hojiblanca	Negras en salmuera	Aderezadas con hierbas aromáticas y vinagre
26H	Hojiblanca	De color cambiante en salmuera	Cultivo ecológico. Aderezadas con comino, orégano, pimiento rojo y vinagre
27A	Aloreña	De color cambiante	Machacadas y aderezadas con hierbas aromáticas y pimentón
28A	Aloreña	De color cambiante	Machacadas y aderezadas con hierbas aromáticas y vinagre
29Ma	Marteña	De color cambiante en salmuera	Rajadas y aderezadas con vinagre y finas hierbas aromáticas
30Mz	Manzanilla	De color cambiante en salmuera	Cultivo ecológico. Aderezadas con ajo, orégano y vinagre
31Mz	Manzanilla	Verdes en salmuera	Aderezadas con hierbas aromáticas
32V	Verdial	Verdes en salmuera	Cultivo ecológico. Aderezadas pimiento rojo, ajo y vinagre

4.2.- Reactivos y disolventes.

Para el análisis de compuestos fenólicos se ha usado 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) y tirosol, que han sido suministrados por Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.), hidroxitirosol purificado obtenido mediante el sistema patentado por [Fernández-Bolaños y col., 2002b](#), y verbascósido que ha sido proporcionado por Extrasynthese (Genay Cedex, Francia).

Para la determinación de los componentes menores de los aceites de orujo se ha necesitado ácido betulínico, 5 α -colestano-3 β -ol, 1-eicosanol, escualano, laurilaraquidato, α , β y γ -tocoferol, trioleína y Sudan I, todos ellos suministrados por Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.). Ácido acético glacial, almidón soluble, cloroformo, etanol, éter etílico, hidróxido potásico, 2-propanol, sulfato sódico anhidro, tiosulfato sódico y yoduro potásico, de calidad para análisis, han sido proporcionados por Panreac (Barcelona, España). El reactivo de silanización formado por una solución comercial mezcla de hexametildisilazano, trimetilclorosilano y piridina 3:1:9 (v/v/v) ha sido adquirido a Supelco Co. (Bellefonte, PA, EE. UU.).

La hidrólisis química de polisacáridos ha requerido de ácido trifluoroacético (TFA), adquirido a Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.). En los tratamientos enzimáticos se ha usado Olivex (una preparación enzimática pectinolítica comercial usada en la industria del aceite de oliva), pectinesterasa, poligalacturonasa y pectinliasa proporcionadas por Novo Nordisk (Bagsværd, Dinamarca) y endo-poligalacturonasa de *Aspergillus niger* en sulfato amónico 3,2 M (2500 U/mL) de Megazyme (Wicklow, Irlanda). Para la identificación, cuantificación y determinación (colorimétrica, por HPLC y CG) de la composición de oligosacáridos se ha usado glucosa, galactosa, manosa, xilosa, arabinosa, fucosa, ramnosa, la familia de la maltosa (DP 2-7) y la celobiosa (DP 3-6), los ácidos urónicos glucurónico y mono-, di- y trigalacturónico, *p*-aminobenzoato de etilo (ABEE), cianoborohidruro sódico, borohidruro sódico, anhídrido acético, 1-metilimidazol, antrona, tetraborato sódico y *m*-hidroxibifenilo, todos ellos han sido adquiridos a Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.).

Para el análisis de los compuestos volátiles, los reactivos usados para la preparación de soluciones estándar (acetato de etilo, 1-propanol, benzaldehído, 3-metilbutanol, 2-butanol, 2-butanona, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, acetato de hexilo, hexanoato de metilo, nonanal, octanal, butirato de etilo, 2-furaldehído, decanal, decanoato de etilo, 1-hexanol, 2-metil-1-butanol, 3-metilbutanal y 2-metilpropanal) han sido obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Una solución madre de *n*-alcanos C₆ a C₁₅ de concentración 10 μ g/mL en diclorometano se ha usado para determinar los IRL de los compuestos.

Para la determinación de la capacidad antioxidante del DHFG en matrices lipídicas se ha utilizado butil hidroxitolueno, 2,2'-azobis-(2-metil-propionamida) diclorhidrato (ABAP), ácido linoleico, ácido tiobarbitúrico, ácido tricloroacético, *n*-butanol, tiocianato amónico y cloruro de hierro

(II), suministrados por Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.), mientras que Merck (Darmstadt, Alemania) ha suministrado el dodecilsulfato sódico (SDS).

Otros disolventes empleados como acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, diclorometano, éter etílico, metanol, *n*-heptano, *n*-hexano y tetrahidrofurano para cromatografía o grado HPLC marca ROMIL han sido suministrados por Teknokroma (Barcelona, España). El agua para cromatografía se ha obtenido de un sistema de agua ultrapura Milli-Q⁵⁰ de Millipore (Bedford, MA, EE. UU.).

4.3.- Uso de un nuevo reactor para el tratamiento integral del alperujo.

En el presente trabajo de tesis, se han evaluado los efectos del tratamiento hidrotérmico del alperujo en un nuevo reactor de tratamiento con vapor de agua saturado sobre la separación de sus fases sólida y líquida, la liberación y solubilización de algunos compuestos fenólicos (DHFG, hidroxitirosol, glucósido de hidroxitirosol y tirosol) y carbohidratos, la composición de compuestos volátiles, la reducción de sólido, el enriquecimiento graso y la composición de los componentes menores de los aceites extraídos.

Descripción del equipo.

Los tratamientos térmicos del alperujo se han llevado a cabo en un nuevo reactor de tratamiento con vapor a escala planta piloto, prototipo diseñado por nuestro grupo de investigación y construido por la empresa C. GIL, S. A. (Barcelona, España). Se trata de un reactor discontinuo de 100 L de capacidad nominal, de construcción cilíndrico vertical y material de acero inoxidable INOX-316L, que permite el tratamiento del alperujo a una temperatura máxima de 190 °C y a una presión de hasta 1,2 MPa (*Figura 21*), en condiciones térmicas más suaves y menos oxidantes que las que se consiguen con el reactor “steam explosion” que se ha utilizado para los tratamientos térmicos de mayor severidad y que se describe más adelante. Su mayor capacidad ha de contribuir significativamente a la obtención de aquellos compuestos de interés que se encuentren en bajas concentraciones en el alperujo y que, en consecuencia, necesiten de una mayor cantidad para su concentración. Debido a su diseño, el reactor se puede adaptar con facilidad a las industrias orujeras encargadas del procesamiento del alperujo, en las cuales es habitual trabajar con presiones de esta magnitud. La instalación del reactor se realizó en una bancada junto a la caldera de producción de vapor del reactor “steam explosion” y con conexión a la misma. El reactor está provisto de una camisa y un serpentín (de media caña) para el enfriamiento y calentamiento con agua y vapor. La entrada de vapor está protegida contra sobrepresión por una válvula de seguridad tarada a una presión de 1,2 MPa. El reactor incorpora dispositivos accesorios de control y sistemas auxiliares: entre otros, un cuadro eléctrico, una válvula para nitrógeno y una tubería destinada a la recuperación de compuestos volátiles en dos condensadores provistos de válvulas de descarga; el primero, tipo haz tubular que utiliza el agua como agente de refrigeración; y el segundo, un condensador de cubeta que usa un enfriador eléctrico hasta -40 °C Neslab CC-100 (Thermo Scientific, Waltham, EE. UU.). Los compuestos volátiles pueden ser arrastrados con ayuda de una bomba de vacío que se conecta a una válvula al final de la línea en el condensador de cubeta, impulsados con nitrógeno o desplazados por el vapor de agua generado para el calentamiento directo.



Figura 21. Fotografías y esquema del nuevo reactor de tratamiento con vapor del Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa (C.S.I.C.), Sevilla, utilizado en el presente trabajo de investigación. En el esquema (arriba a la derecha) pueden verse todos los componentes y sistemas auxiliares del reactor. Arriba a la izquierda el reactor enclavado en la nueva bancada junto a la caldera y el reactor steam explosion. Detalle de los condensadores (abajo a la izquierda) y de la boca de carga y de las líneas de vapor, volátiles, nitrógeno, agua y aire comprimido (abajo a la derecha).

Carga del alperujo.

La alimentación del reactor con alperujo se realiza manualmente por la parte superior a través de una boca de carga. Se efectúa de forma que se distribuya uniformemente en el interior del reactor. Se comprueba que la tapa y la válvula de descarga del reactor están correctamente cerradas. Los tratamientos se han realizado sobre muestras de 20-30 kg de alperujo, fresco y almacenado.

Calentamiento y operación a régimen.

El calentamiento por vapor se realiza de tres maneras:

1. Inyección directa de vapor al alperujo (*Figura 22*) mediante un anillo perforado para la salida del vapor ubicado en el fondo del reactor y asegurar un contacto íntimo entre el vapor y el alperujo a calentar.
2. De manera indirecta por medio de la camisa, transmitiendo el calor a través de las paredes del reactor al alperujo, y con inyección directa de nitrógeno para homogeneizar la masa de alperujo e impulsar los compuestos volátiles hacia los condensadores;
3. Y una combinación de las dos anteriores.

La línea de vapor está revestida de lana de vidrio que proporciona el aislamiento térmico apropiado. En el modo de calentamiento directo la temperatura se controla manualmente mediante el presostato de la caldera y regulando el paso de vapor con la válvula general de entrada. El control de la temperatura en la manera indirecta es automático por medio de una válvula de vapor con accionamiento neumático. El vapor que condensa en la camisa del reactor en el modo de calentamiento indirecto se retira de forma continua abriendo una válvula de condensados. El calentamiento se consigue en un intervalo de tiempo comprendido entre 10 y 20 minutos en función de la cantidad de alperujo y la temperatura que se desee alcanzar. Los tratamientos se han realizado en intervalos de temperatura comprendidos entre 150 y 170 °C y tiempos de tratamiento de 15 a 90 minutos combinando con los tres modos de calentamiento, comprobándose el buen funcionamiento del reactor y sus sistemas de control. Las variables presión, tiempo y temperatura se almacenan mediante un sistema de recogida y exportación de datos a tablas Excel. El panel de operación muestra un diagrama de la instalación con indicación de los valores de presión y temperatura (*Figura 22*).



Figura 22. *Fotografías del interior del cuerpo del reactor con la entrada de vapor en el fondo (izquierda) y del cuadro eléctrico y panel de operación y control (derecha) que muestra un sinóptico o menú principal que permite acceder a las funciones de control de la temperatura y la presión, con indicadores de estado de maniobra e histórico o registro de valores.*

Enfriamiento del reactor y descarga del alperujo.

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, se procede al paro de la caldera, se cierra la válvula general de vapor, y se abre la válvula de entrada de agua corriente a la camisa del reactor. Se deja enfriar hasta que la temperatura en el interior disminuya por debajo de los 50 °C y se libera la presión abriendo una válvula de descompresión. Cuando en el reactor se alcanza la presión atmosférica y el alperujo se ha enfriado se puede proceder a la descarga. El alperujo tratado se recupera sin necesidad de una descompresión brusca, eliminando la complejidad técnica del sistema “steam explosion”, abriendo una válvula de descarga situada en la parte inferior. Después de descargar el alperujo, se procede a la inspección y limpieza del reactor. Con agua se arrastran los restos de alperujo fuera del reactor, donde se transfiere a un depósito de decantación. Esta agua adicional necesaria se deberá contabilizar.

Para la separación de las fases sólida y líquida, y dado el volumen de alperujo húmedo que se obtiene, se recurre a un equipo de filtración con presión de aire comprimido y/o a una centrífuga de eje vertical (*Figura 23*) de 20 kg de carga máxima en una cesta de filtración de fibra de polipropileno y velocidad variable por convertidor de frecuencia de 1450 rpm adquirida a la empresa Comteifa, S. L. (Barcelona, España). La carga se realiza en modo continuo durante el funcionamiento a través de un tubo de alimentación que permite un relleno uniforme sobre toda la altura de la cesta. El secado del alperujo se completa en estufa a 50 °C para calcular la reducción de sólido. Por otra parte se mide el volumen de fase acuosa y se almacena una alícuota a -20 °C hasta los análisis.



Figura 23. Fotografías (de izquierda a derecha) del depósito de decantación, en donde se observa la separación de las fases, el equipo de filtración y la centrífuga.

4.4.- Tratamientos térmicos para el análisis y máxima recuperación de DHFG e hidroxitirosol.

Se han estudiado también las condiciones óptimas de tratamiento térmico (temperatura, tiempo) sobre el alperujo, con fines analíticos, para lograr cuantificar la máxima cantidad de DHFG e hidroxitirosol, mediante la aplicación de tratamientos térmicos a bajas y altas temperaturas (50-120 °C y 180-240 °C, respectivamente).

4.4.1.- Tratamientos térmicos a bajas temperaturas (cuantificación de DHFG). Comparación con métodos habitualmente usados para la extracción de compuestos fenólicos.

Los tratamientos hidrotérmicos de menor severidad del alperujo se han llevado a cabo a temperaturas comprendidas entre 50 y 90 °C durante 1 a 4 horas en un baño termostatzado de laboratorio con agitación lenta. A 25 g de alperujo se añadió agua en una relación 1:5 (peso/volumen) y se sometió a dichos tratamientos. El alperujo también se ha introducido en un autoclave a 120 °C durante 1 hora manteniendo la relación 1:5 (peso/volumen).

La extracción acuosa a baja temperatura de alperujo se ha comparado con un procedimiento habitualmente utilizado para la extracción de los compuestos fenólicos, que usa una solución metanol/agua y está basado en el método de [Servili y col., 1999](#). Se extractaron 25 g de muestra de alperujo fresco 6 veces con 30 mL de una solución metanol/agua 80:20, v/v. El extracto se concentró a vacío a 30 °C hasta eliminar el metanol y se llevó a un volumen de 25 mL con agua.

4.4.2.- Tratamientos térmicos de explosión con vapor o “steam explosion” (cuantificación de hidroxitirosol).

Las condiciones más severas de tratamiento con el reactor steam explosion han sido propuestas como método cuantitativo para la evaluación del contenido total de hidroxitirosol (tanto libre como conjugado al núcleo secoiridoide) en alperujo ([Fernández-Bolaños y col., 2002a](#)) y se llevaron a cabo con el propósito de una medida de la efectividad de los tratamientos con el nuevo reactor. Los tratamientos térmicos analíticos más severos del alperujo se realizaron en una unidad construida a escala piloto, diseñada por nuestro grupo de investigación en colaboración con la empresa de ingeniería Nusim, S. A. (Madrid, España) e instalada en el Departamento del Instituto de la Grasa (C.S.I.C.). La unidad está basada en la tecnología Masonite, y equipada con una cámara de reacción de 2 L de capacidad y una caldera de producción de vapor diseñada para alcanzar una presión máxima de operación de 4,1 MPa ([Figura 5](#)). El reactor “steam explosion” se carga con 250 g de muestra húmeda y se calienta a 180-240 °C con vapor saturado durante 5

minutos. Adicionalmente, se estudiaron los efectos de la acidificación previa del sustrato. El alperujo se acidificó mediante impregnación con soluciones de ácido sulfúrico o fosfórico 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 % (volumen/volumen), teniendo en cuenta el contenido de humedad de la muestra. Las variables temperatura y tiempo de reacción aplicadas en el presente estudio se seleccionaron basándose en la liberación de hidroxitirosol ([Fernández-Bolaños y col., 2002a](#)). Estas variables, fijadas manualmente, se regulan mediante un dispositivo de control automático; el tiempo es controlado por el automatismo programable y la temperatura por la presión de vapor saturado suministrada por la caldera. El alperujo tratado se recuperó mediante una válvula de bola de apertura rápida que permite una descompresión explosiva del material en una cámara de expansión. Después de cada tratamiento térmico, el material húmedo se filtró a través de papel de filtro usando un embudo Buchner para la separación sólido-líquido y la recuperación del extracto acuoso (en donde se solubilizan los compuestos fenólicos) para su posterior análisis.

4.5.- Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC.

Todas las alícuotas de los extractos acuosos de las pulpas de las aceitunas y de los obtenidos después del tratamiento hidrotérmico del alperujo, así como las salmueras, se filtraron a través de una membrana de 0,45 μm y se inyectaron directamente en HPLC para la determinación de los compuestos fenólicos. El análisis se llevó a cabo usando un sistema de cromatografía líquida HP (Hewlett-Packard serie 1100 equipado con un detector de diodo array y una válvula de inyección Rheodyne con un loop de 20 μL). La columna cromatográfica usada fue una Spherisorb ODS-2 fase reversa (250 x 4,6 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula) de Teknokroma (Barcelona, España) mantenida a temperatura ambiente (25 °C) con una precolumna de la misma fase. Los eluyentes fueron agua milli-Q (pH ajustado a 2,5 con ácido trifluoroacético 20 mM) y acetonitrilo grado HPLC. El método de elución consiste en un gradiente lineal que pasa de 5 a 25 % de acetonitrilo en 30 minutos. El tiempo de equilibrio ha sido de 5 minutos y la velocidad de flujo de 1,0 mL/min. Los cromatogramas se registraron a 280 nm y la identificación de los compuestos se ha realizado por comparación de los tiempos de retención con los de los compuestos de referencia y mediante el registro del espectro de ultravioleta en el intervalo 190-400 nm usando el detector de diodo array. Para el sistema de calibración se empleó el método del patrón externo. Soluciones acuosas individuales de DHFG, hidroxitirosol, glucósido de hidroxitirosol, tirosol y verbascósido se prepararon en matraces aforados. Alícuotas de concentración conocida de los compuestos de referencia se usaron para la preparación de las curvas de calibrado, y para la determinación de la linealidad de la respuesta concentración-área. Este análisis se realizó por triplicado. La determinación cuantitativa se llevó a cabo mediante una curva de regresión ($r^2 \geq 0,999$). La repetibilidad de los procedimientos de extracción mediante los tratamientos térmicos (realizados por duplicado) se evaluó mediante la cuantificación del DHFG, obteniéndose en todos los casos un coeficiente de variación (C.V.) inferior al 10 %.

4.5.1.- Identificación del DHFG purificado.

Después de la purificación, el DHFG se identifica por comparación directa de su tiempo de retención en HPLC y espectro de absorción en el rango 200-380 nm con los correspondientes al DHFG comercial. Además, se caracteriza por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN). Los espectros de resonancia magnética nuclear se registran a 303 K en un espectrómetro Bruker Avance 500 que opera a 500,13 MHz (^1H), del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia (Universidad de Sevilla). Las muestras de DHFG natural y comercial se examinan como soluciones 0,1 M en DMSO- d_6 o acetona- d_6 . Para confirmar las asignaciones de las señales de resonancia magnética nuclear, se llevan a cabo experimentos 2D. Para los ensayos de pureza enantiomérica se usa europio tris(3-trifluorometilhidroximetileno)-(+)-camforato [$\text{Eu}(\text{tfc})_3$] como reactivo de desplazamiento quiral



([Sweeting y col., 1987](#)). Cantidades adecuadas de este reactivo (típicamente 11,2 mg, 0,25 eq) se añaden a 0,5 mL de las soluciones mencionadas anteriormente. La pureza de DHFG se determina mediante los análisis de HPLC y ^1H -RMN, y se verifica usando un método gravimétrico, % Riqueza = (mg de DHFG por HPLC/mg peso seco) x 100.

4.6.- Determinación de los componentes menores de los aceites de orujo.

4.6.1.- Determinación del contenido de aceite de los alperujos tratados térmicamente.

El aceite de las muestras de alperujo tratado y seco se extrajo con *n*-hexano usando equipos Soxhlet de 125 mL. La extracción a reflujo se mantuvo durante 4 horas a 70 °C. El hexano se eliminó en un evaporador rotatorio a 35 °C. Los aceites obtenidos se filtraron y fueron almacenados a -20 °C hasta los análisis. El contenido graso está expresado en porcentaje referido a alperujo seco. El enriquecimiento graso se calcula con respecto a las muestras control de alperujo sin tratar.

4.6.2.- Preparación del insaponificable y determinación de alcoholes alifáticos, esteroides y dialcoholes triterpénicos.

Estos análisis se han sido llevados a cabo según el [Reglamento \(CEE\) n° 2568/91](#) y sus modificaciones relativas a los aceites de orujo de oliva. Las muestras de aceite filtradas (5 g), conteniendo 1 mg de 5 α -colestano-3 β -ol y 0,5 mg de 1-eicosanol como patrones internos, se saponifican con 50 mL de una solución etanólica de hidróxido potásico 2 N durante 1 hora. La materia insaponificable se extrae con éter etílico y se filtra sobre sulfato sódico anhidro. Se destila el éter y se seca en estufa a 100 °C durante 15 minutos, se deja enfriar en el desecador y se pesa. El extracto se desarrolla en placas de sílica gel 60 de 20 x 20 cm suministradas por Merck (Darmstadt, Alemania) con una mezcla de hexano/éter etílico 65:35 (v/v). Se recogen las bandas correspondientes a los esteroides y los dialcoholes triterpénicos, por un lado, y los alcoholes alifáticos por otro, y los compuestos se convierten en trimetilsililéteres. Los residuos se tratan con 500 μ L de reactivo de silanización, la mezcla se agita en Vortex y se calienta a 70 °C durante 20 minutos. Después de la reacción de silanización, 1 mL de heptano se añade a la mezcla y 1 μ L de la solución se inyecta en el cromatógrafo de gases. La separación y cuantificación de los compuestos se lleva a cabo en un sistema Agilent 7890A (Agilent Technologies, Palo Alto, EE. UU.), equipado con un detector de ionización de llama usando una columna capilar HP-5 (5%-fenil)-metilpolisiloxano (30 m x 0.32 mm, 0.25 μ m) e hidrógeno como gas portador. Para los esteroides y los dialcoholes triterpénicos, las condiciones de temperatura del horno han sido las siguientes: inicialmente isoterma a 75 °C durante 1 minuto; a continuación se programó un aumento de 40 °C/minuto hasta alcanzar los 250 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 25 minutos. Para los alcoholes alifáticos, se parte de una temperatura inicial de 75 °C durante 1 minuto; a continuación se programó un incremento de 40 °C /minuto hasta alcanzar los 210 °C y se mantuvo durante 1 minuto y por último un incremento a razón de 5 °C/minuto hasta los 290 °C y después 2 minutos a esta temperatura. La temperatura del detector fue de 325 °C. Los resultados se expresan en mg/kg de aceite.

4.6.3.- Determinación de ácidos triterpénicos.

Para la determinación de los ácidos triterpénicos se ha seguido el procedimiento descrito por [Pérez-Camino y Cert, 1999](#) con ligeras modificaciones. Se pesa 0,2 g de aceite en un vial y se añaden 25 μL de una solución de ácido betulínico 0,9 mg/mL en cloroformo. El cloroformo se evapora bajo flujo de nitrógeno, y el residuo se transfiere con dos porciones de 0,5 mL de hexano a un cartucho de extracción en fase sólida (EFS) Supelclean LC-NH₂ de 3 mL suministrado por Supelco Co. (Bellefonte, PA, EE. UU.). Previamente el cartucho, conectado a un aparato de destilación a vacío, se acondiciona consecutivamente con 3 mL de metanol, 3 mL de acetona y 4 mL de hexano. A continuación, el cartucho se eluye con 10 mL de una mezcla hexano/diclorometano 90:10 y 10 mL de una mezcla hexano/acetato de etilo 40:60. Estas fracciones se desechan. Finalmente, los ácidos triterpénicos se eluyen con 10 mL de una mezcla éter etílico/ácido acético 98:2 (v/v). El eluato se evapora a temperatura ambiente y vacío hasta sequedad. El residuo se trata con 500 μL de reactivo de silanización y se calienta a 70 °C durante 20 minutos. El análisis cromatográfico de los ácidos triterpénicos se realiza usando el mismo equipamiento ya mencionado para los alcoholes alifáticos, esteroides y dialcoholes triterpénicos, exceptuando las condiciones del horno que son las siguientes: temperatura inicial de 150 °C durante 1 minuto, se aumenta a 40 °C/minuto hasta alcanzar los 260 °C manteniéndose durante 4 minutos y a continuación se programa un incremento de 2 °C/minuto hasta llegar a 280 °C y se mantiene durante 3 minutos. Los resultados se expresan en mg/kg de aceite.

4.6.4.- Determinación de tocoferoles.

Los tocoferoles se han determinado aplicando el método [IUPAC 2.432](#). Soluciones de los aceites en hexano (0,1 g en matraz aforado de 10 mL) se filtran a través de filtros de nylon de 0,45 μm . Las soluciones se analizan mediante inyección de 20 μL en válvula rheodyne de un cromatógrafo líquido Hewlett Packard HPLC (Series 1050) provisto de una columna Superspher Si 60 (250 x 4,6 mm de longitud y diámetro interno, rellena de micropartículas de sílice de 4 μm ; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). La elución se efectúa con una mezcla de *n*-hexano/2-propanol (98,5:1,5) como fase móvil a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se usa un detector de fluorescencia Shimadzu RF-10A XL ($\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$). La cuantificación de los tocoferoles se basa en las áreas de los picos comparadas con referencia a una calibración externa preparada con cantidades conocidas de los compuestos puros α , β y γ -tocoferol. Los resultados se expresan en mg/kg de aceite.

4.6.5.- Determinación de ceras y escualeno.

La composición de ceras y escualeno se ha determinado según el método oficial de análisis del [Reglamento \(CEE\) n° 2568/91](#) actualizado. La separación de la fracción de ceras se realiza en una columna cromatográfica (clásica) de sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM) (Merck

KGaA, Darmstadt, Alemania). La columna cromatográfica se prepara suspendiendo en *n*-hexano anhidro 20 g de gel de sílice hidratado al 2 %. Se deja sedimentar espontáneamente y se hacen pasar 30 mL de *n*-hexano para eliminar impurezas. Se pesa con exactitud 0,5 g de aceite y se añade 1 mL de solución patrón de laurilaraquidato (C₃₂) de concentración 0,1 mg/mL y 1 mL de solución patrón de escualano de concentración 0,9 mg/mL. Se transfiere la muestra a la columna con ayuda de 2 porciones de 1 mL de *n*-hexano. A continuación, se inicia la elución usando hexano/éter etílico 98:2 (v/v) como eluyente con unas pocas gotas de Sudan I como colorante. La fracción resultante (aproximadamente 150 mL) se concentra a sequedad y se recupera después con 5 mL de *n*-heptano. Se inyectan 2 µL de esta solución en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N con inyector automático y detector de ionización de llama. Una columna capilar SPB-5 (15 m de longitud x 0,25 mm de diámetro interno y 0,10 µm de espesor de fase) de Teknokroma (Barcelona, España) se usa para la separación. Se emplea el modo de inyección splitless durante 1 minuto. Las condiciones de separación son las siguientes: se parte de una temperatura inicial de 70 °C que se incrementa a razón de 45 °C/minuto hasta los 180 °C y que después se aumenta a 5 °C/minuto hasta alcanzar los 340 °C. La temperatura del inyector se mantiene a 225 °C y la temperatura del detector se fija en 350 °C. El hidrógeno se usa como gas portador a una velocidad de flujo de 4 mL/min. Los resultados se expresan en mg/kg de aceite.

4.6.6.- Determinación de compuestos polares.

Para la determinación de los compuestos polares se aplica el método desarrollado por [Márquez-Ruiz y col., 1996](#) con algunas modificaciones. Se han usado cartuchos de 1 g para extracción en fase sólida (Varian, Inc., Palo Alto, EE. UU.). Los cartuchos se activan con 6 mL de hexano grado HPLC. Una cantidad apropiada de aceite (100 mg) se transfiere con cuatro porciones de 0,5 mL de hexano. A continuación el cartucho se lava con 15 mL de una mezcla de hexano/éter etílico 87:13 (v/v) y se desecha esta fracción. Los compuestos polares se eluyen con 15 mL de éter etílico. Las fracciones polares se evaporan a vacío hasta sequedad y se redisuelven en 1 mL de THF. Una alícuota de 20 µL de la solución se inyecta en un cromatógrafo líquido Hewlett Packard Series 1050 equipado con detector de índice de refracción (LaChrom L-7490 Merck) y una columna PLgel de 100 Å y 5 µm (Agilent Technologies, Palo Alto, EE. UU.). La elución se realiza a una velocidad de flujo de 0,6 mL/min, usando como fase móvil THF. La eficiencia de la separación de los compuestos polares se verifica por cromatografía en capa fina. Para la cuantificación, se prepara una solución estándar de trioleína.

4.6.7.- Determinación del grado de acidez e índice de peróxidos.

La acidez libre y el índice de peróxidos se han determinado según los métodos oficiales de análisis descritos en el [Reglamento \(CEE\) nº 2568/91](#) y sus modificaciones. El aceite (2,5 g) se disuelve en 50 mL de una mezcla etanol/éter etílico 1:1 (v/v), previamente neutralizada con una solución de hidróxido sódico en presencia de fenolftaleína. La acidez se determina por valoración

de los ácidos grasos libres con una solución acuosa de NaOH 0,1 N usando una solución de fenolftaleína al 1 % en etanol como indicador. La acidez se expresa como porcentaje de ácido oleico. El índice de peróxidos se determina disolviendo el aceite (2 g) en una mezcla cloroformo/ácido acético 3:2 (v/v). La solución se trata con una solución de yoduro potásico y se mantiene en la oscuridad durante 5 minutos a temperatura ambiente. El yodo liberado se valora con una solución de tiosulfato sódico 0,01 N, utilizando una solución de almidón como indicador. El índice de peróxidos se expresa en miliequivalentes de O₂ activo por kg de aceite.

El tratamiento estadístico de los datos se lleva a cabo aplicando el análisis de la varianza (ANOVA) con la distribución t (de Student) y el método de la diferencia mínima significativa para el mismo nivel de confianza (95 %). Un *p* valor inferior a 0,05; 0,01 ó 0,001 indica una diferencia o correlación estadística, alta y fuertemente significativa, respectivamente.

4.7.- Obtención de oligosacáridos de bajo grado de polimerización.

Se parte de 4 L de fase acuosa obtenida de la filtración de 2 kg de alperujo tratado a 170 °C durante 15 minutos. Se concentra la fase acuosa a presión reducida hasta 1 L y se reparte en 5 fracciones de 200 mL. La fase se deja exenta de compuestos fenólicos de bajo peso molecular mediante una extracción con 500 mL de acetato de etilo usando un extractor líquido-líquido para extracciones en contracorriente continua con disolventes inmiscibles o menos densos que el agua, suministrado por Pobel (Madrid, España). Después de 8 horas de extracción en caliente (40-50 °C) a reflujo se recupera la fase acuosa, se destila el acetato de etilo remanente y se liofiliza (se obtienen 168 g).

4.7.1.- Hidrólisis química y enzimática del liofilizado de la fase acuosa.

Se han estudiado las condiciones de hidrólisis química óptimas para romper los enlaces glicosídicos de los polisacáridos ácidos y neutros hasta llegar a obtener oligosacáridos. Se ensayan dos agentes hidrolíticos ácidos como clorhídrico y trifluoroacético a diferentes concentraciones (0,2, 0,5, 1 y 2 M), temperaturas (70-120 °C) y tiempos (0,5-8 horas). Una muestra de 75 mg de liofilizado libre de compuestos fenólicos se hidrolizó con 2 mL de ácido. La solución se diluyó con agua desionizada y se neutralizó con NH_4OH . La muestra se filtró a través de 0,45 μm y se sometió a ultrafiltración con una membrana de corte de peso molecular de 3000 Da para separar los oligosacáridos con la distribución de masa molecular más pequeña (por debajo de 3000 Da) y que son de interés por su grado de polimerización. Alícuotas del hidrolizado y del permeado (líquido que ha pasado a través de la membrana) se toman y analizan mediante HPLC y CG para determinar la naturaleza y cantidad de los monosacáridos liberados (análisis directo) y la composición y cantidad de los oligosacáridos obtenidos (después de una hidrólisis ácida cuantitativa para convertirlos a sus monómeros constitutivos), a fin de poder calcular el rendimiento de la degradación a oligosacáridos.

Los tratamientos de hidrólisis ácida son insuficientes para lograr la hidrólisis completa de las sustancias pécticas. Los resultados indican una baja liberación de ácido galacturónico y, una vez liberado, el ácido galacturónico experimenta degradación, formando lactonas ([Garna y col., 2006](#)). La hidrólisis enzimática es la mejor técnica para la rotura de las cadenas de ácido galacturónico en forma de oligómeros sin degradación. Varios procedimientos de hidrólisis enzimática de los polisacáridos pécticos se han llevado a cabo para evaluar el mejor tratamiento que rinda la cantidad máxima de oligosacáridos ácidos. Previamente, la fracción rica en pectinas se saponifica en una solución acuosa de NaOH 0,05 M a 0 °C durante 4 horas para facilitar los tratamientos posteriores. Seguidamente se neutralizan con una solución de ácido acético 0,5 M. Las soluciones se evaporan a sequedad y se disuelven en buffer acetato sódico 50 mM de pH 5 conteniendo NaN_3 0,01 % (p/v), que se utiliza como agente antimicrobiano, y se incuban con enzimas.

Se llevan a cabo ensayos con diferentes enzimas para investigar las condiciones óptimas de hidrólisis. Se estudia la cinética de liberación de ácido galacturónico con Olivex (es un preparado enzimático comercial rico en enzimas pectinolíticos y con actividad hemicelulolítica y celulolítica producido a partir de *Aspergillus aculeatus*) (Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca) diluida 100 veces en buffer. Durante la hidrólisis (0-24 horas), se toman alícuotas del hidrolizado, y a las 6 horas de hidrólisis enzimática se alcanza el máximo rendimiento de ácido galacturónico. Este método se usa para el análisis cuantitativo. También se realizan degradaciones enzimáticas con endo-poligalacturonasa de *Aspergillus niger* (Megazyme, Wicklow, Irlanda) durante 24 horas. Sin embargo, la hidrólisis se optimizó en último término para la producción de oligosacáridos pécticos con una mezcla de enzimas, pectinesterasa (PE); endo y exo-poligalacturonasa (PG); y pectinliasa (PL) (Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca) durante 72 horas de tratamiento. La cantidad de enzimas usada es 4 µg/mL de cada una. Todas las incubaciones se realizan a 40 °C. Los hidrolizados se calientan a 100 °C durante 15 minutos para inactivar los enzimas.

4.7.2.- Procedimientos de aislamiento y purificación de oligosacáridos.

Ultrafiltración

La ultrafiltración se usa para el aislamiento y purificación de los oligosacáridos con diferentes grados de polimerización a partir de los hidrolizados producidos enzimática y químicamente. En la [Figura 24](#) se representa gráficamente el procedimiento seguido para la obtención de estos oligosacáridos de bajo grado de polimerización. La ultrafiltración es un proceso de separación bien conocido en las industrias de fermentación y biotecnología para separar oligosacáridos prebióticos y polisacáridos ([Swennen y col., 2005](#)). El fraccionamiento se realiza en una celda de ultrafiltración con agitación magnética modelo Amicon 8400 de Millipore (Bedford, MA, EE. UU.), y con membranas de celulosa regenerada de 76 mm, de corte molecular diferente (1000 y 3000 Da). Las filtraciones se hacen a presión constante de 5 bares. La presión en el módulo se ajusta manualmente con el manorreductor de la bala de gas nitrógeno. Los hidrolizados se lavan con agua a 40 °C hasta que se recogen 500 mL de permeado. Las soluciones de los hidrolizados y los permeados se toman para los correspondientes análisis que permiten hacer un balance de la producción de oligosacáridos con bajo grado de polimerización.

Precipitación con etanol

En este estudio, la precipitación con etanol al 80 y 90 % (v/v) se ha usado para la separación de los oligosacáridos neutros, obtenidos químicamente, de los correspondientes monómeros. Alícuotas de etanol se añaden bajo agitación continua hasta una concentración final del 90 % (v/v) y la mezcla se mantiene a 4 °C durante 24 horas. Los monosacáridos solubilizados se separan del residuo insoluble de los oligosacáridos por centrifugación y filtración. Los precipitados se redisuelven en agua desionizada para el siguiente paso de purificación ([Figura 24](#)).

Cromatografía de adsorción

La cromatografía de adsorción con resina XAD16 se utiliza para la purificación de los oligosacáridos ácidos o pépticos y neutros. En el caso de los oligosacáridos ácidos después de la inactivación del enzima y la ultrafiltración, el hidrolizado de oligosacáridos de corte molecular inferior a 3000 Da (*Figura 24*) se filtra y se concentra a 25 mL en evaporador rotatorio. La solución concentrada se hace pasar a través de una columna rellena con Amberlite® XAD16 (35 x 3 cm diámetro interno) previamente lavada con etanol 95 % y después con agua. La elución se realiza con 100 mL de agua desionizada para obtener los oligosacáridos. En el caso de los oligosacáridos neutros, el precipitado obtenido con etanol 90 % se disuelve en 25 mL de agua. La solución se pasa a través de la columna y la elución de los oligosacáridos neutros se lleva a cabo sucesivamente con 200 mL de agua desionizada y con 200 mL de una solución metanol/agua al 20 % (v/v).

Separación de oligosacáridos mediante cromatografía de exclusión por tamaño

Las muestras liofilizadas de oligosacáridos que pertenecen a las fracciones purificadas A-E (*Figura 24*) se disuelven en agua y la mezclas de oligosacáridos se fraccionan por grado de polimerización (DP) mediante cromatografía de exclusión por tamaño en dos columnas Superdex Peptide HR 10/30 (30 x 1 cm) (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) conectadas en serie a un cromatógrafo líquido Jasco LC-Net II/ADC (Easton, MD, EE. UU.), equipado con un inyector automático y dos detectores, diodo array e índice de refracción. Se estudia así la distribución de pesos moleculares de los productos finales. Se trabaja en modo isocrático usando un buffer de acetato amónico 100 mM ajustado a pH 5. La velocidad de flujo fue de 0,5 mL/minuto. Se efectúan varias inyecciones de 100 µL de las fracciones purificadas y se recogen los picos por separado para proceder a su caracterización.

La glucosa, los oligosacáridos de la familia de la maltosa (maltotriosa, maltotetraosa, maltopentosa, maltohexaosa, maltoheptaosa de DP 3-7, respectivamente) y la celobiosa (celotriosa, celotetraosa, celopentaosa y celohexaosa de DP 3-6, respectivamente), maltosa y celobiosa (DP 2) incluidas, para oligosacáridos neutros, y los ácidos urónicos mono- y trigalacturónico, para oligosacáridos pépticos, se analizan en las mismas condiciones, y los tiempos de retención observados sirven de referencia para calibrar la columna e identificar los diferentes grados de polimerización de los picos de los cromatogramas de las muestras.

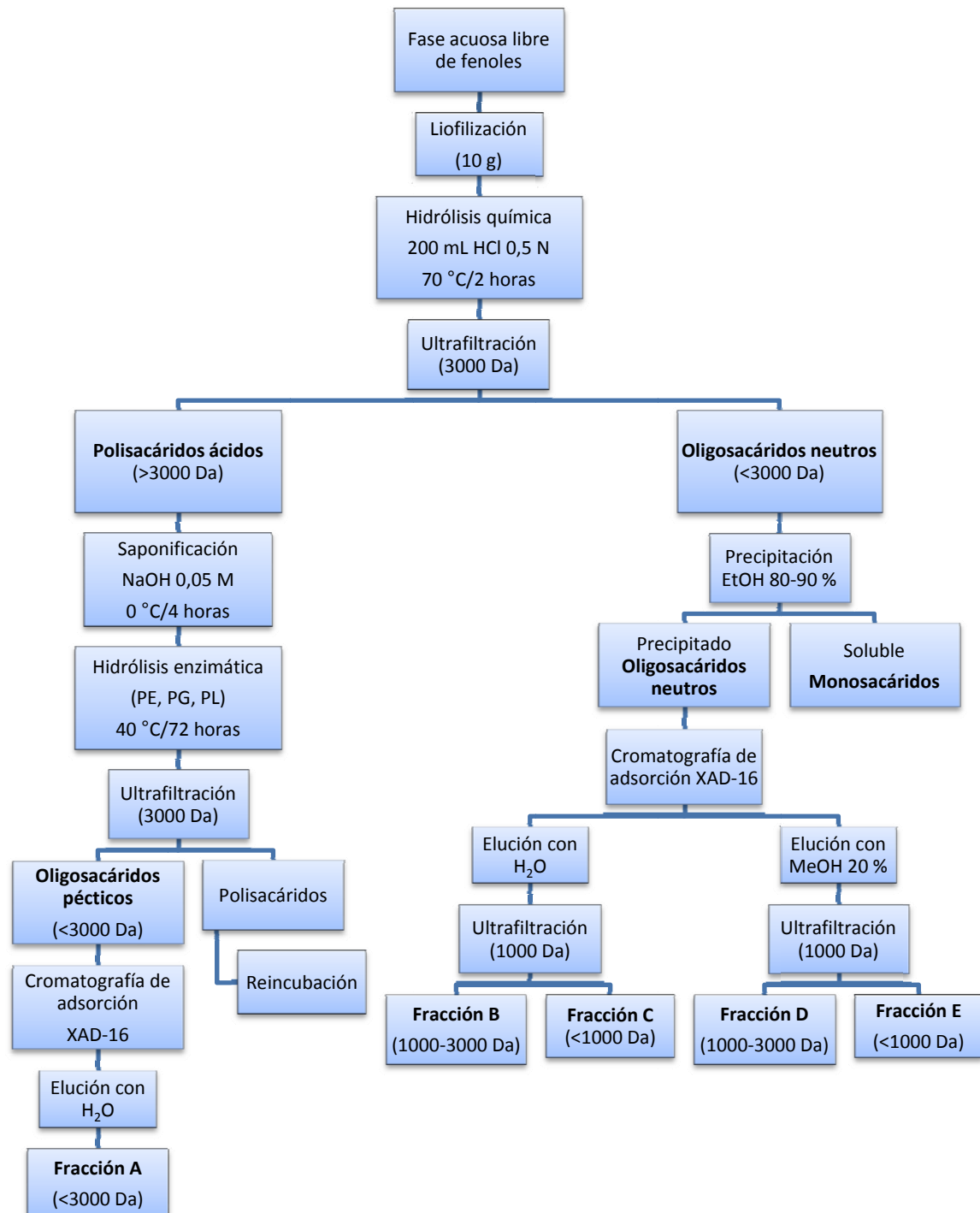


Figura 24. Esquema del proceso de obtención de oligosacáridos de bajo grado de polimerización.

4.7.3.- Determinaciones colorimétricas de azúcares neutros y ácidos urónicos.

Estas determinaciones han sido útiles en el seguimiento de la composición de los oligosacáridos en cada fracción de la purificación por cromatografía de adsorción. El contenido total de azúcares neutros se determina colorimétricamente por el método de la antrona propuesto por [Dische, 1962](#). Este procedimiento permite cuantificar hexosas y aldopentosas, libres o formando parte de polisacáridos. Se toma una alícuota de la muestra de 100 μL (por triplicado) diluida convenientemente y se añaden 200 μL de una solución de antrona 0,2 % (p/v) en ácido sulfúrico concentrado. Se agitan los tubos de ensayo en Vortex y se calientan durante 5 minutos a 100 °C en baño de agua (en presencia de ácido sulfúrico los carbohidratos experimentan deshidratación convirtiéndose en furfural e hidroximetilfurfural y condensan con la antrona produciendo compuestos verde-coloreados). Cuando los tubos se enfrían en baño de hielo se mide la absorbancia a 630 nm en un lector de microplacas Bio-Rad modelo iMark (Hercules, CA, EE. UU.). La glucosa se usa como patrón externo para preparar una calibración con soluciones acuosas en un intervalo de concentraciones de 0,02-0,2 mg/mL.

El contenido total de ácidos urónicos se cuantifica colorimétricamente según el método del cromógeno fenilfenol o *m*-hidroxibifenilo con alguna modificación ([Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1974](#)). En tubos de ensayos se dosifican por triplicado 200 μL de la muestra (más un blanco de muestra con el que se corrigen posibles interferencias de carbohidratos no urónicos) y en baño de hielo se mezclan con 1,2 mL de tetraborato sódico 0,0125 M en ácido sulfúrico concentrado. Se agitan los tubos en Vortex y se calientan a 100 °C durante 5 minutos en baño de agua. Una vez que se enfrían los tubos se añaden 20 μL de *m*-hidroxibifenilo 0,15 % en NaOH 0,5 % que es un reactivo sensible y específico de los anhídridos de los ácidos urónicos. El color desarrollado por agitación vigorosa se mide a 520 nm en el lector de microplacas. Se utiliza ácido galacturónico como patrón externo de calibración. Se prepara una curva de calibración con los valores de absorbancia de soluciones de concentración conocida (de 0,02 a 0,2 mg/mL).

4.7.4.- Procedimiento de derivatización y determinación de azúcares y ácidos urónicos mediante HPLC.

El estudio de la liberación de monómeros y de la composición de los oligosacáridos en los hidrolizados y en las fracciones obtenidas de la ultrafiltración se ha determinado según el método de [Gomis y col., 2001](#). Es un método de cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa descrito para la determinación simultánea de aldosas (glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa, ribosa, fucosa y ramnosa) y ácidos urónicos (D-glucurónico y D-galacturónico). Los azúcares reductores son derivados con *p*-aminobenzoato de etilo (ABEE) en presencia de cianoborohidruro sódico para la detección por ultravioleta. A la muestra que contiene los azúcares en 5 mL de agua se añaden 0,4 mL de NaBH_3CN 1,4 M en agua destilada, 0,4 mL de ácido acético glacial y 2 mL de ABEE 0,6 M en metanol. La mezcla se calienta a 80 °C durante 10 minutos. Después de enfriar

a temperatura ambiente, se añaden 2 mL de agua destilada. La fase acuosa se extrae con 4 mL de cloroformo para eliminar el exceso de *p*-aminobenzoato de etilo, se filtra por 0,45 μm y se inyectan 5 μL para el análisis HPLC. Los análisis se llevan a cabo en un cromatógrafo Shimadzu SCL-10A (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón) equipado con dos bombas, un detector de ultravioleta y un inyector automático. Se usa una columna Ultrabase C8 (150 x 4,6 mm y 3 μm de tamaño de partícula) de Análisis Vínicos S.L. (Tomelloso, España) para la elución. La columna se mantiene en un horno termostato a 40 °C. Las señales se monitorizan a 307 nm. Los eluyentes consistían en buffer de citrato sódico 0,1 M, pH = 5,5 y tetrahidrofurano en proporción 88/12 y acetonitrilo. Las condiciones de elución se programan de acuerdo con el siguiente gradiente: la proporción de acetonitrilo se mantiene isocráticamente al 1 % durante los primeros 20 minutos, luego aumenta gradualmente hasta el 20 % durante los siguientes 8 minutos, y finalmente retorna a las condiciones iniciales alcanzados los 36 minutos. La velocidad de flujo fue 0,5 mL/minuto. La identificación de los picos cromatográficos se hace por comparación de los tiempos de retención con aquellos de los compuestos de referencia. El método del patrón externo se utiliza para la cuantificación de los azúcares y ácidos urónicos individuales.

4.7.5.- Determinación de la composición de los oligosacáridos neutros mediante cromatografía de gases.

El contenido en azúcares neutros constituyentes de los oligosacáridos en los hidrolizados y en las fracciones obtenidas de la ultrafiltración también se ha determinado por cromatografía gaseosa, previa derivatización a sus correspondientes acetatos de alditol, y se comparó en algunos casos con los resultados obtenidos de la determinación por HPLC. Para cuantificar el contenido en azúcares libres como monómeros, los acetatos de alditol se preparan por el método de [Englyst y Cummings, 1984](#) con pocas modificaciones. 500 μL de una solución acuosa de mioinositol (0,1 mg/mL) se añade como patrón interno a 100 μL de la solución de azúcares. Para cuantificar el contenido en azúcares totales se precisa de una hidrólisis previa con una solución acuosa de ácido trifluoroacético 2 N (que contiene 0,1 mg/mL de mioinositol) a 121 °C durante 2 horas. Después se añaden 200 μL de hidróxido amónico y 200 μL de una solución de borohidruro sódico (10 mg/mL) en hidróxido amónico 2 N. La mezcla se deja a 40 °C durante 1 hora para completar la reducción de los azúcares. A continuación, con ácido acético glacial se descompone el exceso de borohidruro hasta desaparición del burbujeo. Se evapora a sequedad en corriente de aire y se lava con tres porciones de 1 mL de metanol llevando a sequedad tras cada adición. Para acetilar se añaden 600 μL de anhídrido acético y 120 μL de 1-metilimidazol, que actúa como catalizador, y se deja reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se detiene la reacción añadiendo 2 mL de diclorometano y 5 mL de agua destilada. Se agita en Vortex y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. Se desecha la fase acuosa y se repite el lavado con agua dos veces más. Una vez obtenidos los acetatos de alditol, éstos han sido identificados y cuantificados mediante cromatografía de gases por comparación con patrones conocidos. Se utiliza un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 con detector de ionización de llama y una

columna capilar con fase estacionaria polar SP-2330 (30 m x 250 μm x 0,2 μm) de Supelco Co. (Bellefonte, PA, EE. UU.). El programa de temperaturas del horno ha sido el siguiente: 50 °C durante 2 minutos, un incremento de 35 °C/minuto hasta llegar a los 180 °C manteniéndose durante 5 minutos; después se inicia otro calentamiento a razón de 5 °C/minuto hasta 220 °C, manteniéndose esta temperatura durante 22 minutos. El helio se usa como gas portador a una velocidad de flujo de 2,2 mL/minuto. El inyector y el detector se mantienen a 250 y 300 °C respectivamente. El volumen de muestra inyectada fue de 2 μL .

4.7.6.- Caracterización de los oligosacáridos de bajo grado de polimerización.

4.7.6.1.- Determinación del grado de polimerización de los oligosacáridos mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia (HPAEC-PAD).

Las fracciones de oligosacáridos, antes del fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular, se analizan mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia en un equipo Dionex (Sunnyvale, CA, EE. UU.), usando una columna CarboPac PA10 (4 x 250 mm, 10 μm) en serie con una precolumna CarboPac PA (4 x 50 mm). La fase móvil es una mezcla de dos eluyentes, hidróxido sódico 150 mM (eluyente A) e hidróxido sódico 150 mM y acetato sódico 600 mM (eluyente B). Las condiciones de elución de los oligosacáridos ácidos son las siguientes: 0 minutos, A:B 25:75; 13,5 minutos A:B 90:10; 45 minutos A:B 0:100, a una velocidad de flujo de 0,9 mL/min. Se usa un detector electroquímico en detección amperométrica pulsada. Para los oligosacáridos neutros fueron: 0 minutos, A:B 25:75; 13,5 minutos A:B 90:10; 40 minutos A:B 50:50, a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se inyectan 25 μL de muestra. La glucosa, los oligosacáridos de la familia de la maltosa (DP 2-7) y la celobiosa (DP 3-6) y los ácidos urónicos mono- y trigalacturónico se analizan en las mismas condiciones, y los tiempos de retención observados sirven de referencia para identificar los diferentes grados de polimerización de los picos de los cromatogramas de las muestras.

4.7.6.2.- Caracterización estructural de oligosacáridos neutros mediante ESI-MS.

Las fracciones de oligosacáridos obtenidas se caracterizan estructuralmente en un espectrómetro de masas de impacto electrónico mediante inyección directa de las soluciones en la fuente de ionización electrospray (ESI) aplicando energías de ionización de 50 y 100 eV. Los espectros de masas se adquieren usando un analizador de masas de cuadrupolo (ZMD4, Micromass, Waters Inc.; Manchester, Reino Unido) operando en modo negativo y positivo. La temperatura de desolvatación es de 120 °C, la temperatura de la fuente de 80 °C y el voltaje extractor de 12 V. El flujo se mantiene a 1 mL/min.

4.7.6.3.- Caracterización estructural de oligosacáridos pépticos mediante HPLC-ESI-MS/MS.

La separación cromatográfica se realiza en un HPLC Perkin Elmer Series 200 acoplado a un espectrómetro de masas híbrido QTRAP® (AB Sciex, California, EE. UU.), equipado con una fuente de ionización electrospray. Se emplea una columna Mediterranea Sea₁₈ de 15 x 0,21 cm y 5 µm de Teknokroma (Barcelona, España). Los eluyentes son acetonitrilo y agua acidificados al 0,1 % con ácido fórmico. Las muestras se disuelven en 1 mL de acetonitrilo 50 %, se microfiltran y se analizan mediante HPLC-MS/MS. El volumen inyectado es de 20 µL. La fuente de ionización ESI en modo negativo emplea un voltaje de -4500 V y un DP de -80 V. En los experimentos MS/MS la energía de colisión es de -30 V.

4.8.- Análisis de compuestos volátiles.

Los tratamientos térmicos para la producción de compuestos volátiles se han realizado con alperujo fresco, tomado al principio de la campaña de producción de aceite de oliva, y alperujo almacenado, a finales de campaña. Se ha empleado el nuevo reactor de tratamiento con vapor a escala de planta piloto usando el sistema de recuperación en continuo de volátiles impulsados y/o arrastrados con la ayuda de nitrógeno y/o destilación a vacío. La recuperación se ha llevado a cabo en los primeros estadios del tratamiento antes de producirse arrastre por el vapor de agua generado para el calentamiento. Los compuestos volátiles fueron recogidos por condensación en dos trampas frías (a 20 °C y a -40 °C, respectivamente) y por burbujeo en agua a la salida del segundo condensador. Estos condensados o destilados constituyen las muestras a analizar y se mantienen a -20 °C hasta el momento del análisis. La *Tabla 4* resume los tratamientos y los métodos de extracción aplicados. Además de los tratamientos que se indican se han llevado a cabo dos tratamientos adicionales a 150 y 170 °C.

4.8.1.- Extracción líquido-líquido y microextracción en fase sólida (MEFS).

Los compuestos volátiles de los destilados han sido extractados siguiendo los siguientes procedimientos. El primero consiste en una extracción líquido-líquido con diclorometano; 0,75 mL de destilado se mezcla en un vial con 0,75 mL del solvente y se agita durante 30 minutos. Finalmente, la fase de diclorometano se inyecta en un cromatógrafo de gases usando un autoinyector equipado con una fibra de MEFS de un 1 cm de longitud. La microextracción en fase sólida es la otra técnica de extracción. Para extraer los compuestos volátiles en los destilados se utiliza un dispositivo de MEFS provisto de una fibra de 2 cm de longitud cubierta con fase estacionaria Stable Flex Divilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano, 50/30 μm (Supelco Co., Bellefonte, EE. UU.). La fibra se usa para muestrear el espacio de cabeza de 2 mL de destilado en viales de vidrio de 10 mL sellados con septum de PTFE. Todos los viales se equilibran a temperatura ambiente y, a continuación, la fibra se expuso al espacio de cabeza durante 10 minutos. Después de la extracción, la fibra se inserta manualmente en un cromatógrafo de gases y se incuba aquí durante 5 minutos, donde tiene lugar la desorción de los compuestos volátiles. Cada muestra se analiza por duplicado.

Tabla 4. Esquema de los tratamientos hidrotérmicos aplicados para obtener los compuestos volátiles.

Alperujo	Calentamiento	Temperatura (°C)	N ₂ /Vacío	Trampa	Muestra
Fresco	Indirecto	50	N ₂	Burbujeo	1
				Condensado 20 °C	2
				Condensado -40 °C	3
		100		Burbujeo	4
				Condensado 20 °C	5
				Condensado -40 °C	- ^a
	Vacío	50	Burbujeo	6	
			Condensado 20 °C	7	
			Condensado -40 °C	8	
		100	Burbujeo	9	
			Condensado 20 °C	10	
			Condensado -40 °C	- ^a	
	Directo	50	N ₂	Burbujeo	11
				Condensado 20 °C	12
				Condensado -40 °C	- ^a
Burbujeo				13	
Condensado 20 °C				14	
	100		Condensado -40 °C	- ^a	
Almacenado	Indirecto	50	N ₂	Burbujeo	15
				Condensado 20 °C	16
				Condensado -40 °C	- ^a
		100		Burbujeo	21
				Condensado 20 °C	17
				Condensado -40 °C	- ^a
	Vacío	50	Burbujeo	20	
			Condensado 20 °C	- ^a	
		100	Condensado -40 °C	- ^a	
			Burbujeo	22	
			Condensado 20 °C	18	
			Condensado -40 °C	19	

-^a No se obtuvo condensado.

4.8.2.- Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS).

Los compuestos volátiles absorbidos en la fibra expuesta al espacio de cabeza de los destilados son térmicamente liberados en el inyector de un cromatógrafo de gases Trace GC Ultra acoplado a un espectrómetro de masas DSQ (Thermo Scientific, Austin, EE. UU.) , y equipado con una columna capilar Phenomenex ZB-5 (30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 1 μm de espesor de fase 5 %-fenil 95 %-dimetilpolisiloxano). El horno se ajusta con el siguiente programa de temperaturas: temperatura inicial de 35 °C durante 1 minuto y, a continuación, aumenta a razón de 8 °C/min hasta alcanzar los 200 °C. La temperatura del inyector y la línea de transferencia al espectrómetro de masas se mantienen a 225 y 250 °C respectivamente. El helio se utiliza como gas portador a una velocidad de flujo de 2,5 mL/min (modo de presión constante 18 psi). Se emplea el modo de inyección “splitless” durante 1 minuto. El espectrómetro de masas opera por impacto electrónico con una energía de ionización de 70 eV. La adquisición de datos se realiza a razón de 1 barrido/s en un intervalo de masas m/z de 20-220. Los compuestos volátiles se identifican por comparación de sus espectros de masas y tiempos de retención con aquellos obtenidos de compuestos de referencia puros. La identificación de los compuestos cuando no se dispone de estándares puros se basa en la comparación de sus espectros de masas con espectros incluidos en la biblioteca NIST/EPA/NIH, y en sus índices de retención lineales (IRL) relativos a la serie de los n -hidrocarburos (C_6 - C_{15}) con valores de IRL previamente descritos en la bibliografía ([Flamini y col., 2003](#)). La integración de todos los picos cromatográficos se lleva a cabo eligiendo una masa, entre aquellas específicas para cada compuesto, con las intensidades más altas para discriminar de sus compuestos más próximos. A partir de los cromatogramas se calculan factores de corrección y se usan para obtener las áreas equivalentes a la corriente iónica total. La cuantificación de los compuestos se realiza usando una calibración basada en la constante K_{aw} obtenida de la base de datos EPI Suite (EPA) introduciendo el número CAS. Se preparan soluciones estándares para obtener un espacio de cabeza de 0,5 ppm. Los resultados de concentración de todos los compuestos se estiman con referencia a dicha calibración.

4.9.- Propiedades del DHFG purificado.

4.9.1.- Medida de la capacidad antioxidante del DHFG en matrices lipídicas.

4.9.1.1.- Purificación de la matriz lipídica.

Se sigue el procedimiento “*free solvent*” que permite obtener la matriz lipídica exenta de restos de disolvente y de los estabilizantes que ésta contenga ([Yoshida y col., 1992](#)). Para ello se pesan 200 g de aceite y se introducen a través de una columna de vidrio (45 x 3 cm de diámetro interno) rellena de alúmina (100 g) previamente activada a 200 °C durante 3 horas. La salida de la columna se conecta a un matraz Kitasato, al que se aplica vacío, y se eluye hasta que el nivel de aceite alcanza la parte superior del relleno. Tanto la columna como el matraz de recogida se mantienen al abrigo de la luz, para proteger de la oxidación al aceite. Se hace la determinación de tocoferoles a la matriz obtenida aplicando el método [IUPAC 2.432](#), comprobándose la ausencia de éstos.

4.9.1.2.- Estabilidad Rancimat a 90 °C.

La medida está basada en la detección conductimétrica de los productos de descomposición del aceite. El aparato consta de un bloque calefactor, con capacidad para seis tubos donde se coloca el aceite. Un flujo controlado de aire se hace pasar por la muestra calentada a 90 °C y, a la vez que la oxida, arrastra los volátiles formados que se recogen mediante borboteo en un frasco que contiene 75 mL de agua desionizada y una célula que mide continuamente la conductividad. Cuando se inicia la oxidación secundaria, se desprenden los primeros compuestos volátiles, mayoritariamente ácido fórmico, que se disuelven en el agua y dan lugar a un aumento de la conductividad. El tiempo que tardan en producirse los primeros compuestos volátiles polares como consecuencia del inicio de la oxidación secundaria de las grasas se denomina período de inducción (P. I.) y se mide en horas. El punto de inflexión de la curva de conductividad, denominada curva de oxidación, define el final del periodo de inducción y se determina por la intersección de la línea base con la tangente a la curva trazada cuando aumenta bruscamente la conductividad.

Se añaden a cada tubo Rancimat antioxidantes en disolución metanólica para obtener una concentración final en el aceite 0,5 mM para cada antioxidante. Se evapora el metanol en corriente de nitrógeno y se pesan en cada tubo 2,5 g de aceite purificado como se ha indicado previamente. Los tubos se colocan en el bloque calefactor y se conectan al surtidor de aire con un flujo de 5 L/h, mientras se calienta el aceite. Cuando la temperatura alcanza los 90 °C, se conectan las salidas de los tubos a los frascos que contienen el agua y los electrodos. Se aumenta el flujo de aire a 20 L/h y se registra la conductividad de forma continua frente al tiempo. Se utiliza un equipo 679 Rancimat, Metrohm (Suiza). Todas las determinaciones se realizan por duplicado.

4.9.1.3.- Inhibición de la oxidación primaria del ácido linoleico en emulsión. Método del tiocianato férrico.

Este método se ha usado para la medida de la inhibición de la oxidación primaria (fase inicial de la peroxidación lipídica) según [Mitsuda y col., 1996](#) con algunas modificaciones. A 25 μL de la muestra (solución acuosa de DHFG purificado) se añaden 5 μL de ABAP 0,07 M en agua, como fuente de radicales libres alcoxi y peroxilos e iniciador de la reacción de oxidación, y 2 mL de una emulsión de ácido linoleico 1,3 mM con SDS 0,1 M en buffer fosfato 0,01 M (pH 7,4). Se prepara un blanco (sin ácido linoleico) a cada muestra. También se hace conjuntamente y por triplicado un ensayo de oxidación total (sin muestra). La mezcla se agita y se calienta a 50 °C. Después de 15 horas, se añaden 100 μL de tiocianato amónico al 30 % y 100 μL de FeCl_2 0,02 M en HCl 3,5 %. Durante la oxidación del ácido linoleico, se producen los peróxidos que oxidan el Fe^{2+} a Fe^{3+} . Los iones Fe^{3+} forman un complejo de color rojo con el tiocianato que tiene un máximo de absorbancia a 490 nm. Se mide la absorbancia de las soluciones coloreadas a esta longitud de onda en el lector de microplacas Bio-Rad iMark (Hercules, CA, EE. UU.). Una elevada absorbancia es indicativa de una alta concentración de peróxidos. Las determinaciones se realizan por triplicado.

4.9.1.4.- Inhibición de la oxidación secundaria del ácido linoleico en emulsión. Método del ácido tiobarbitúrico (TBA).

El método se basa en la medida de la cantidad de malondialdehído (MDA), un subproducto formado en sistemas de lipoperoxidación. Para la determinación se usa la reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico. Se sigue el procedimiento que se describe en [Moon y col., 2009](#) con modificaciones. A 25 μL de muestra se añaden 5 μL de ABAP 0,07 M en agua y 1 mL de una emulsión de ácido linoleico 5,6 mM con SDS 0,1 M en buffer fosfato 0,01 M (pH 7,4). Se prepara un blanco (sin ácido linoleico) a cada muestra. También se hace conjuntamente y por triplicado un ensayo de oxidación total (sin muestra). La mezcla se agita y se calienta a 50 °C. Después de 24 horas de incubación, se toman 100 μL de la mezcla de reacción y se añaden 100 μL de ácido tricloroacético al 2,8 % (p/v) en agua y 100 μL de ácido tiobarbitúrico al 1 % en SDS 1,1 %. Esta mezcla se agita vigorosamente en Vortex y se calienta a 90 °C durante 20 minutos. Después se enfría en baño de hielo durante 10 minutos, se añade 0,5 mL de *n*-butanol, se agita y centrifuga a 12000 rpm durante 3 minutos. La fase de butanol se separa después de la centrifugación y se mide la absorbancia de las soluciones coloreadas a 540 nm. Los resultados se dan como promedio de tres replicados.

4.9.2.- Medida de la agregación plaquetaria.

En este estudio se investiga la actividad antiagregante plaquetaria de DHFG e hidroxitirosol. Estas sustancias se disuelven en buffer fosfato salino (PBS) a las concentraciones especificadas para los ensayos y las soluciones se ajustan a un pH de 7,4 antes de su uso.

Para evaluar los efectos *ex vivo* de actividad antiagregante de DHFG, hidroxitirosol y la combinación de ambos, se midió la agregación plaquetaria en plasma rico en plaquetas (PRP) antes y después de la incubación con ciertos inductores. La medida se llevó a cabo usando un agregómetro PACKS-4 (Helena Laboratories, Beaumont, EE. UU.). La sangre se extrajo a voluntarios sanos (para evitar cualquier interferencia con el estado de activación plaquetaria y a un número de entre 11 y 15 voluntarios por muestra para disminuir la variabilidad biológica) en tubos con citrato sódico 3,8 % (9:1 v/v) según procedimientos estandarizados. La sangre así extraída se centrifugó a 200 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El PRP se retiró con una pipeta y se colocó en un tubo calentado. Los tubos con la sangre restante se centrifugaron a 2000 g durante 10 minutos para aislar el plasma pobre en plaquetas (PPP). El PPP se usó para ajustar el PRP a un número de 300 ± 20 plaquetas/ μL usando un analizador de hematología Sysmex KX-21N (Alemania). Una vez ajustado, el PRP se dejó en reposo a 37 °C. Para inducir la agregación plaquetaria se usaron 3 agonistas diferentes: adenosindifosfato (ADP) 10 μM ; colágeno 2-5 $\mu\text{g/mL}$ y fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) 25 μM . La medida de agregación plaquetaria comenzó 90 minutos después de la extracción de sangre. Hidroxitirosol, DHFG, la mezcla de ambos y buffer salino al 0,9 % o PBS como control se incubaron con PRP a 37 °C durante 10 minutos. Finalmente, los agonistas se añadieron a cada una de las muestras para empezar la medida de agregación plaquetaria. Después de 10 minutos, se obtuvieron las curvas de agregación y los resultados se expresaron como porcentajes de las áreas bajo las curvas de agregación con respecto a la curva de agregación máxima correspondiente al control con PBS (en la [Figura 25](#) se muestra un ejemplo de curvas de agregación). La agregación plaquetaria se mide dentro del agregómetro determinando la turbidez del plasma rico en plaquetas, en las que se ha estimulado la agregación plaquetaria *in vitro*. Luego se realiza una curva que indica la transmisión de luz por unidad de tiempo. La medida se compara con el control buffer fosfato salino (PBS).

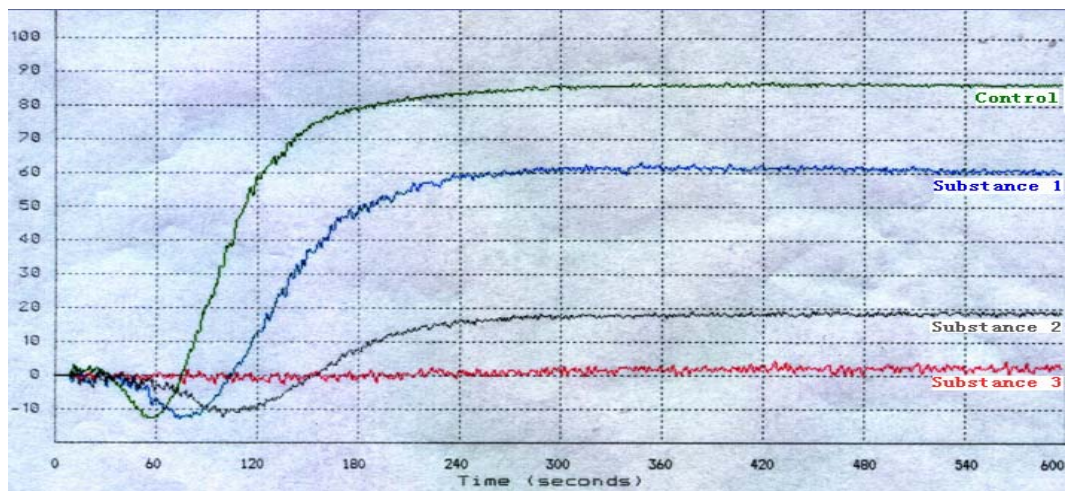


Figura 25. Ejemplo de un informe gráfico de un agregómetro PACKS-4 para las curvas de agregación generadas a partir de plaquetas activadas por colágeno. El porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria de las sustancias 1, 2 y 3 se calcula restando al área bajo la curva del control el área bajo la curva de cada sustancia ensayada, y expresando el resultado en % de disminución de las áreas bajo la curva de agregación plaquetaria.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1.- Nuevo reactor de tratamiento térmico con vapor.

El sistema “steam explosion” es una tecnología ampliamente estudiada para la degradación y separación no sólo de los componentes estructurales de los materiales lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina), sino también para la producción económica de productos químicos, alimento animal, biopolímeros y para la extracción eficiente de compuestos antioxidantes ([Kurosumi y col., 2007](#)). El proceso “steam explosion” es también un pretratamiento técnicamente efectivo para el aprovechamiento y utilización de los subproductos generados por las almazaras (orujo y alperujo) ([Fernández-Bolaños y col., 1999, 2002a y 2004](#); [Felizón y col., 2000](#)). Pero a pesar de las numerosas ventajas que proporciona en el caso del alperujo (fácil separación de las fases sólida y líquida por filtración y/o centrifugación, operación prácticamente imposible sin pretratamiento previo; alta solubilización de compuestos fenólicos, tales como hidroxitirosol, y azúcares fermentables; aumento del contenido graso y de la concentración de celulosa, entre otras) ([Rodríguez y col., 2007a](#)) aparecen ciertos inconvenientes para su puesta en práctica a nivel industrial.

El mayor inconveniente para poner en funcionamiento el reactor “steam explosion” para el pretratamiento del alperujo reside en las condiciones tan altas de temperatura (180-240 °C) y presión (máxima 4,31 MPa) que se requieren, seguidas por la rápida descompresión, que limita el desarrollo de este sistema en las instalaciones de las industrias orujeras encargadas de la recepción y tratamiento del alperujo para extraer el aceite de orujo, diseñadas para trabajar a presiones máximas de 0,88 MPa en sus líneas de procesado. Por este motivo se ha **diseñado, construido y puesto en marcha a escala planta piloto un nuevo reactor o sistema de tratamiento térmico con vapor discontinuo que funciona a temperaturas y presiones más bajas y sin necesidad de descompresión explosiva**. La simplificación técnica reduce sustancialmente los costes del equipo y los de operación, y lo hace de fácil adaptación a la industria orujera. Con el empleo de este reactor, se pretende además, mantener las ventajas previamente mencionadas que hacen posible el aprovechamiento del alperujo. Al reducir la temperatura (máxima 190 °C) y la presión (máxima 1,18 MPa) y eliminar factores críticos como la presencia de oxígeno (gracias a la posibilidad de generar vacío en su interior o de operar en régimen continuo) y la descompresión brusca se minimizarán las reacciones de hidrólisis, oxidación y polimerización que implican pérdidas y degradaciones de compuestos de interés y que pueden recuperarse mediante el tratamiento, aunque se requiere la aplicación de tiempos de tratamiento más prolongados.

5.1.1.- Pruebas preliminares sobre el alperujo.

El propósito de este estudio es evaluar los efectos de las diferentes condiciones de tratamiento con vapor sobre el alperujo en el nuevo reactor discontinuo para la utilización integral del mismo. Para ello se han de aprovechar las fracciones sólida y líquida separadas después del tratamiento térmico y a partir de ellas obtener diferentes productos de alto valor añadido. Gracias a las simplificaciones técnicas que introduce con respecto al sistema “steam explosion”, el nuevo reactor se adapta a las características de las extractoras de aceite de orujo de oliva y ofrece una nueva alternativa para resolver los problemas económicos y medioambientales que genera este subproducto. A continuación, se estudian los efectos de las variables más importantes del tratamiento térmico (temperatura y tiempo de tratamiento) sobre varios parámetros físicos y químicos de los alperujos analizados.

Comprobación de las condiciones de operación del reactor

Se realiza una experiencia previa con objeto de verificar que el sistema es capaz de alcanzar las condiciones de operación (presión y temperatura) para las que el reactor se ha diseñado. Se hacen dos tratamientos, y en cada uno se carga el reactor con 30 kg de alperujo fresco recogido a principio de campaña y procedente de aceituna de la variedad “arbequina” con una humedad del 68,5 % y con un contenido en hueso del 49,3 %. El alperujo se calienta de forma directa en el reactor a 150 y 170 °C durante 90 y 45 minutos, respectivamente. Durante los tratamientos es posible controlar todo el proceso. El sistema de instrumentación del reactor permite visualizar en una pantalla la temperatura del alperujo y la presión en el interior del mismo. En la [Tabla 5](#) se recogen los valores de presión y temperatura, en donde se muestra que rápidamente se alcanza la temperatura de tratamiento deseada. El calentamiento desde temperatura ambiente hasta el intervalo de temperaturas 150-170 °C requiere entre 15 y 23 minutos. A partir del momento en que se alcanza la temperatura de tratamiento deseada, se elige como tiempo cero y se contabiliza la duración del tratamiento. La temperatura y la presión permanecen aproximadamente constantes durante el tiempo de reacción (así lo indican las temperaturas promedio), ya que el equipo controla la entrada de vapor saturado, permitiendo o interrumpiendo el suministro de vapor hasta que se ajustan sus valores.

Después del periodo de tratamiento, la etapa de enfriamiento también es rápida; sólo se necesitan de 15 a 20 minutos para que la temperatura descienda por debajo de 50 °C, dependiendo de las condiciones de temperatura iniciales de tratamiento. Entonces, el reactor se abre y el alperujo tratado se transfiere a un depósito de decantación, aquí se deja reposar la masa y al cabo de unos minutos se observa de forma bien distinguible que el tratamiento térmico del alperujo permite obtener la separación de dos fases: una fracción líquida o soluble que contiene compuestos orgánicos debido a la rotura de los enlaces químicos de las paredes celulares y membranas y una fracción sólida residual del alperujo tratado. El alperujo se filtra para la

separación completa de las fracciones sólida y líquida. Ambos tratamientos térmicos producen un sólido que es más fácilmente separable de la fracción líquida que el alperujo no tratado.

En este trabajo se ha evaluado el seguimiento de algunos parámetros como herramienta para examinar el correcto funcionamiento del reactor, determinar la eficacia del tratamiento y caracterizar los efectos del mismo sobre el alperujo:

1. Se estudia la facilidad con la que las fases sólida y líquida pueden ser separadas por filtración y/o centrifugación después del tratamiento térmico. Se califica de “fácil”, “intermedia” y “difícil”, según la dificultad para completar la separación de las fases con los medios usados, siendo las separaciones “fácil” e “intermedia” más viables en la industria.

2. En el líquido obtenido se cuantifica la solubilización de conocidos compuestos fenólicos (DHFG, glucósido de hidroxitirosol, hidroxitirosol y tirosol) y la composición de azúcares.

3. En la fase sólida, se analiza el contenido graso y la reducción de sólido; características que se determinan antes y después de los tratamientos térmicos con el nuevo reactor. La reducción de la fracción sólida se evalúa en términos de la pérdida de materia seca. El residuo sólido se seca en estufa a 50 °C y la pérdida se mide gravimétricamente y se calcula directamente la diferencia de peso de la masa de alperujo seco antes y después del tratamiento con vapor. Una muestra de alperujo sin tratar, es decir la muestra control, también se analiza como punto de referencia para las muestras tratadas.

Mediante estos tratamientos previos del alperujo a 150 y 170 °C se consigue una separación “fácil” de las fases sólida y líquida. La fracción solubilizada separada del residuo sólido por filtración contiene, entre otros compuestos, fenoles y carbohidratos. La [Tabla 6](#) muestra el efecto del tratamiento térmico sobre la composición fenólica de la fracción líquida. Los valores están referidos a materia seca inicial, de modo que son comparables entre sí. Como puede observarse en el análisis HPLC, el tratamiento térmico del alperujo permite la solubilización de los compuestos fenólicos cuantificados. El tratamiento a 170 °C durante 45 minutos produce una solubilización más alta de compuestos fenólicos (hidroxitirosol y tirosol) que el tratamiento a 150 °C durante 90 minutos. Estos dos primeros parámetros analizados ya son indicativos de la eficacia del tratamiento térmico para el fraccionamiento y la solubilización del alperujo y de cómo se pueden mejorar los rendimientos de extracción y recuperación de los compuestos bioactivos y de interés que tiene este residuo.

La [Tabla 7](#) muestra la concentración de los azúcares, monosacáridos y oligómeros, recuperados en la fase líquida. La cantidad de azúcares solubilizados durante el tratamiento se mide por HPLC. La concentración de azúcares libres se determina directamente. La cantidad de oligómeros en las soluciones se calcula por diferencia entre la concentración de monosacáridos

antes y después de una hidrólisis con TFA 2 N a 120 °C y 2 horas. El tratamiento con vapor del alperujo también aumenta el contenido de azúcares solubles (libres o monosacáridos y oligómeros), principalmente glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa y ácido galacturónico. Los polisacáridos se liberan e hidrolizan a partir de las paredes celulares y se solubilizan debido al tratamiento térmico. En consecuencia, los valores que se recogen en la [Tabla 7](#) son el resultado del balance entre la solubilización y las pérdidas por degradación térmica de los azúcares que se solubilizan. El análisis de las fracciones solubilizadas muestra que los polisacáridos despolimerizados a oligómeros y monómeros son principalmente hemicelulosas tipo xilanos, con la xilosa como azúcar mayoritario; la concentración de este azúcar se incrementa significativamente para ambos tratamientos.

En la [Figura 26](#) se pueden observar los efectos del tratamiento sobre la fracción sólida residual de alperujo tratado. Estos tratamientos suponen una reducción de la materia seca del 20,1 y el 30,7 %. Estos efectos del proceso de tratamiento térmico en el nuevo reactor son los mismos que se consiguen en el reactor “steam explosion”, dejando una fase sólida enriquecida en celulosa prácticamente inalterada, que facilita el posterior procesamiento de esta fracción mediante tratamiento enzimático ([Rodríguez y col., 2007a](#)), y aceite. La pérdida de materia seca o reducción de sólido en los tratamientos se relaciona con la solubilización de compuestos fenólicos e hidrólisis de hemicelulosas. El contenido graso se determina antes y después del tratamiento térmico. Como consecuencia de la reducción de sólido, el alperujo tratado aumenta su contenido graso de 11,4 a 14,2 y 18,3 %, lo que se traduce en un enriquecimiento que va del 25,1 al 60,8 %.

Tabla 5. Valores de temperatura y presión en el interior del reactor con el tiempo para los tratamientos térmicos, registrados por el sistema de adquisición de datos del panel de control del equipo. En color se pueden identificar las diferentes etapas del proceso: calentamiento, tratamiento y enfriamiento (rojo, verde y azul, respectivamente).

150 °C/90 min			170 °C/45 min		
t (min)	T (°C)	P (MPa)	t (min)	T (°C)	P (MPa)
0	20	0,11	0	20	0,11
5	52	0,18	5	42	0,17
10	124	0,30	10	126	0,29
15	146	0,49	15	141	0,44
16	150	0,55	20	159	0,69
17	152	0,53	23	169	0,81
22	151	0,60	24	170	0,91
27	150	0,59	29	170	1,17
32	152	0,59	34	169	1,16
37	150	0,59	39	171	1,17
42	150	0,59	44	172	1,10
47	149	0,58	49	172	1,07
52	153	0,58	54	171	1,14
57	153	0,57	59	170	1,08
62	148	0,66	64	170	1,01
67	149	0,64	69	168	0,76
72	150	0,68	70	153	0,52
77	150	0,67	75	98	0,10
82	151	0,66	80	78	0,10
87	152	0,65	85	61	0,10
92	151	0,64	88	49	0,10
97	151	0,63			
102	151	0,62			
107	150	0,67			
112	109	0,14			
117	89	0,10			
122	71	0,10			
127	48	0,10			
150,7^a			170,3		

^a Valor de temperatura promedio del periodo de tratamiento (intervalo señalado en color verde).

Tabla 6. Cantidad de algunos de los compuestos fenólicos solubilizados en la fracción líquida separada por filtración del alperujo tratado. Los valores están expresados en g/kg de alperujo seco inicial sin tratar.

Compuesto	Alperujo fresco (Control)	Tratamiento térmico	
		150 °C/90 min	170 °C/45 min
DHFG	0,23 ^b	0,15	0,09
Glucósido de HT	nd	nd	nd
Hidroxitirosol (HT)	4,14 ^a	4,12	5,03
Tirosol	0,30 ^b	0,72	1,58

^a Tratamiento “steam explosion” a 230 °C durante 5 minutos con un 3 % (p/p) de ácido sulfúrico. Condiciones propuestas como método cuantitativo para la evaluación del contenido total de hidroxitirosol en alperujo ([Fernández-Bolaños y col., 2002a](#)).

^b Tratamiento térmico a 90 °C durante 2 horas. Condiciones óptimas para la extracción máxima de DHFG (ver apartado [5.1.4](#)). Para glucósido de hidroxitirosol y tirosol no se han establecido las condiciones óptimas de recuperación, así que los datos obtenidos mediante este tratamiento se dan como valores de referencia.

nd, no detectado.

Tabla 7. Composición de azúcares (libres y oligómeros) en la fracción líquida obtenida después de los tratamientos térmicos (determinación por HPLC). Los datos están expresados como porcentaje con respecto a materia seca de alperujo inicial sin tratar.

Azúcares	Alperujo fresco (Control) ^a		150 °C/90 min		170 °C/45 min	
	% (g/100 g de alperujo seco)					
	Libre (L) ^b	Enlazado (E) ^c	L	E	L	E
GlcA	0,15±0,01 ^d	nd	nd	0,19±0,02	nd	nd
GalA	0,28±0,03	0,71±0,06	nd	0,54±0,05	0,12±0,01	0,56±0,05
Glc	nd	0,76±0,07	0,06±0,01	0,85±0,08	0,07±0,01	0,66±0,06
Gal	nd	0,46±0,05	0,06±0,01	0,65±0,05	0,06±0,01	0,62±0,05
Xil	nd	0,12±0,01	0,06±0,01	1,86±0,18	0,09±0,01	3,81±0,11
Ara	nd	0,67±0,06	0,09±0,01	1,53±0,15	0,10±0,01	1,41±0,13
Fuc	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ram	0,09±0,01	0,30±0,02	0,07±0,01	0,43±0,03	0,06±0,01	0,31±0,03

^a Análisis de un extracto acuoso preparado mediante agitación a temperatura ambiente de 20 g de alperujo y 50 mL de agua.

^b Monómeros (determinación mediante derivatización directa con ABEE).

^c Oligómeros (diferencia entre la concentración de monosacáridos antes y después de un tratamiento de hidrólisis con TFA 2 N a 120 °C durante 2 horas, previamente a la derivatización con ABEE).

^d Desviación estándar de dos replicados.

nd, no detectado.

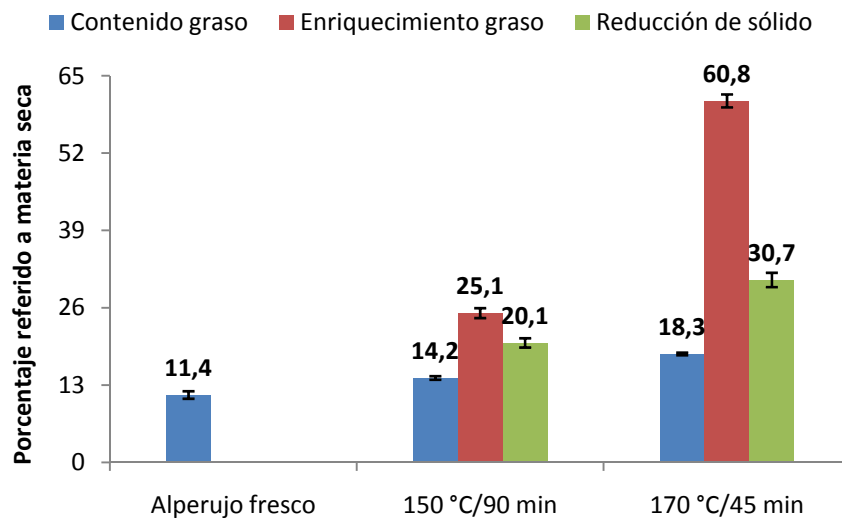


Figura 26. Efectos de los tratamientos térmicos llevados a cabo sobre el alperujo fresco bajo las dos diferentes condiciones de tiempo y temperatura. Las barras indican la desviación estándar de dos replicados.

5.1.2.- Estudio de las condiciones de operación sobre el alperujo.

A la vista de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta los efectos del tratamiento térmico sobre el alperujo, que suponen una modificación sustancial de sus características, según los parámetros y la composición de las fracciones analizadas, se llevan a cabo nuevos tratamientos sobre alperujo fresco para continuar con la puesta a punto del nuevo reactor y además evaluar la influencia sobre el tipo de alperujo. Se parte de 20 kg de alperujo fresco tomado también a principios de campaña (no repasado y sin deshuesar) procedente, en este caso, de aceituna de la variedad “marteña” con una humedad del 65,5 % y con un contenido en hueso del 48,3 %. Se repiten los tratamientos a 150 y 170 °C y diferentes periodos de tratamiento. Además de los dos anteriores, de 90 y 45 minutos, se realizan tratamientos de menor duración para verificar si los tratamientos también son eficaces, acotando el intervalo de tiempos. En la [Tabla 8](#) se puede observar la evolución de la presión y la temperatura en el interior del reactor. Los valores indican que los periodos de calentamiento y enfriamiento requieren, como antes, de 15 a 25 y de 15 a 20 minutos, respectivamente. En los datos de la [Tabla 9](#) se pueden observar los diferentes análisis realizados a las fracciones separadas.

La separación de las fases sólida y líquida es “fácil”, “intermedia” y “difícil” para los tratamientos a 150 °C durante 90, 60 y 45 minutos, respectivamente y “fácil” e “intermedia” para tratamientos a 170 °C durante 45 y 15 minutos de duración. El tratamiento a 150 °C durante 45 minutos parece ser insuficiente para conseguir una efectiva separación de las fracciones obtenidas mediante los medios utilizados tras el tratamiento térmico, el cual se muestra eficaz cuando las condiciones son, al menos, las de un tratamiento a 150 °C y 60 minutos. La filtración y/o centrifugación sobre tela filtrante de fibra de polipropileno del alperujo tratado disminuye el contenido de humedad de la fracción sólida, hasta el 31 % en el caso del tratamiento térmico a 150 °C y 90 minutos.

En la [Tabla 9](#) se recogen los valores sobre la cantidad de compuestos fenólicos solubilizados durante el tratamiento. Una visión de conjunto de los resultados que se presentan, muestra claramente que el tratamiento térmico libera efectivamente los compuestos fenólicos a la fase acuosa y que la cantidad de hidroxitirosol, glucósido de hidroxitirosol y tirosol aumenta con la severidad del tratamiento.

El análisis de azúcares de las fracciones líquidas se puede observar en la [Tabla 10](#) y muestra la presencia de polímeros y oligómeros de xilosa y de glucosa. Se observa una extracción mínima para los tratamientos a 150 °C durante 45 minutos y 170 °C durante 15 minutos y un aumento de la solubilización en función del tiempo de tratamiento. El porcentaje de monosacáridos obtenidos después del tratamiento también aumenta, excepto la glucosa que puede ser deshidratada a hidroximetilfurfural. La alta concentración inicial, la degradación térmica y la ligera solubilización a partir de los polisacáridos hacen negativo el balance de glucosa.

La misma tendencia se observa para el contenido y enriquecimiento graso y la reducción de sólido. Todos estos parámetros tienden a ser más altos a temperaturas más elevadas y tiempos más largos de tratamiento, como se muestra en la [Tabla 9](#). Las mayores reducciones de sólido (27,5 y 33 %) se producen para los tratamientos realizados en condiciones más severas (150 °C durante 90 minutos y 170 °C durante 45 minutos). Esto confirma la importante solubilización de componentes del alperujo que se produce con la aplicación del tratamiento térmico. En consecuencia, después de 90 minutos de tratamiento a 150 °C y 45 minutos a 170 °C, el enriquecimiento graso aumenta hasta un 39,4 y un 45,1 %.

Tabla 8. Valores de temperatura y presión en el interior del reactor con el tiempo para los tratamientos térmicos, registrados por el sistema de adquisición de datos del mismo. En color se pueden identificar las diferentes etapas del proceso: calentamiento, tratamiento y enfriamiento (rojo, verde y azul, respectivamente).

150 °C									170 °C					
45 min			60 min			90 min			15 min			45 min		
t min	T °C	P MPa	t min	T °C	P MPa	t min	T °C	P MPa	t min	T °C	P MPa	t min	T °C	P MPa
0	17	0,12	0	18	0,13	0	15	0,10	0	16	0,10	0	15	0,11
5	78	0,22	5	86	0,29	5	69	0,20	5	77	0,22	5	67	0,20
10	106	0,33	10	128	0,52	10	108	0,36	10	104	0,33	10	92	0,29
15	128	0,48	15	148	0,70	15	138	0,60	15	135	0,54	15	121	0,44
20	149	0,63	16	150	0,72	16	148	0,70	20	167	0,81	20	156	0,63
21	148	0,62	21	150	0,74	17	150	0,72	21	170	0,87	24	168	0,84
26	150	0,61	26	149	0,72	22	149	0,70	26	171	0,90	25	170	0,89
31	149	0,60	31	150	0,73	27	152	0,73	31	170	0,84	30	171	0,93
36	149	0,59	36	150	0,74	32	151	0,72	36	168	0,93	35	170	0,93
41	147	0,59	41	151	0,75	37	158	0,71	37	150	0,85	40	170	0,93
46	150	0,61	46	148	0,72	42	149	0,66	42	95	0,66	45	171	0,98
51	149	0,61	51	150	0,75	47	153	0,67	47	71	0,10	50	171	0,99
56	150	0,63	56	150	0,76	52	151	0,66	52	57	0,10	55	170	1,00
61	148	0,62	61	150	0,76	57	150	0,65	55	47	0,10	65	170	1,02
66	147	0,57	66	149	0,74	62	149	0,66				70	171	1,04
67	144	0,44	71	148	0,75	67	150	0,67				75	169	0,91
72	98	0,10	76	150	0,78	72	150	0,67				76	160	0,80
77	70	0,10	77	145	0,72	77	150	0,68				81	98	0,13
82	47	0,10	82	88	0,67	82	151	0,69				86	72	0,10
			87	63	0,12	87	150	0,69				91	55	0,10
			92	48	0,10	92	149	0,70				95	44	0,10
						97	150	0,71						
						102	149	0,72						
						107	150	0,71						
						108	145	0,50						
						113	100	0,10						
						117	73	0,10						
						112	49	0,10						
148,7^a			149,6			150,6			169,8			170,3		

^a Valor de temperatura promedio del periodo de tratamiento (intervalo señalado en color verde).

Tabla 9. Principales compuestos fenólicos solubilizados en la fracción líquida separada por filtración del alperujo tratado (los valores están expresados en g/kg de alperujo seco inicial sin tratar) y características de la muestra de alperujo fresco después de los tratamientos térmicos con el nuevo reactor.

Parámetros	Alperujo fresco (Control)	150 °C			170 °C	
		Tiempo (min)				
		45	60	90	15	45
DHFG	1,11 ^b	0,35	0,26	0,42	0,73	0,37
Glucósido de HT	2,53 ^b	3,19	3,63	4,70	2,36	3,42
Hidroxitirosol (HT)	8,51 ^a	2,47	3,65	6,68	5,16	6,35
Tirosol	1,09 ^b	0,46	0,73	1,26	0,90	1,17
Contenido graso (%)	8,8±0,4 ^c	11,6±0,2	11,9±0,3	12,2±0,2	11,4±0,2	12,7±0,1
Enriquecimiento graso (%)	-	32,6	36,0	39,4	30,3	45,1
Reducción de sólido (%)	-	23,8	27,2	27,5	23,2	33,0

^a Tratamiento “steam explosion” a 230 °C durante 5 minutos con un 3 % (p/p) de ácido sulfúrico. Condiciones propuestas como método cuantitativo para la evaluación del contenido total de hidroxitirosol en alperujo ([Fernández-Bolaños y col., 2002a](#)).

^b Tratamiento térmico a 90 °C durante 2 horas. Condiciones óptimas para la extracción máxima de DHFG (ver apartado [5.1.4](#)). Para glucósido de hidroxitirosol y tirosol no se han establecido las condiciones óptimas de recuperación, así que los datos obtenidos mediante este tratamiento se dan como valores de referencia.

^c Desviación estándar de dos replicados.

Tabla 10. Composición de azúcares (libres y oligómeros) en la fracción líquida obtenida después de los tratamientos térmicos bajo las diferentes condiciones.

Azúcar	Alperujo fresco		150 °C						170 °C			
	(Control) ^a		45 min		60 min		90 min		15 min		45 min	
	L ^b	E ^c	L	E	L	E	L	E	L	E	L	E
	% (g/100g de alperujo seco inicial)											
GlcA	0,12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GalA	0,26	0,38	0,15	0,34	0,14	0,42	0,21	0,52	nd	0,42	0,16	0,41
Glc	13,6	0,50	5,87	0,45	4,77	1,02	2,08	4,78	0,37	2,10	0,50	2,81
Gal	nd	nd	nd	1,55	nd	1,63	0,45	0,51	nd	0,35	0,11	0,42
Xil	nd	0,26	0,10	0,16	0,17	0,68	0,11	0,83	nd	0,74	0,10	1,54
Ara	nd	0,28	0,08	0,46	0,27	0,75	0,20	0,85	0,19	0,89	0,25	0,72
Fuc	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ram	nd	0,28	nd	0,26	0,09	0,25	0,14	0,55	nd	0,47	0,16	0,45

^a Análisis de un extracto acuoso obtenido mediante agitación a temperatura ambiente de 20 g de alperujo y 50 mL de agua.

^b Composición de azúcares libres (determinación mediante derivatización directa con ABEE).

^c Composición de oligómeros (diferencia entre la concentración de monosacáridos antes y después de un tratamiento de hidrólisis con TFA 2 N 120 °C 2 horas, previamente a la derivatización con ABEE).

nd, no detectado.

Estudio del efecto de la temperatura y el tiempo de tratamiento

A continuación se llevan a cabo nuevos tratamientos entre los que se incluyen un valor de temperatura intermedia (160 °C). Para evaluar el efecto de la temperatura se trata una muestra de alperujo procedente de aceituna madura, que tiene un alto porcentaje de humedad (66,4 %), está parcialmente deshuesada (18,4 %) y llevaba almacenada un cierto periodo de tiempo. Se carga el reactor con 20 kg de alperujo y se realizan varios tratamientos a tres temperaturas (150, 160 y 170 °C) y diferentes tiempos (durante 15 a 90 minutos). En la [Tabla 11](#) se presentan los datos de la evolución de la presión y la temperatura en el interior del reactor de cada tratamiento. En la [Tabla 12 y 13](#) se pueden observar los resultados de los diferentes análisis realizados a las fracciones obtenidas. El estudio se centra en los tratamientos de 60 minutos de duración, por ser los únicos realizados a las tres temperaturas.

La [Figura 27](#) representa gráficamente el efecto de la temperatura sobre la cantidad de compuestos fenólicos solubilizados en la fracción líquida. Las medidas de HPLC muestran un aumento progresivo en la concentración de los compuestos fenólicos DHFG, glucósido de hidroxitirosol, hidroxitirosol y tirosol con la temperatura del tratamiento. La temperatura afecta también a la reducción de sólido, como se observa en la [Figura 26](#), donde se muestra el incremento para las tres temperaturas de tratamiento estudiadas a un tiempo fijado. La alta pérdida de materia seca (38,8 % para el tratamiento a 170 °C durante 60 minutos), conlleva que el contenido en aceite se incremente gradualmente con la temperatura de tratamiento de 45,7 % a 150 °C, a 97,5 % a 170 °C ([Tabla 12](#)). El tratamiento con vapor rompe las estructuras celulares por la alta temperatura y presión liberando el aceite contenido en las vacuolas de las células. También es posible que se libere la fracción de aceite de semilla del hueso, su contenido es bastante alto (aproximadamente 27 %), la cual es solo parcialmente recuperada durante la extracción mecánica del aceite a partir del fruto entero ([Ranalli y col., 2002](#)). Estos dos hechos (reducción de sólido y liberación de aceite de las vacuolas y de la semilla del hueso) podrían ayudar a explicar porqué se produce este alto enriquecimiento en aceite.

La [Tabla 13](#) muestra la concentración de los azúcares, monosacáridos y oligómeros, recuperados en la fase líquida. El análisis de las fracciones solubilizadas muestra que los polisacáridos despolimerizados a oligómeros y monómeros podrían ser principalmente hemicelulosas tipo xilanos o xiloglucanos.

Tabla 11. Valores de temperatura y presión en el interior del reactor con el tiempo para los tratamientos térmicos aplicados al alperujo almacenado, registrados por el sistema de adquisición de datos del reactor. Calentamiento, tratamiento y enfriamiento, en rojo, verde y azul, respectivamente.

150 °C						160 °C					
60 min			90 min			45 min			60 min		
t (min)	T (°C)	P (MPa)	t (min)	T (°C)	P (MPa)	t (min)	T (°C)	P (MPa)	t (min)	T (°C)	P (MPa)
0	25	0,11	0	16	0,12	0	15	0,10	0	19	0,13
5	94	0,23	5	78	0,24	5	96	0,30	5	84	0,28
10	121	0,36	10	119	0,45	10	140	0,70	10	137	0,61
15	141	0,58	15	143	0,69	13	158	0,85	13	156	0,90
16	149	0,68	17	152	0,77	14	164	0,94	14	162	0,94
21	151	0,69	22	146	0,66	19	161	0,93	19	160	0,89
26	151	0,69	27	154	0,78	24	161	0,93	24	161	0,93
31	152	0,70	32	149	0,71	29	159	0,90	29	159	0,88
36	150	0,68	37	148	0,69	34	158	0,92	34	160	0,90
41	151	0,72	42	145	0,65	39	163	0,95	39	159	0,90
46	150	0,68	47	145	0,72	44	160	0,91	44	160	0,91
51	150	0,69	52	150	0,73	49	159	0,91	49	159	0,91
56	150	0,69	57	151	0,75	54	160	0,91	54	159	0,91
61	151	0,71	62	149	0,75	59	156	0,87	59	160	0,94
66	150	0,70	67	150	0,75	60	136	0,56	64	159	0,91
71	150	0,70	72	150	0,74	65	67	0,10	69	162	0,97
76	149	0,69	77	150	0,75	70	49	0,10	74	158	0,92
77	146	0,65	82	150	0,80				75	139	0,60
82	62	0,10	87	151	0,77				81	66	0,10
87	49	0,10	92	151	0,76				86	40	0,10
			97	151	0,76						
			102	151	0,76						
			107	150	0,78						
			108	134	0,67						
			113	61	0,21						
			118	42	0,10						
150,3^a			149,6			160,1			159,8		

^a Valor de temperatura promedio del periodo de tratamiento (intervalo señalado en color verde).

Tabla 11. (Continuación) Valores de temperatura y presión en el interior del reactor con el tiempo para los tratamientos térmicos aplicados a alperujo almacenado, registrados por el sistema de adquisición de datos.

170 °C								
15 min			45 min			60 min		
t (min)	T (°C)	P (MPa)	t (min)	T (°C)	P (MPa)	t (min)	T (°C)	P (MPa)
0	20	0,10	0	19	0,12	0	19	0,11
5	98	0,17	5	91	0,30	5	63	0,32
10	144	0,53	10	130	0,55	10	118	0,48
15	165	0,86	15	160	0,90	15	156	0,79
16	170	0,97	17	169	1,06	16	167	0,86
17	170	0,94	18	175	1,08	17	167	0,87
22	169	0,92	23	174	1,04	22	170	0,89
27	170	0,93	28	173	1,00	27	171	0,88
32	169	0,92	33	171	0,97	32	170	0,89
33	155	0,65	38	169	0,94	37	168	0,91
38	58	0,10	43	166	0,92	42	171	0,94
41	48	0,10	48	168	0,96	47	169	0,94
			53	168	0,94	52	169	0,96
			58	171	0,96	57	167	0,98
			63	166	0,90	62	170	1,01
			64	158	0,59	67	169	1,00
			69	93	0,10	72	168	1,00
			74	80	0,10	77	167	0,99
			79	48	0,10	78	160	0,63
						83	97	0,10
						88	88	0,10
						93	46	0,10
169,5			170,1			168,9		

Tabla 12. Principales compuestos fenólicos solubilizados en la fracción líquida separada por filtración del alperujo tratado (valores expresados en g/kg de alperujo seco inicial) y porcentajes (referidos a materia seca inicial) de contenido y enriquecimiento graso y reducción de sólido de alperujo almacenado sometido o no (control) a diferentes tratamientos térmicos con vapor en el nuevo reactor.

Parámetros	Alperujo fresco (Control)	150 °C		160 °C		170 °C		
		Tiempo (min)						
		60	90	45	60	15	45	60
DHFG	2,26 ^b	0,27	0,35	0,22	0,39	0,15	0,44	0,40
Glucósido de HT	2,13 ^b	4,18	4,57	3,75	5,43	3,32	4,89	6,82
Hidroxitirosol (HT)	13,2 ^a	5,84	7,72	4,78	7,46	4,51	5,68	9,65
Tirosol	1,81 ^b	0,32	0,52	0,26	0,56	0,28	0,60	0,63
Contenido graso (%)	8,1±0,2 ^c	11,8±0,2	13,0±0,2	12,0±0,1	14,3±0,1	12,9±0,1	13,8±0,2	16,0±0,3
Enriquecimiento graso (%)	-	45,7	60,5	48,1	76,5	59,3	70,4	97,5
Reducción de sólido (%)	-	29,0	33,5	22,8	38,4	33,9	34,4	38,8

^a Tratamiento “steam explosion” a 230 °C durante 5 minutos con un 3 % (p/p) de ácido sulfúrico. Condiciones propuestas como método cuantitativo para la evaluación del contenido total de hidroxitirosol en alperujo ([Fernández-Bolaños y col., 2002a](#)).

^b Tratamiento térmico a 90 °C durante 2 horas. Condiciones óptimas para la extracción máxima de DHFG (ver apartado 5.1.4). Para glucósido de hidroxitirosol y tirosol no se han establecido las condiciones óptimas de recuperación, así que los datos obtenidos mediante este tratamiento se dan como valores de referencia.

^c Desviación estándar de dos replicados.

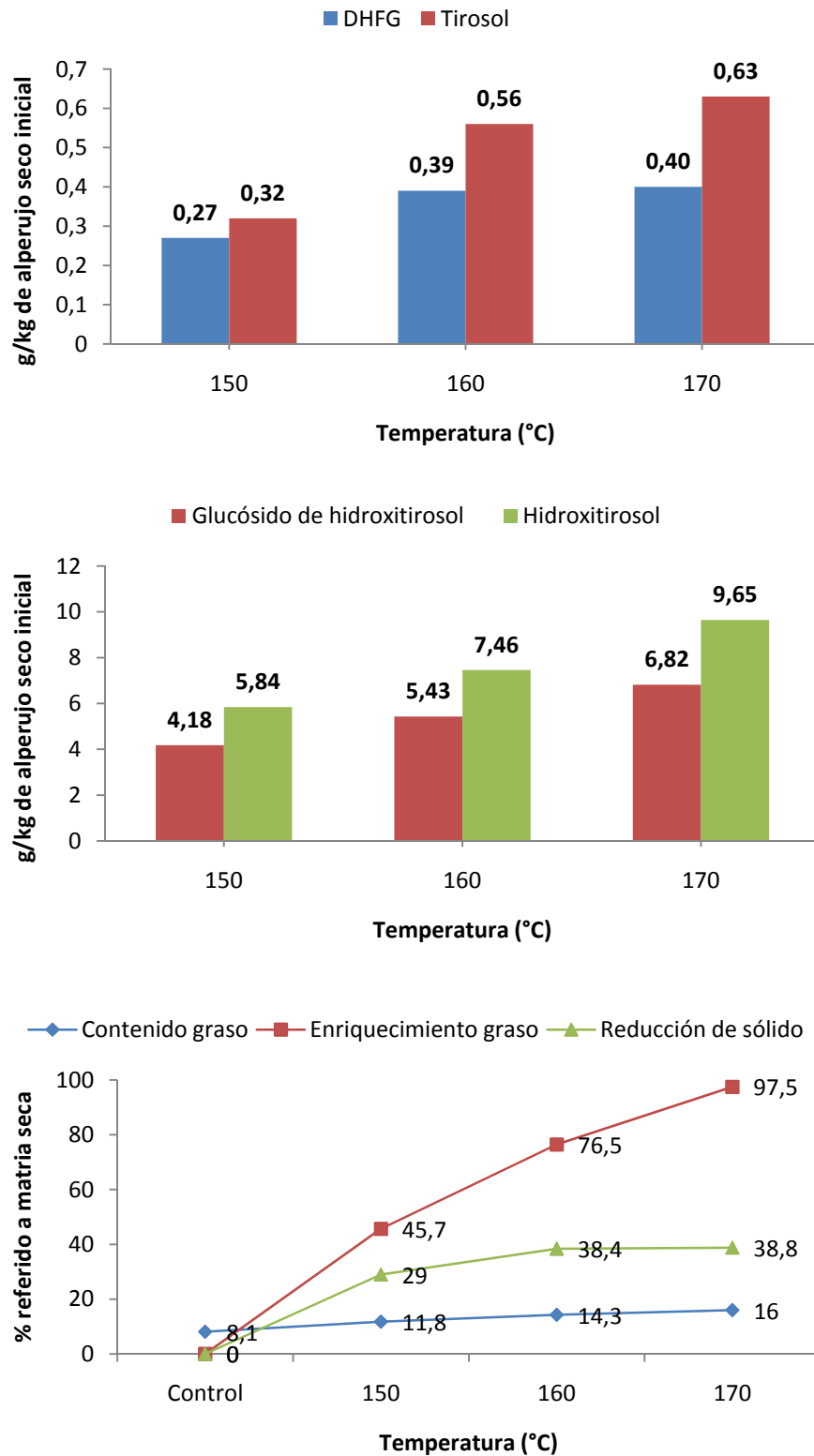


Figura 27. Efecto de la temperatura de tratamiento sobre la cantidad de compuestos fenólicos solubilizados en la fase líquida y sobre el contenido graso y reducción de sólido de la fracción sólida residual para tratamientos de 60 minutos de duración.

Tabla 13. Influencia de la temperatura sobre la composición de azúcares (expresada en g/100 g de alperujo seco inicial) en la fracción líquida obtenida después de los tratamientos térmicos de 60 minutos de duración.

Azúcares	Alperujo (Control) ^a		150 °C		160 °C		170 °C	
	Libre (L) ^b	Enlazado (E) ^c	L	E	L	E	L	E
GaA	0,61	nd	0,23	0,01	0,19	0,03	0,25	0,02
Glc	0,03	2,66	0,97	1,47	1,29	1,09	1,46	1,01
Gal	0,09	0,18	0,06	0,28	0,06	0,26	0,11	0,25
Xil	0,04	0,06	0,07	0,42	0,13	1,02	0,10	0,91
Ara	nd	0,82	0,09	0,71	0,17	0,47	0,20	0,47
Ram	0,10	0,39	0,08	0,28	0,13	0,19	0,16	0,20

^a Análisis de un extracto acuoso obtenido mediante agitación a temperatura ambiente de 20 g de alperujo y 50 mL de agua.

^b Monómeros (determinación mediante derivatización directa con ABEE).

^c Oligómeros (diferencia entre la concentración de monosacáridos antes y después de un tratamiento de hidrólisis con TFA 2 N a 120 °C durante 2 horas, previamente a la derivatización con ABEE).

nd, no detectado.

Estudio del efecto del tiempo de tratamiento

Se amplía el estudio sobre el efecto del tiempo de tratamiento centrándolo en una única temperatura. Se utiliza una muestra de alperujo fresco (no almacenado ni sometido a un segundo proceso de centrifugación), sin deshuesar (34,9 %), recogido a final de campaña que tiene un contenido en humedad del 59,4 %. El alperujo se somete a tratamientos de 160 °C y tiempos comprendidos entre 15 y 90 minutos, ambos inclusive. Para cada tanda, el reactor se carga con 20 kg de alperujo. En la [Tabla 14](#) se consignan los tiempos, las temperaturas y las presiones de los tratamientos llevados a cabo.

El efecto del tiempo de tratamiento sobre la extracción de compuestos fenólicos se muestra en la [Tabla 15](#). El tratamiento con vapor del alperujo favorece la recuperación de estos compuestos y también supone un incremento del contenido de carbohidratos solubles en función del tiempo. La [Figura 28](#) muestra que el tiempo promueve significativamente la hidrólisis de hemicelulosas tipo xilanos o xiloglucanos. La recuperación de xilosa también aumenta y la de otros azúcares constituyentes como la arabinosa y la glucosa. Para la glucosa el máximo rendimiento se obtiene después de 60 minutos de tratamiento y, a partir de aquí, empieza a disminuir a causa de la degradación por la prolongada acción de la temperatura.

5.1.3.- Consideraciones finales sobre la puesta en marcha del nuevo reactor de tratamiento térmico.

A partir de los resultados obtenidos, se deduce que mediante el tratamiento térmico con vapor del alperujo se solucionarían muchos de los problemas que plantea el nuevo subproducto. El contenido residual de humedad del alperujo después de la etapa de separación sólido-líquido varía entre el 30 y el 40 %, es decir, que se reduce aproximadamente un tercio. Con los tratamientos térmicos a 160 °C durante 60 y 90 minutos se reduce la humedad del alperujo desde el 59,4 % al 39 y 35 %, respectivamente. De la menor humedad del alperujo resultarían las siguientes ventajas:

1) Menor coste de secado en las orujeras, donde se extrae el aceite retenido (aceite de orujo).

2) Al acortarse la duración de la fase de secado del alperujo se adelanta el final de la campaña y disminuye notablemente el periodo de almacenamiento. Si el almacenamiento del alperujo es corto se producen menos reacciones de fermentación que originan compuestos indeseados, los cuales complican la recuperación de compuestos de interés y, que además, reducen el contenido graso.

3) Se reducirían los principales problemas asociados con el funcionamiento de los secaderos, pues la solubilización de azúcares harían del alperujo un residuo menos pegajoso y más fácil secar, con menos problemas de caramelización de ciertos azúcares y de generación de compuestos de degradación indeseados (hidrocarburos aromáticos policíclicos) que hacen más difícil la extracción del aceite y que después se detectan en el aceite de orujo.

La considerable reducción de la fracción sólida (37,1 % para el tratamiento a 160 durante 75 minutos) resultado de la efectiva separación de las fases sólida y líquida y la alta solubilización de compuestos hace que el alperujo obtenido mediante este sistema se enriquezca en aceite, por lo que aumentaría el rendimiento de obtención de aceite en el proceso de extracción de la orujera, con relación al alperujo sin tratar.

Después de comprobar su buen funcionamiento y realizar su puesta a punto con los múltiples tratamientos que se han llevado a cabo, se confirma que el nuevo reactor proporciona las mismas ventajas que el reactor “steam explosion” (separación de fases, solubilización de compuestos, reducción de sólido y enriquecimiento en aceite) para todos los tipos de alperujo tratados (independientemente de la variedad de aceituna, grado de madurez, “historia” del alperujo y de la relación en peso entre pulpa y hueso) y que hacen posible el aprovechamiento integral y la valorización del alperujo.

Todo ello permite disponer de una tecnología simple y fácilmente adaptable a la industria orujera, a la cual va dirigida, aprovechando los efluentes de vapor de la propia industria. A consecuencia de este estudio, se ha presentado, recientemente, una solicitud de patente en colaboración con la empresa Oleícola El Tejar Nuestra Señora de Araceli S.C.A. (Número de solicitud P201031236), interesada en ampliar estos estudios a mayor escala. También recientemente se ha iniciado un proyecto conjunto cuyo objetivo principal es la puesta en marcha de un reactor continuo integrado en el conjunto de operaciones que se llevan a cabo en esta industria, que permitirá comprobar la viabilidad técnica del sistema, a partir de la cual se estudiará el posible aprovechamiento integral del alperujo.

Tabla 14. Valores de temperatura y presión en el interior del reactor con el tiempo para los tratamientos térmicos a 160 °C, registrados por el sistema de adquisición de datos del reactor. Calentamiento, tratamiento y enfriamiento, en rojo, verde y azul, respectivamente.

15 min			30 min			45 min			60 min		
t (min)	T (°C)	P (MPa)	t (min)	T (°C)	P (MPa)	t (min)	T (°C)	P (MPa)	t (min)	T (°C)	P (MPa)
0	18	0,10	0	24	0,11	0	21	0,11	0	19	0,11
5	112	0,35	5	128	0,42	5	81	0,23	5	79	0,21
10	152	0,70	10	159	0,78	10	103	0,33	10	103	0,32
11	157	0,79	11	159	0,76	15	136	0,54	15	123	0,43
12	163	0,88	16	160	0,77	17	158	0,64	20	154	0,58
17	161	0,76	21	161	0,78	18	162	0,67	23	160	0,67
22	161	0,73	26	159	0,73	23	163	0,71	24	160	0,68
27	159	0,67	31	159	0,73	28	159	0,68	29	161	0,68
28	146	0,49	36	160	0,73	33	162	0,71	34	160	0,68
33	48	0,10	41	160	0,73	38	164	0,76	39	160	0,71
			42	149	0,47	43	162	0,75	44	160	0,72
			47	58	0,10	48	160	0,74	49	161	0,74
			50	45	0,10	53	158	0,69	54	162	0,75
						58	166	0,76	59	159	0,70
						63	166	0,78	64	161	0,69
						64	155	0,62	69	162	0,69
						69	95	0,10	74	162	0,70
						74	79	0,10	79	163	0,71
						79	47	0,10	83	161	0,68
									84	155	0,61
									89	91	0,10
									94	76	0,10
									99	47	0,10
161^a			159,7			162,2			160,9		

^a Valor de temperatura promedio del periodo de tratamiento (intervalo señalado en color verde).

Tabla 14. (Continuación) Valores de temperatura y presión en el interior del reactor con el tiempo para los tratamientos térmicos a 160 °C, registrados por el sistema de adquisición de datos.

75 min			90 min		
t (min)	T (°C)	P (MPa)	t (min)	T (°C)	P (MPa)
0	18	0,11	0	16	0,10
5	54	0,16	5	89	0,24
10	79	0,24	10	124	0,43
15	100	0,32	15	149	0,68
20	127	0,39	18	157	0,80
25	148	0,50	19	159	0,82
30	157	0,63	24	162	0,86
31	158	0,68	29	158	0,76
36	162	0,73	34	163	0,85
41	160	0,69	39	161	0,79
46	160	0,76	44	158	0,76
51	160	0,74	49	161	0,72
56	159	0,73	54	158	0,62
61	159	0,78	59	163	0,68
66	162	0,79	64	157	0,58
71	160	0,77	69	160	0,63
76	160	0,75	74	162	0,65
81	159	0,74	79	160	0,63
86	161	0,71	84	154	0,53
91	162	0,72	89	162	0,65
96	160	0,69	94	160	0,62
101	162	0,70	99	161	0,65
106	160	0,65	104	161	0,64
107	157	0,62	109	158	0,59
112	99	0,10	110	148	0,43
117	60	0,10	115	64	0,10
120	49	0,10	119	48	0,10
160,3			159,9		

Tabla 15. Efecto del tiempo de tratamiento térmico a 160 °C sobre la extracción de compuestos fenólicos (valores expresados en g/kg de alperujo seco inicial), contenido graso y reducción de sólido de una muestra de alperujo fresco.

Parámetros	Alperujo almacenado (Control)	Tiempo (min)					
		15	30	45	60	75	90
DHFG	1,43 ^b	0,75	0,94	0,79	0,84	0,98	0,81
Glucósido de HT	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hidroxitirosol (HT)	3,87 ^a	2,34	2,84	3,26	3,35	3,76	3,08
Tirosol	1,83 ^b	0,45	0,59	0,71	0,91	1,07	0,86
Contenido graso (%)	10,2±0,5 ^c	11,8±1,0	12,8±0,8	12,1±0,7	13,9±0,3	14,9±0,5	13,9±0,2
Enriquecimiento graso (%)	-	15,7	25,5	18,6	36,3	46,1	36,3
Reducción de sólido (%)	-	29,8	35,9	34,7	34,7	37,1	35,9

^a Tratamiento “steam explosion” a 230 °C durante 5 minutos con un 3 % (p/p) de ácido sulfúrico. Condiciones propuestas como método cuantitativo para la evaluación del contenido total de hidroxitirosol en alperujo ([Fernández-Bolaños y col., 2002a](#)).

^b Tratamiento térmico a 90 °C durante 2 horas. Condiciones óptimas para la máxima recuperación de DHFG (ver apartado 5.1.4). Para glucósido de hidroxitirosol y tirosol no se han establecido las condiciones óptimas de recuperación, así que los datos obtenidos mediante este tratamiento se dan como valores de referencia.

^c Desviación estándar de dos replicados.

nd, no detectado.

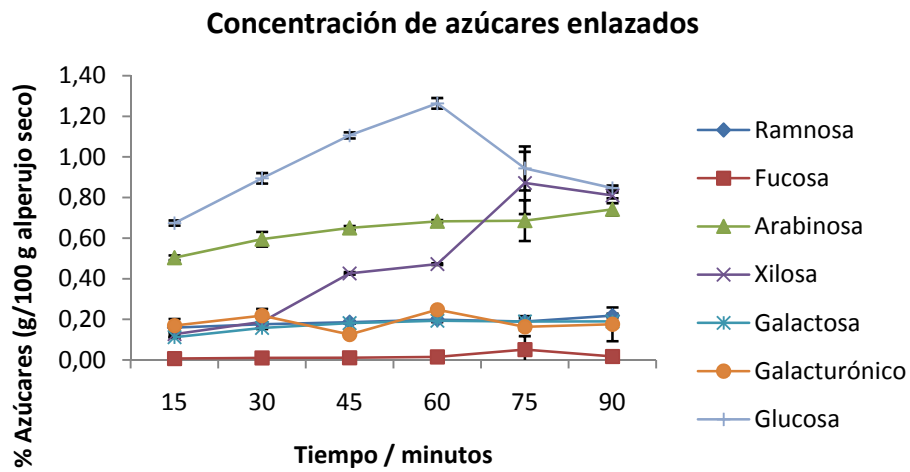


Figura 28. Efecto del tratamiento térmico a 160 °C y diferentes tiempos sobre la composición de azúcares. Los datos están expresados como porcentaje referido a la materia seca inicial sin tratar.

5.1.4.- Tratamientos térmicos (50-120 °C) para obtener la máxima recuperación de DHFG.

En el caso del hidroxitirosol se observa un aumento progresivo de su solubilización con la severidad de los tratamientos en el nuevo reactor. Para el DHFG, aunque se observa un cierto aumento en la liberación entre tratamientos a la misma temperatura, e incluso a medida que la temperatura aumenta, se produce una disminución con los tratamientos térmicos más fuertes (170 °C/45 minutos en alperujo fresco y 170 °C/60 minutos en alperujo almacenado) (ver [Tablas 9 y 12](#)). Se recurre a tratamientos térmicos a más bajas temperaturas para aumentar la recuperación de DHFG y con objeto de que sirvan como método analítico para cuantificar el contenido de DHFG en el alperujo.

Para estudiar la influencia del tiempo y la temperatura en la extracción de DHFG, muestras de alperujo fresco se someten a diferentes tratamientos térmicos. Se llevan a cabo ensayos a 50, 70 y 90 °C durante 1 a 2 horas. El extracto acuoso de la muestra control se recupera después de una simple agitación en agua del alperujo (relación 1:5 p/v) a temperatura ambiente seguida por una filtración. Como se observa en la [Tabla 16](#), la solubilización del DHFG mejora progresivamente al aumentar la temperatura y el tiempo de extracción. Cuando las extracciones se hacen en caliente, las cantidades de DHFG solubilizado aumentan notablemente con respecto a la cantidad que se consigue recuperar después de una simple extracción a temperatura ambiente (muestra control). Sin embargo, los tiempos de tratamiento más prolongados, 90 °C durante 3 y 4 horas, y el tratamiento de autoclave a 120 °C durante 1 hora, no suponen un aumento en la recuperación de DHFG sino un evidente descenso, posiblemente debido a la inestabilidad térmica del compuesto. Por tanto, el tiempo y la temperatura de tratamiento del alperujo deben ser considerados factores que influyen en la solubilización y/o liberación del DHFG en agua.

Los datos obtenidos indican, además, que se produce un aumento extra significativo en la recuperación de DHFG tras un posterior calentamiento a 90 °C durante 2 horas (post-tratamiento) de los extractos acuosos obtenidos a temperatura ambiente y a 50, 70 y 90 °C a partir de alperujo fresco. Cuando el extracto acuoso de la muestra control se somete al post-tratamiento la cantidad de DHFG aumenta de 0,47 a 1,67 g/kg de alperujo seco, que supone un incremento superior al 250 %. Asimismo, con el post-tratamiento del extracto acuoso obtenido de la muestra tratada a 50 °C durante 1 hora, la recuperación de DHFG pasa de 0,57 a 2,02 g/kg de alperujo, que también supone un aumento superior al 250 %. Cuantitativamente, la máxima recuperación de DHFG se consigue en dos pasos consecutivos, en primer lugar una extracción con agua del alperujo a 70 °C durante una hora y a continuación un calentamiento de la fracción solubilizada a 90 °C durante 2 horas, o bien una extracción a 90 °C durante 2 horas y un post-tratamiento en estas mismas condiciones, alcanzándose respectivamente recuperaciones de DHFG de 2,72 y 2,69 g/kg de alperujo seco.

Por otro lado, otros extractos acuosos de alperujo fresco y alpechines industriales de alperujo almacenado se tratan a 90 °C durante 2 horas para confirmar los incrementos que se producen en la recuperación de DHFG con el post-tratamiento (*Tabla 17*). Una extracción inicial con agua a temperatura ambiente de dos muestras de alperujo fresco seguida por un tratamiento posterior a 90 °C durante 2 horas del extracto acuoso, supuso un aumento aproximado del doble en la cantidad de DHFG respecto a la extracción inicial y representa un 88 y 78 % del DHFG total recuperado. La segunda extracción con agua y un post-tratamiento de los extractos a 90 °C durante 2 horas permitió recuperar una cantidad adicional de DHFG que representó un 12 y 22 % del total respectivamente. Estas cantidades totales de DHFG (212-1300 mg/kg alperujo húmedo deshuesado) exceden ampliamente los únicos valores indicados en la bibliografía ([Marsilio y col., 2005](#)) para aceitunas frescas no procesadas (125 mg/kg de pulpa húmeda) y aceitunas de mesa (2-7 mg/kg de pulpa húmeda), mostrando por primera vez la liberación o formación de DHFG adicional después del calentamiento. Estas experiencias también se llevan a cabo en los nuevos alpechines obtenidos a partir de la centrifugación de alperujo a nivel industrial. Cuando estos alpechines se calientan a 90 °C durante 2 horas, también tiene lugar un incremento en la concentración de DHFG, aunque hay cierta variabilidad entre muestras. Esto es probablemente debido a diferencias entre variedades de aceituna, estado de madurez y tiempo de almacenamiento de los alperujos (con el consiguiente efecto de la fermentación u otros bioprocesos).

Los importantes incrementos que se producen en los extractos acuosos de la muestra control y de las muestras tratadas a 50, 70 y 90 °C durante 1 y 2 horas después del post-tratamiento (90 °C/2 horas) indican que tales condiciones resultan ser las óptimas para la liberación de DHFG.

Tabla 16. DHFG liberado bajo diferentes condiciones de tratamiento térmico y después de un post-tratamiento adicional a 90 °C durante 2 horas.

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	DHFG (g/kg alperujo seco)	Post-tratamiento (90 °C, 120 min) DHFG (g/kg alperujo seco)
Control	0	0,47 ± 0,01 ^a	1,67 ± 0,05
50	60	0,57 ± 0,05	2,02 ± 0,07
	120	0,70 ± 0,02	1,97 ± 0,03
70	60	1,40 ± 0,01	2,72 ± 0,08
	120	1,68 ± 0,08	2,50 ± 0,04
90	60	1,51 ± 0,06	2,38 ± 0,04
	120	2,27 ± 0,09	2,69 ± 0,02
	180	1,48 ± 0,10	-
	240	1,08 ± 0,01	-
120 ^b	60	1,26 ± 0,04	-
165 ^c	5	0,90 ± 0,02	-
185 ^c	5	0,76 ± 0,01	-

^a Desviación estándar.

^b Autoclavado.

^c Tratamiento “steam explosion”.

Tabla 17. Liberación de DHFG tras un tratamiento a 90 °C durante 2 horas de las fases obtenidas después de la extracción con agua de alperujo fresco, y a partir de alpechín obtenido de alperujo almacenado a nivel industrial.

DHFG (g/kg alperujo seco)						
Alperujo	Muestra	1ª extracción		2ª extracción		Total recuperado
		Inicial	90 °C/2 h	Inicial	90 °C/2 h	
Fresco	1	0,24±0,01 ^a	0,50±0,02 (88%) ^b	0,05±0,01	0,07±0,01 (12%)	0,57±0,03
	2	1,24±0,06	2,34±0,15 (78%)	0,35±0,01	0,66±0,01 (22%)	3,00±0,16

DHFG (mg/L nuevo alpechín)				
Alperujo	Muestra	Inicial	90 °C/2 h	Δ ^c (%)
	1	284	364	28
Almacenado	2	305	321	5
	3	203	348	71

^a Desviación estándar.

^b Porcentaje respecto al DHFG total recuperado.

^c Incremento de la concentración de DHFG con el calentamiento.

5.2.- Estudio y purificación del antioxidante 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG).

5.2.1- Cuantificación de DHFG en aceitunas de mesa naturales.

Se estudia el contenido en compuestos fenólicos de diez variedades diferentes de aceitunas de mesa para la cuantificación de DHFG en las mismas. Los análisis de las muestras estudiadas revelan diferentes perfiles fenólicos, siendo los más característicos en cuanto a DHFG los correspondientes a las aceitunas negras de Aragón en salmuera y paté, aceitunas negras Cuquillo en salmuera, aceitunas Kalamata en salmuera y aceitunas negras de Thassos ([Figura 29](#)). Los distintos métodos de procesamiento, que incluyen una fermentación espontánea en salmuera, en todos los casos, y los diferentes productores pueden causar algunas diferencias en la composición fenólica de las aceitunas procesadas. Estos hechos explican porque muestras pertenecientes a la misma variedad y con el mismo grado de madurez tienen diferente perfil fenólico. Cuatro compuestos fenólicos se han identificado y cuantificado en las pulpas y salmueras, el DHFG, hidroxitiroso, tiroso y verbascósido ([Tabla 18](#)). La presencia de los glucósidos de hidroxitiroso y tiroso también se ha detectado en algunas muestras. El hidroxitiroso es el principal compuesto fenólico identificado y cuantificado en todas las muestras, tanto en pulpas como en salmueras, conforme a estudios previos ([Romero y col., 2004ab](#); [Blekas y col., 2002](#); [Boskou y col., 2006](#); [Pereira y col., 2006](#); [Mulinacci y col., 2005](#)), a excepción de las muestras de aceitunas de la variedad Thassos, que tienen niveles significativamente más bajos de hidroxitiroso. Sin embargo, es la primera vez que se describen concentraciones elevadas de DHFG en aceitunas de mesa naturales.

Los niveles de DHFG en todas las muestras de aceitunas negras naturales, con independencia del tipo o variedad y características de procesamiento, son más altos en comparación con las aceitunas de color cambiante y las aceitunas verdes naturales. Los valores en estas últimas de 8-21 mg/kg de pulpa fresca son muy similares a aquellos proporcionados por [Marsilio y col., 2005 y 2006](#) de 2-26 mg/kg de pulpa fresca, que estudia el efecto de diferentes tipos de procesamiento (estilos español y griego) sobre la composición fenólica de la variedad "Ascolana tenera". Los niveles más altos (el valor máximo es 232 mg/kg de pulpa fresca) se observan en muestras de las variedades Empeltre y Thassos (2E, 10E, 16T y 17T), los cuales superan significativamente los valores de [Marsilio y col., 2005 y 2006](#) para aceitunas de la variedad "Ascolana tenera" antes de procesar (trazas-125 mg/kg de pulpa). La relación HT/DHFG en la mayoría de las muestras de aceitunas negras está por debajo de 10, y comprendida entre 0,2 y 1,2 en muestras de la variedad Thassos. Por el contrario, en aceitunas verdes y de color cambiante, la relación HT/DHFG varía de 25 a 80. Los valores bajos de la relación HT/DHFG indican una mayor proporción de DHFG que de HT en las aceitunas. Según los resultados, los niveles más altos de DHFG, en estas muestras, parecen estar más bien relacionados con el grado de madurez y no tanto con la variedad o el tipo de procesamiento, aunque las concentraciones específicas de cada compuesto fenólico varían de una campaña a otra. Por lo tanto, se requieren

más estudios comparando el grado de madurez y diferentes campañas en cuanto a los parámetros cuantificados para evaluar estas diferencias.

Los valores de la [Tabla 19](#) indican que los contenidos de HT y DHFG son aproximadamente iguales en salmuera y jugo en casi todas las muestras analizadas, mientras que los contenidos de tirosol y verbascósido son significativamente más altos en el jugo (hasta 1,5 y 7 veces más respectivamente). Durante el procesado para preparar las aceitunas naturales y el periodo de tiempo que transcurre desde el envasado hasta que el producto llega al consumidor, tiene lugar una difusión de compuestos fenólicos polares desde la pulpa hacia la salmuera. El equilibrio se alcanza más rápidamente para los compuestos polares (HT y DHFG), así que el análisis de la salmuera puede servir para su cuantificación en las aceitunas de mesa naturales.

Hasta la fecha, el DHFG no había sido descrito como un compuesto fenólico importante en ningún tipo de aceitunas de mesa. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, las aceitunas de mesa procesadas “naturalmente”, que están disponibles en el mercado español, son por lo general una muy buena fuente de DHFG, compuesto que muestra importantes propiedades antioxidantes y antirradicales ([Rodríguez y col., 2007b](#)), independientemente de la variedad pero especialmente las aceitunas negras. Las cantidades están en concordancia con los datos previamente publicados de DHFG recuperado a partir de pulpa de aceituna ([Rodríguez y col., 2009](#)). Las exigencias del mercado demandan cada vez con más insistencia productos de alta calidad. Las aceitunas de mesa (naturales) apreciadas por sus características sensoriales y valor nutritivo y consideradas saludables por su composición fenólica antioxidante y contenido en ácidos grasos monoinsaturados, cumplen con estos requerimientos. Los datos sobre el contenido de DHFG en estas preparaciones de aceitunas de mesa pueden ser útiles a los nutricionistas y consumidores y ayudar a un mejor conocimiento de la contribución de las aceitunas de mesa a la ingesta diaria de antioxidantes.

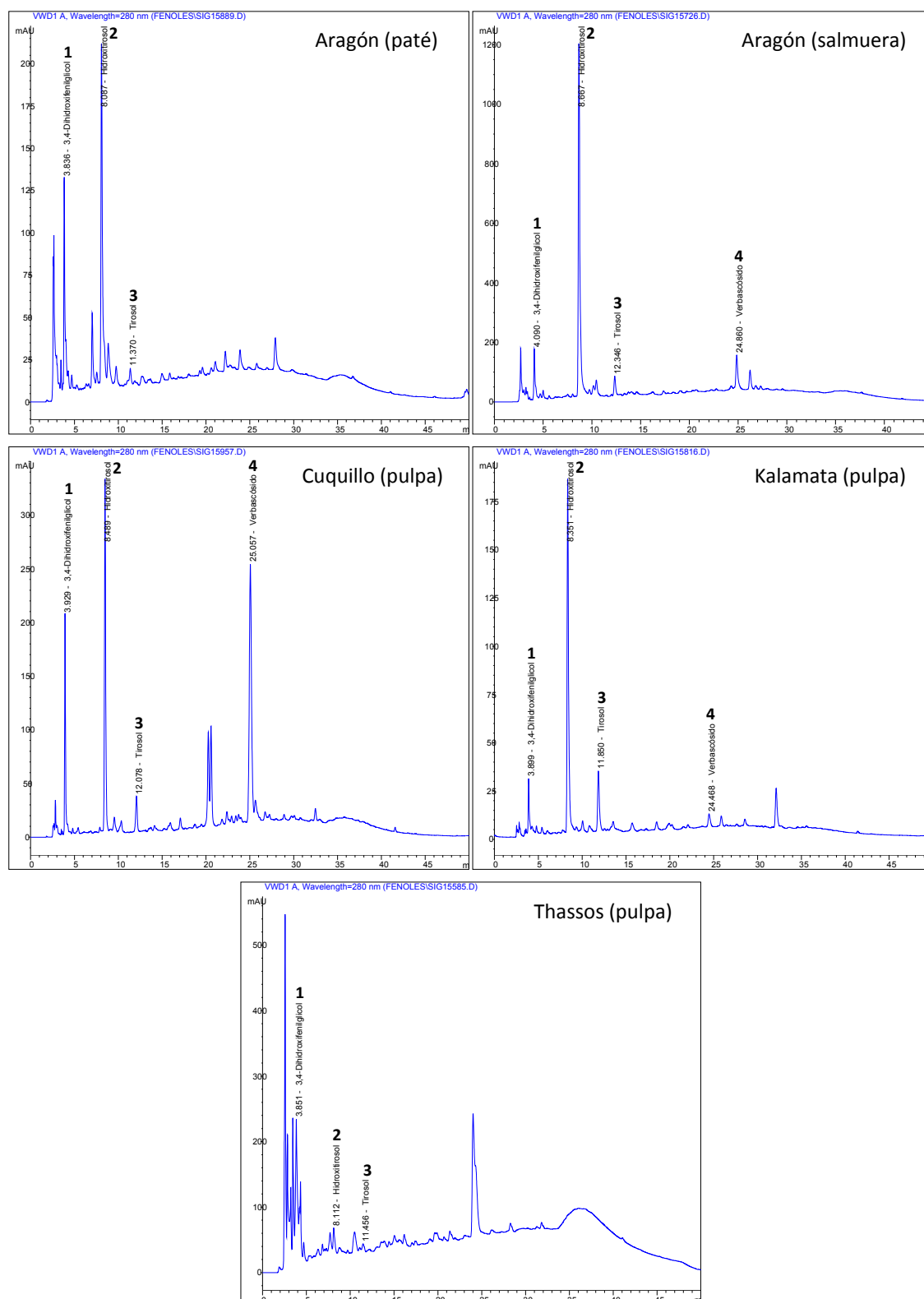


Figura 29. Perfiles fenólicos de las muestras de Aragón (paté y salmuera), Cuquillo, Kalamata y Thassos (pulpa). Picos: (1) DHFG, (2) hidroxitirosol, (3) tiroso y (4) verbascoído. Detección a 280 nm.

Tabla 18. Niveles de DHFG, hidroxitirosol (HT), tirosol y verbascósido para las 32 muestras de aceitunas de mesa estudiadas expresados en mg/kg de pulpa fresca (p.f.) y pulpa seca (p.s.). Relación pulpa/hueso y HT/DHFG.

Muestra	Humedad (%)	Relación pulpa/hueso	Relación HT/DHFG	[DHFG]		[HT]		[Tirosol]		[Verbascósido]	
				p.f.	p.s.	p.f.	p.s.	p.f.	p.s.	p.f.	p.s.
1E	52	1,6	8,9	53	110	471	982	64	133	81	168
2E	52	2,1	2,1	177	368	367	762	74	154	33	69
3E	52	1,9	6,8	61	127	418	871	48	100	115	240
4E	52	1,8	8,1	49	102	395	823	40	83	174	362
5E	52	1,6	7,9	51	107	404	842	31	64	56	117
6E	50	1,2	8,6	52	100	450	900	89	178	80	160
7E	45	-	2,6	106	193	271	493	nd ^b	nd	nd	nd
8E	52	1,3	9,9	60	124	593	1235	56	117	nd	nd
9E	51	1,9	18,5	32	66	592	1208	35	70	110	224
10E	43	1,6	1,4	147	259	199	350	34	60	51	89
11E	58	4,5	10,8	50	120	540	1286	82	194	nd	nd
12E	59	3,4	4,4	32	79	142	347	26	63	nd	nd
13K	63	4,9	19,4	28	75	543	1467	195	526	67	180
14K	64	4,1	34,5	13	36	449	1248	105	291	33	92
15K	66	4,8	8,2	34	99	278	819	90	266	nd	nd
16T	31	2,3	0,2	232	336	56	82	41	60	nd	nd
17T	28	2,6	0,5	223	309	116	161	nd	nd	nd	nd
18T	22	2,2	0,5	127	163	65	84	nd	nd	nd	nd
19T	20	2,5	1,2	94	117	112	140	nd	nd	nd	nd
20T	18	1,9	0,5	45	55	25	31	nd	nd	nd	nd
21Cu	57	1,9	6,2	97	227	601	1397	55	129	359	835
22Cu	53	2,7	4,0	171	353	685	1457	100	212	nd	nd
23Cu	52	2,2	2,3	139	290	317	660	60	125	nd	nd
24Co	68	2,6	6,0	43	134	257	803	nd	nd	37	117
25H	70	4,0	11,8	42	140	496	1653	31	105	230	765
26H	70	2,5	36,4	21	69	764	2547	70	235	24	78
27A	70	5,5	39,7	8	26	318	1059	99	328	nd	nd
28A	72	3,4	25,4	8	31	203	725	51	183	60	213
29Ma	72	5,0	53,5	11	39	589	2103	55	195	nd	nd
30Mz	75	2,0	80,9	12	50	971	3883	141	565	25	98
31Mz	77	1,8	25,8	12	54	310	1349	63	274	nd	nd
32V	62	7,5	59,3	11	30	652	1716	128	336	150	395

^a Promedio de dos replicados; el coeficiente de variación es < 7 %.

^b No detectado.

Tabla 19. Contenidos de DHFG, hidroxitirosol, tirosol y verbascósido expresados en $\mu\text{mol/L}$ de salmuera y de pulpa de las 32 muestras de aceitunas de mesa.

Muestra	[DHFG]		[HT]		[Tirosol]		[Verbascósido]	
	Salmuera	Jugo	Salmuera	Jugo	Salmuera	Jugo	Salmuera	Jugo
1E	611	599	4683	5877	543	890	94	250
2E	1810	1998	3749	4566	615	1028	56	102
3E	429	688	3425	5215	427	673	102	354
4E	517	552	4904	4930	449	550	125	266
5E	588	582	4028	5040	427	666	96	173
6E	470	588	4268	5838	391	644	nd	256
7E	- ^b	1387	-	3911	-	nd ^c	-	nd
8E	-	676	-	7394	-	782	-	nd
9E	-	370	-	7531	-	492	-	344
10E	-	2016	-	3010	-	579	-	189
11E	517	511	4930	6039	767	1020	nd	nd
12E	270	323	1349	1563	166	318	nd	nd
13K	247	259	4923	5585	1527	2236	99	170
14K	106	118	4313	4553	1064	1187	32	83
15K	259	300	2400	2821	695	992	nd	nd
16T	-	4402	-	1170	-	963	-	nd
17T	-	4672	-	2692	-	nd	-	nd
18T	-	3403	-	1920	-	nd	-	nd
19T	-	2762	-	3633	-	nd	-	nd
20T	-	1469	-	915	-	nd	-	nd
21Cu	940	1005	5098	6837	673	702	459	1009
22Cu	172	1892	5650	8380	514	1360	nd	nd
23Cu	113	1569	4450	3950	410	832	nd	nd
24Co	311	370	2504	2452	224	nd	61	88
25H	253	353	4514	4599	362	326	259	525
26H	170	176	6726	6824	615	1491	51	387
27A	65	65	2945	2945	745	1020	nd	nd
28A	71	71	1816	1849	550	514	74	133
29Ma	94	88	5195	5306	434	550	nd	nd
30Mz	100	100	7933	8393	1020	1361	27	53
31Mz	65	94	1784	2614	398	593	nd	nd
32V	88	106	6181	6824	1114	1491	245	387

^a Promedio de dos replicados; el coeficiente de variación es < 7 %.

^b Muestras sin salmuera.

^c No detectado.

5.2.2.- Comparación con otros métodos de extracción de compuestos fenólicos.

Una vez optimizado un método de extracción para la cuantificación de DHFG se procede a compararlo con los comúnmente usados para el análisis de fenoles. Varios son los disolventes y procedimientos de extracción utilizados en la bibliografía para la evaluación del contenido fenólico en aceitunas, aceite de oliva, alpechines y residuos sólidos de la aceituna. Los disolventes más empleados son acetato de etilo, etanol y mezclas acuosas de etanol y metanol ([Lesage-Meessen y col., 2001](#); [Vierhuis y col., 2001a](#); [Romero y col., 2002a](#); [Mulinacci y col., 2005](#); [Obied y col., 2005b](#)). El DHFG es un compuesto fenólico muy polar, totalmente soluble en agua, y menos soluble en los solventes usados para la extracción de polifenoles a partir de aceituna con metanol, etanol o mezclas alcohol/agua. Se ha estudiado la eficacia de la extracción de DHFG a partir de alperujo con agua y una solución metanol/agua 80:20 (v/v) a temperatura ambiente y después de un tratamiento del extracto a 90 °C durante 2 horas. La [Figura 30](#) muestra que la extracción acuosa en combinación con un tratamiento a 90 °C durante 2 horas es más efectiva para la recuperación de DHFG que la extracción con una mezcla metanol/agua.

En los procedimientos de extracción de compuestos fenólicos descritos en la bibliografía, los extractos obtenidos son redisolultos normalmente en metanol y en mezclas metanol/agua (1:1, v/v) o etanol/agua (7:3, v/v) y analizados directamente por HPLC. Se ha comprobado que el uso de estas mezclas puede conducir a errores en la cuantificación de DHFG por HPLC. Para ello se preparan soluciones de DHFG purificado de concentración conocida en mezclas de metanol/agua y etanol/agua aumentando en cada una el porcentaje de metanol y etanol. En las [Figuras 31a y 32b](#) puede verse la evolución del pico cromatográfico de DHFG al aumentar el porcentaje de metanol y etanol en las mezclas (desdoblamiento y deformación del pico y, por tanto, la cuantificación proporciona valores de concentración por defecto). Este hecho se observa en las soluciones de metanol a partir del 50 % y en soluciones de etanol a partir del 20 %, y en distintas columnas de fase reversa C18 (Spherisorb[®] ODS2, 5 µm, 4,6 x 250 mm, Waters; LiChrospher[®] 100, 5 µm, Merck y Synergi Hydro-RP 80A, 4 µm, 4,6 x 250 mm, Phenomenex). El pico desdoblado muestra el mismo espectro de absorbancia ultravioleta-visible que el DHFG. Cuando se evapora el etanol o el metanol y el compuesto se redisuelve en agua, el cromatograma muestra nuevamente un pico correspondiente a DHFG y la concentración se corresponde con la inicial. La interacción del etanol y el metanol con el DHFG conduce, sin duda, a una errónea cuantificación del compuesto. Este hecho pudiera ser el motivo de los escasos datos bibliográficos que existen acerca de este interesante compuesto antioxidante y de la poca atención que se le ha prestado.

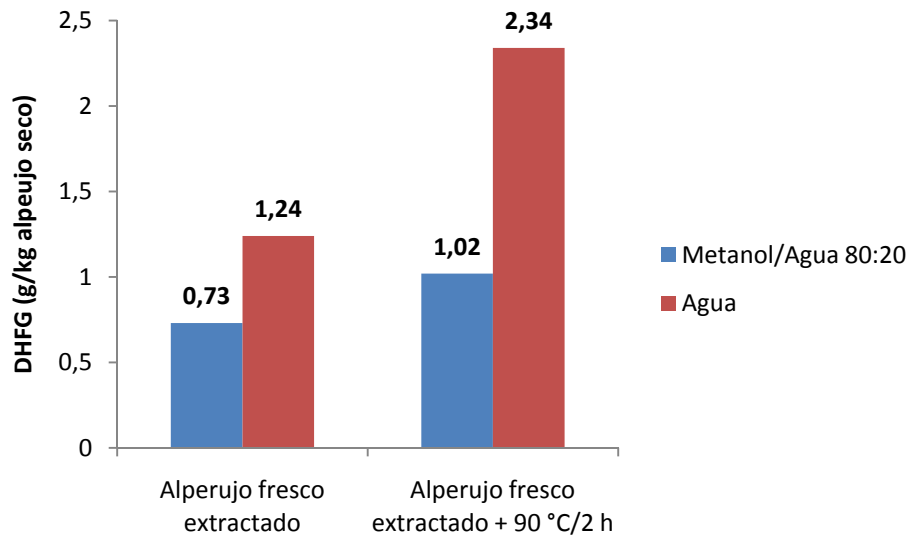


Figura 30. Comparación de los resultados obtenidos con la extracción acuosa y mediante el método de extracción con MeOH/H₂O. Los extractos obtenidos de cada método se sometieron a un posterior tratamiento térmico de 90 °C durante 2 horas.

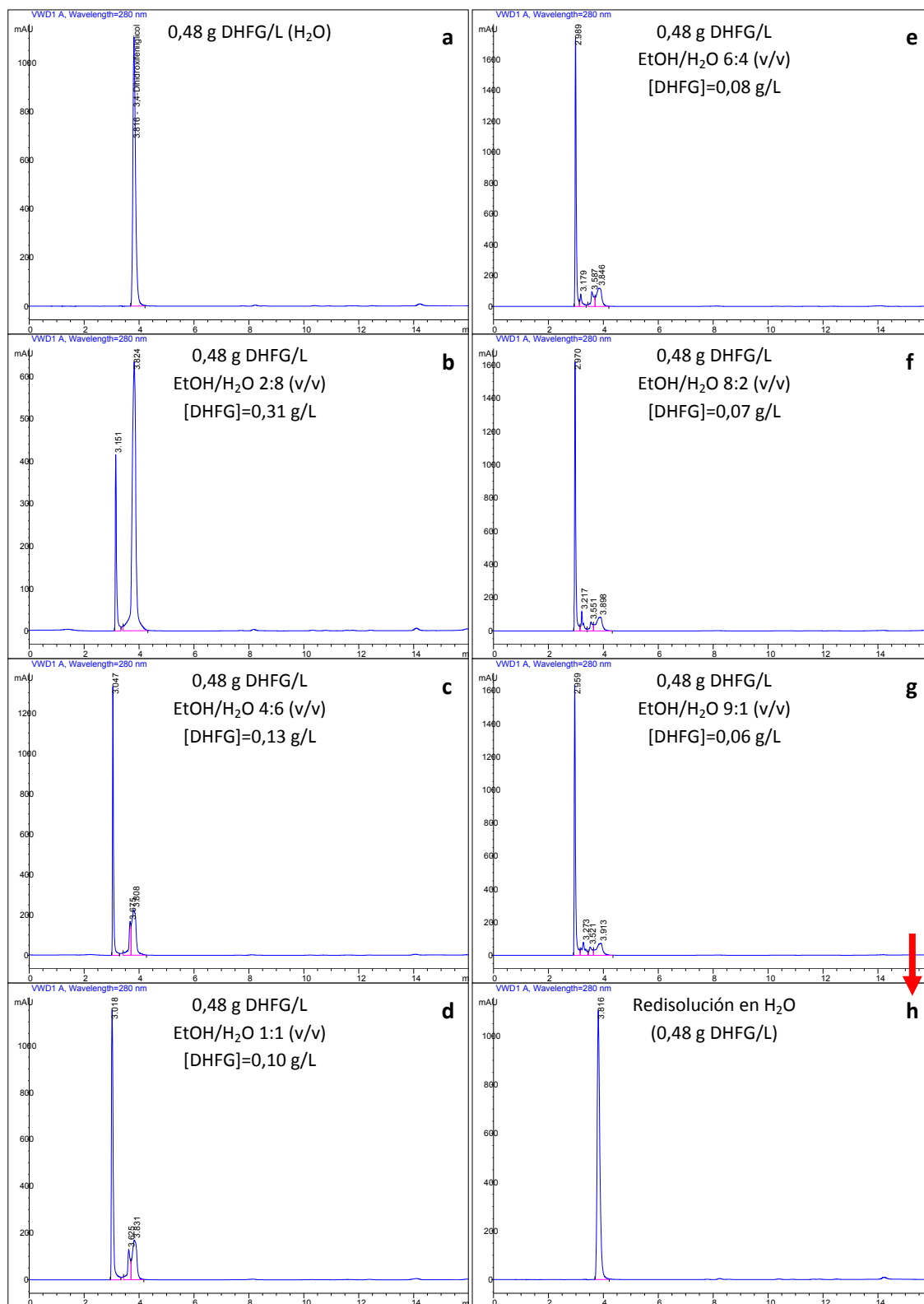


Figura 31a. Cromatogramas a 280 nm de DHFG comercial en agua (a) y en soluciones etanol/agua. Evolución del pico al aumentar el porcentaje de etanol en la mezcla (cromatogramas b-g). La solución de DHFG en etanol/agua al 90 % (v/v) se lleva a sequedad y el residuo se redissuelve en agua (cromatograma h).

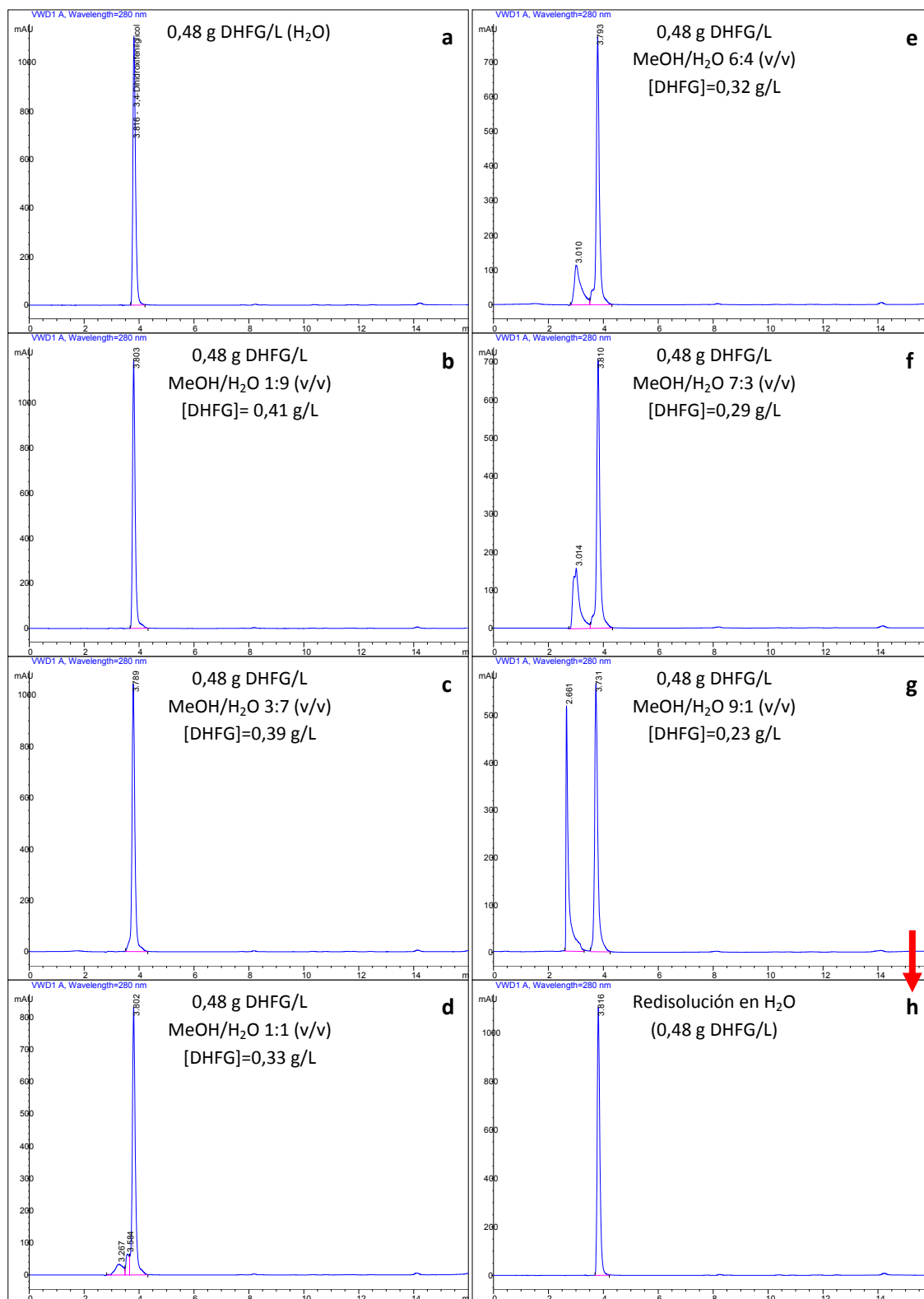


Figura 31b. Cromatogramas a 280 nm de DHFG comercial en agua (a) y en soluciones metanol/agua. Evolución del pico al aumentar el porcentaje de metanol en la mezcla (cromatogramas b-g). La solución de DHFG en metanol/agua al 90 % (v/v) se lleva a sequedad y el residuo se redissuelve en agua (cromatograma h).

5.2.3.- Estudio de estabilidad del DHFG en alpechines industriales.

Actualmente, el alperujo se destina mayoritariamente al uso como biocombustible para la cogeneración de energía eléctrica después de la extracción del aceite residual. Con el fin de reducir el contenido de humedad previamente a su combustión, el alperujo es normalmente tratado mediante una serie de procesos tecnológicos. Un tratamiento térmico suave del alperujo, del cual no se conocen datos y que está implantado a nivel industrial, y una centrifugación posterior permite la recuperación de una nueva clase de alpechín con una buena parte de los compuestos fenólicos del alperujo. En este trabajo de investigación, se ha estudiado este nuevo alpechín obtenido a nivel industrial a partir de alperujo almacenado como una fuente económica de antioxidantes naturales y de DHFG.

La presencia de DHFG se confirma en estos nuevos alpechines (*Figura 32*), y aparece en cantidades significativas. Las concentraciones iniciales de DHFG en dos muestras diferentes de este nuevo alpechín son de 430 y 240 mg/L. Estas diferencias probablemente provienen de la inherente variabilidad en la composición del alperujo a nivel industrial. Se realiza un ensayo en el que ambas muestras de alpechín se almacenan en depósitos a diferentes pH. El pH de la primera muestra (4,5) no se corrige, mientras que el pH de la segunda muestra se ajusta a 3 con ácido sulfúrico concentrado.

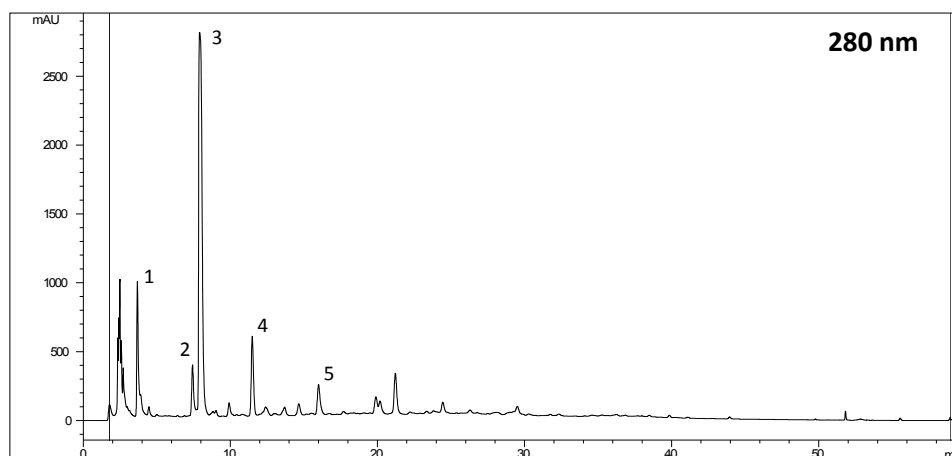


Figura 32. Cromatograma a 280 nm de los compuestos fenólicos en alpechín industrial de alperujo almacenado. Picos: (1) DHFG; (2) hidroxitirosol 4-β-D-glucósido; (3) hidroxitirosol; (4) tirosol; (5) ácido cafeico.

A continuación, se hizo un seguimiento de la evolución de la concentración de DHFG. En la primera muestra, después de 9 meses de almacenamiento a temperatura ambiente, la concentración de DHFG permanece aproximadamente constante en un valor de 450 mg/L, lo cual indica que el compuesto es estable en estas condiciones y a un valor de pH típico de un alpechín (4,5-5). En la segunda muestra, almacenada bajo condiciones más ácidas y temperaturas

diferentes (8, 25, 35 y 50 °C), se observan cambios en la concentración de DHFG (*Figura 33*). Las concentraciones de este compuesto aumentan hasta un 35 % con respecto a la concentración inicial para todas las temperaturas en los primeros días, y disminuyeron lentamente a medida que transcurría el almacenamiento. Después de 125 días de almacenamiento a 8 y 25 °C, la concentración de DHFG permanece constante, mientras que a 35 y 50 °C, la concentración continua disminuyendo por debajo de los valores de concentración inicial. El aumento de la concentración de DHFG al principio del almacenamiento, para todas las temperaturas de ensayo, es el hecho más destacable. Este cambio puede estar relacionado con el aumento de la concentración que también se produce en los extractos acuosos de alperujo con el calentamiento a 90 °C durante 2 horas (*Tablas 16 y 17*) y sugiere la presencia de uno o más compuestos solubles que contienen al DHFG en su estructura molecular o bien un tipo de reacción que implica la formación de DHFG. La hidrólisis de estos compuestos o la reacción mencionada ocurrirían probablemente durante el almacenamiento, actuando como precursores y liberando DHFG adicional. Hay que destacar que estas observaciones no habían sido descritas hasta ahora.

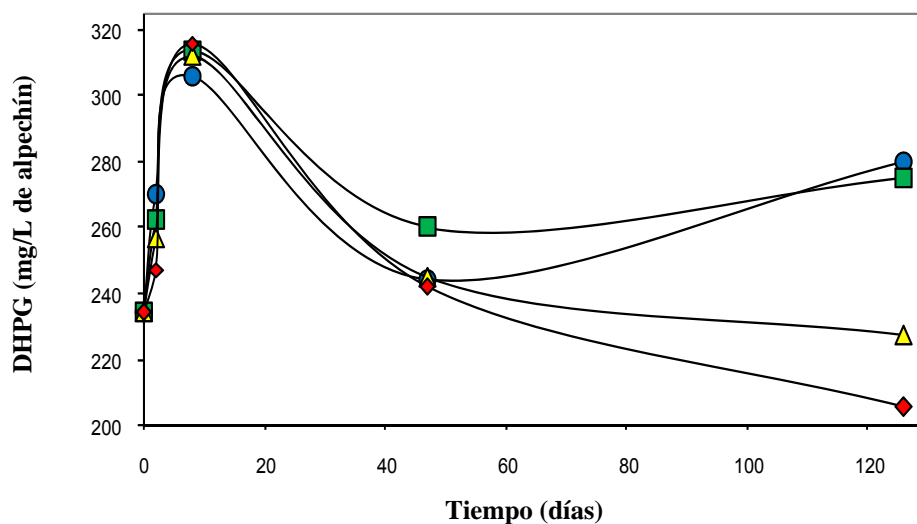


Figura 33. Evolución del DHFG en los alperchines industriales almacenados en condiciones ácidas ($\text{pH} = 2,9$) a diferentes temperaturas (\circ) 8 °C; (\square) 25 °C; (\triangle) 35 °C y (\diamond) 50 °C durante 125 días.

5.2.3.1.- Estudio del origen del DHFG.

La recuperación del DHFG aumenta significativamente tras el calentamiento de los extractos acuosos a 90 °C durante 2 horas. Este hallazgo indica que en los extractos acuosos, una vez separados del alperujo como fuente primaria de DHFG, han de solubilizarse otras sustancias (precursores) que contienen al DHFG en su estructura y que lo liberan con el post-tratamiento, o bien ocurre una reacción química que implica su formación. Se realiza el estudio de la presencia y naturaleza de estos precursores mediante el análisis de los cambios en los extractos acuosos de alperujo fresco y en los nuevos alpechines industriales, bajo las condiciones de tratamiento térmico suave antes descritas y post-tratamiento a 90 °C durante 2 horas ([Tablas 16 y 17](#)).

La liberación de DHFG podría ser producida químicamente por una posible reacción de hidrólisis química de los precursores. Este hecho está apoyado por el pH ácido de los alpechines (4,5-5,0) y descarta la intervención de cualquier proceso enzimático (por ejemplo, hidrólisis) que no es probable en las condiciones de pH, temperatura y tiempo de calentamiento en que se realizaron los post-tratamientos. La [Figura 34](#) muestra la variación en el perfil cromatográfico de los compuestos fenólicos presentes en la fracción acuosa obtenida de una extracción a 50 °C durante 1 hora y después del post-tratamiento a 90 °C durante 2 horas. El aumento observado en la concentración de DHFG no coincide con la variación de la concentración de otros compuestos conocidos (hidroxitirosol, tirosol o sus glucósidos), cuyos valores se mantienen prácticamente constantes. Este hecho descarta a los dímeros de hidroxitirosol-DHFG o tirosol-DHFG, aislados e identificados en alpechines ([DellaGreca y col., 2004](#)), como posibles precursores de DHFG, pues la ruptura de estos dímeros supondría un aumento de la concentración de hidroxitirosol y tirosol. También es descartable la hipótesis de una reacción de oxidación del hidroxitirosol, que se iniciaría con la formación de una *o*-quinona y posterior adición de agua para dar una hidroxilación de la cadena carbonada ([Roche, 2005](#)), lo que implicaría una disminución de la concentración de hidroxitirosol.

Un derivado del ácido hidroxicinámico, similar al verbascósido pero que contiene al DHFG en su estructura, ha sido aislado a partir de plantas de la familia *Oleaceae* ([Nishibe, 2002](#)) y recientemente identificado en *Olea europaea*, en forma de dos diastereoisómeros de β -hidroxiacteósido ([Innocenti y col., 2006](#)). También recientemente, ha sido descrita por primera vez la presencia de 2-hidroxioluropeína en aceituna ([Di Donna y col., 2007](#)). Por lo tanto, estos dos compuestos pueden ser hipotéticos precursores que expliquen el aumento en la concentración de DHFG con el post-tratamiento.

Continuando con el estudio de la posible presencia de estas sustancias solubles en agua que actúen como precursores del DHFG, se realizó un estudio detallado de los datos HPLC-DAD de los compuestos fenólicos con el fin de detectar cambios de composición en los extractos acuosos. Estos compuestos se solubilizaron a partir de alperujo fresco y a continuación sometidos

a un post-tratamiento a 90 °C durante 2 horas. Sin embargo, el perfil cromatográfico hace difícil la identificación de los precursores de DHFG, porque no hay picos que varíen clara y proporcionalmente con el pico de DHFG. Por lo tanto, en futuros trabajos será necesario profundizar más en este análisis, aislando fracciones que faciliten la identificación cromatográfica.

También se observa que el DHFG es uno de los principales compuestos detectados en la fracción solubilizada a partir de alperujo fresco, mediante las condiciones de extracción mencionadas, mostrando un pico mayoritario a 280 nm (*Figura 34*), y que está respaldado por el artículo de [Bianchi y Pozzi, 1994](#), únicos autores que consideran al DHFG como un componente mayoritario de la fracción fenólica de la aceituna. La liberación de DHFG es notable durante la extracción y los procesos de hidrólisis, mientras que variaciones mínimas se observan en las cantidades de tirosol, hidroxitirosol y glucósido de hidroxitirosol después del post-tratamiento. Sin embargo, si el alperujo es almacenado se producen ciertas reacciones que facilitan la liberación de hidroxitirosol siendo éste el principal compuesto detectado en los alpechines obtenidos a nivel industrial, en concentraciones aproximadamente 10 veces más altas que el DHFG (*Figura 32*). Puesto que es la primera vez que se describe el aislamiento de DHFG a partir de alperujo (fresco o almacenado), el método de extracción propuesto puede utilizarse como un sistema viable para alcanzar altos niveles de este compuesto fenólico en forma libre.

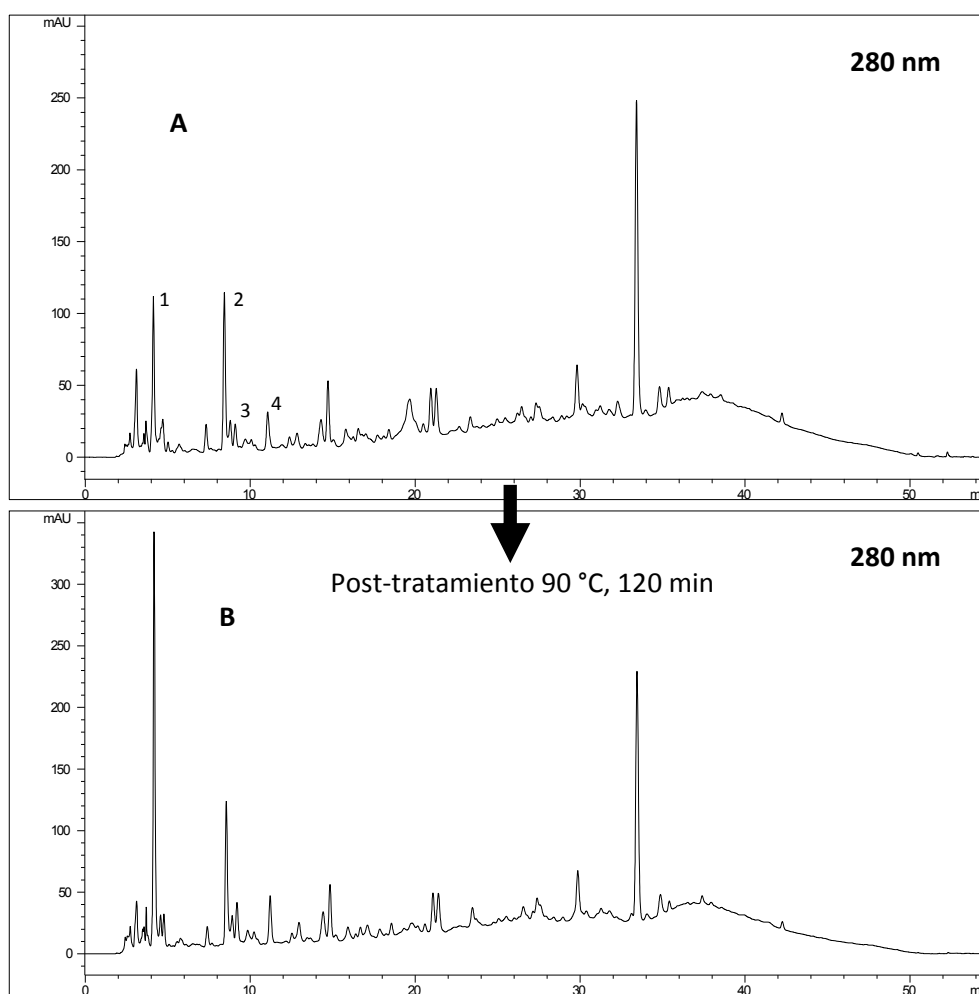


Figura 34. Comparación de los cromatogramas de los compuestos fenólicos de los extractos acuosos a partir de alperujo fresco tratado a 50 °C durante 1 hora (A) y después de un post-tratamiento a 90 °C durante 2 horas (B). Picos: (1) DHFG; (2) hidroxitirosol 4- β -D-glucósido; (3) hidroxitirosol; (4) tirosol.

5.2.4.- Sistema de purificación del DHFG.

El procedimiento de purificación de DHFG que se describe en este trabajo se basa en la experiencia adquirida a lo largo del desarrollo de un sistema para la purificación de hidroxitirosol a nivel de laboratorio y semiindustrial ([Fernández-Bolaños y col., 2002b](#)) a partir de un alpechín, una fase acuosa procedente de la filtración o centrifugación de un alperujo sometido a un tratamiento térmico y/o cualquiera otra fuente líquida de hidroxitirosol. Dicho sistema es un método cromatográfico en dos etapas con resinas, aniónica fuerte y adsorbente polimérica.

El DHFG es un compuesto muy similar al hidroxitirosol ya que tiene la misma estructura molecular orto-difenólica a excepción de un grupo hidroxilo adicional en la posición β . El hidroxitirosol destaca del resto de compuestos fenólicos por sus múltiples actividades biológicas como inhibidor de la agregación plaquetaria y de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), antimicrobiano e inductor de apoptosis entre otras y se le atribuyen efectos neuroprotectores además de otros usos farmacológicos. Muchas de estas propiedades del hidroxitirosol, algunas explicables en parte por su elevado poder antioxidante, podrían darse también en el DHFG. El DHFG es además el principal metabolito producido por la desaminación del neurotransmisor humano noradrenalina ([Venneri y Del Rio, 2004](#)). Por todo ello, y por su posible actividad biológica el DHFG podría tener un notable interés en el campo de la nutrición y la farmacología.

El DHFG puede considerarse como un antioxidante natural, ya que tiene una alta capacidad antioxidante *in vitro*, siendo incluso superior a la del hidroxitirosol ([Rodríguez y col., 2007b](#)), por lo que el DHFG puede tener un importante papel en la prevención de diversas patologías causadas por los radicales libres y las especies de oxígeno reactivas. El primer paso en estos estudios es la purificación del compuesto con un alto grado de pureza. Es necesario desarrollar un sistema viable de extracción y purificación que permita obtenerlo en cantidades suficientes como para que se verifique su producción y se puedan llevar a cabo los pertinentes ensayos de actividad biológica.

Por lo tanto, sería deseable desarrollar un nuevo procedimiento cromatográfico para la recuperación y/o purificación eficientes, a nivel de laboratorio primero y después a mayor escala, a nivel semiindustrial o de planta piloto, con el que se logre producir este compuesto con una pureza elevada, a un tiempo que también contribuiría a aumentar la rentabilidad de los subproductos de extracción del aceite de oliva.

5.2.4.1.- Ensayos previos de purificación de DHFG.

En el procedimiento para la purificación de hidroxitirosol ([Fernández-Bolaños y col., 2002b](#)) se genera un efluente que contiene DHFG en cantidades significativas. Dicho efluente es el que se empleará en los primeros ensayos, estando la composición porcentual de DHFG en este efluente comprendida entre el 40 y el 50 % con respecto al hidroxitirosol, y siendo su grado de pureza del 5 % en peso.

Ensayo en resina adsorbente Amberlite XAD16

Como punto de partida para desarrollar la purificación de DHFG se realizó un ensayo previo con la resina Amberlite XAD16. La resina Amberlite XAD16 es un adsorbente polimérico no iónico para la adsorción de sustancias orgánicas de relativamente bajo a medio peso molecular. Los procesos de adsorción son ampliamente utilizados en la purificación de aguas residuales que contienen fenoles. Es interesante el hecho de que las operaciones de adsorción son capaces de concentrar solutos, especialmente útil cuando estos solutos son compuestos fenólicos valiosos, como es el caso del DHFG. La adsorción de compuestos fenólicos en diferentes adsorbentes poliméricos ha sido estudiada por varios investigadores ([Crook y col., 1975](#); [Deosarkar y Pangarkar, 2004](#)). La resina Amberlite XAD16 es un adsorbente de uso común en la industria y se ha estudiado, por ejemplo, para la eliminación o separación y recuperación de fenol, *p*-clorofenol y ácido salicílico presentes en los efluentes residuales de diferentes industrias ([Abburri, 2003](#); [Otero y col., 2005](#); [Burghoff y col., 2008](#)). La resina Amberlite XAD16 ha demostrado que es una excelente elección en este tipo de aplicaciones.

La resina Amberlite XAD16 se transfiere a una columna de vidrio de 30 x 2 cm de diámetro interno, hasta formar un lecho de 15 cm de altura, provista de placa porosa que actúa como soporte del lecho de resina. Ésta se prepara lavando con una solución acuosa de etanol al 80 % y enjuagando con agua desmineralizada. A continuación, 50 mL del efluente previamente mencionado, proveniente de la purificación de hidroxitirosol, se introducen en la columna. La elución se realiza con agua en lugar de etanol o metanol-agua para diferenciar esta etapa del proceso de purificación de hidroxitirosol. Considerando la diferencia de polaridad (que depende de los grupos funcionales) entre DHFG e hidroxitirosol (el primero tiene mayor polaridad que el segundo), un aumento en la polaridad de la fase móvil o eluyente hace que el DHFG se eluya más rápidamente con agua. Así pues, el agua desplaza preferentemente al DHFG a mayor velocidad que el hidroxitirosol, de forma que se obtienen fracciones de DHFG e hidroxitirosol separadas. Se reúnen las fracciones que contienen DHFG y se evapora a vacío a temperatura no superior a 35 °C para determinar por gravimetría la pureza. El licor de DHFG tiene una baja pureza que oscila entre el 10 y el 15 % en peso seco.

5.2.4.2.- Ensayos con resinas de intercambio iónico.

Los primeros ensayos con resinas de intercambio iónico se llevan a cabo para corregir el pH de los efluentes de DHFG. La etapa de concentración de dichos efluentes produce la degradación del DHFG que supone una pérdida aproximada del orden de un 50 % a consecuencia del pH fuertemente ácido (1,8). Posteriormente y gracias a sus propiedades éstas se emplearon para la purificación del compuesto.

Ensayos en vasos de precipitación

Se usa una resina de intercambio catiónico Amberlite 200C (Rohm and Haas, Midland, EE. UU.) y una resina de intercambio aniónico Dowex MWA-1 (Dow Chemical, Midland, EE. UU.). Estas resinas de intercambio iónico se eligen porque se utilizan en el tratamiento de aguas residuales ([Hubicki y col., 1999](#)) y se aplican a distintos procesos dentro de la industria alimentaria como la recuperación y purificación de diversos compuestos ([Baumeister y col., 2003](#)). Además, tienen gran capacidad para eliminar impurezas orgánicas gracias a sus estructuras macroporosas. En vasos de precipitación se agita magnéticamente una cierta cantidad de las resinas con la solución de DHFG a una velocidad de agitación moderada durante 30 minutos, tiempo tras el que se retiran las resinas mediante filtración. La resina catiónica aumentó el pH de la solución de 1,8 a 2,3 y la aniónica de 1,8 a 5,5. También se observa que la resina 200C apenas si tiene afinidad por DHFG (sólo adsorbe el 10 %) mientras que la resina MWA-1 presenta una afinidad “selectiva” por DHFG reteniendo un 70 % del mismo. De esta manera se encuentra una resina que tiene una alta selectividad de absorción y elución para el DHFG. La resina MWA-1 permite la retención del DHFG y la separación de las impurezas contenidas en la solución de DHFG, las cuales no son absorbidas, a un tiempo que aumenta su pH.

Ensayo con resina aniónica débil MWA-1

Se realiza un ensayo de retención y purificación del compuesto en columna con la resina aniónica débil MWA-1, a partir de otro efluente obtenido de la purificación de hidroxitirosol (de pH 2,5 y pureza 13 % en peso) y con una concentración de 4,7 g/L de DHFG. Un volumen de 50 mL se carga en una columna de vidrio de 2 cm de diámetro interno y 15 cm de altura de lecho de resina. Seguidamente, la columna se eluye con agua, lo que permitió obtener un efluente de DHFG. De forma que el DHFG es selectivamente desplazado de la resina con una pureza muy elevada, de hasta el 94 % (experiencia 1 de la [Tabla 20](#)). El porcentaje de recuperación o rendimiento de esta etapa cromatográfica es del 96 % expresado como porcentaje de la cantidad de DHFG contenida en las fracciones eluidas respecto a la cantidad total de DHFG cargado en la columna. A la vista del buen resultado obtenido, se llevan a cabo otras tres experiencias (experiencias 2 a 4 de la [Tabla 20](#)) para estudiar el comportamiento de la resina frente a distintas concentraciones iniciales de DHFG comprendidas entre 0,2 y 1,3 g/L (licores provenientes de la

purificación de hidroxitirosol). Un volumen de 50 mL de cada uno es introducido en columnas de vidrio de 2 cm de diámetro interno y 15 cm de resina MWA-1, manteniendo constante la relación altura/diámetro (7,5). Los eluidos se recogen en diferentes fracciones de 50 mL hasta eluir casi totalmente el DHFG con un volumen de 600 mL. Una vez recogidas todas las muestras, se reúnen en cuatro fracciones del mismo volumen (150 mL), se toman alícuotas de cada una y se determina la concentración de DHFG mediante HPLC y su pureza en peso. Del análisis de las fracciones resulta que incluso en el licor de carga cuyo contenido en DHFG es relativamente bajo (0,5 g/L), el uso de la resina permite obtener el DHFG con una pureza muy elevada y un rendimiento similar. Los valores de pureza y la proporción de DHFG de las cuatro experiencias se recogen en la [Tabla 20](#).

Tabla 20. Resultados de los ensayos de intercambio iónico con la resina MWA-1. Las fracciones que eluyen de las columnas se recogen y agrupan en cuatro (de 150 mL cada una), y se analizan los siguientes parámetros: concentración de DHFG, pH, pureza y rendimiento o porcentaje de recuperación.

	[DHFG] _{carga} (g/L)	Fracción	[DHFG] _{descarga} (g/L)	pH	Pureza (%)	Rendimiento global (%)
Experiencia 1	4,7	1	0,63	6,8	21	96
		2	0,51	6,1	73	
		3	0,28	6,0	94	
		4	0,08	5,8	83	
Experiencia 2	0,2	1	0,01		- ^a	90
		2	0,02		-	
		3	0,02		-	
		4	0,01		-	
Experiencia 3	0,5	1	0,04	7,2	31	90
		2	0,05	6,8	98	
		3	0,04	6,5	97	
		4	0,03	6,2	88	
Experiencia 4	1,3	1	0,14	7,6	9	97
		2	0,16	7,0	38	
		3	0,09	6,9	99	
		4	0,04	6,8	85	

^a Los datos de pureza no se muestran debido a la baja concentración de DHFG en las fracciones.

Ensayos de purificación en diferentes resinas aniónicas débiles

Se demuestra que usando la resina de intercambio iónico anterior para la purificación de una solución de DHFG es posible conseguir un nivel de pureza superior al 90 %. Este logro supone un paso importante, pues no se ha obtenido nunca DHFG de una fuente natural en tan alto grado de pureza. La pureza que se obtiene demuestra la selectividad y eficacia de la resina empleada para la recuperación y/o purificación de este compuesto. Sin embargo, antes de elegir esta resina para la purificación de DHFG, se realizaron ensayos para evaluar el comportamiento de otras resinas de naturaleza aniónica débil y compararlo con el que presenta la resina anteriormente usada Dowex MWA-1 (Dow Chemical, Midland, EE.UU.). Se seleccionan cuatro resinas en los ensayos entre las más comúnmente usadas en el laboratorio: Amberlite IRA-67, Amberlite IRA-96, Lewatit MP 62 y Lewatit MonoPlus MP 64 (Sigma, St. Louis, EE. UU.). Se utilizaron columnas de vidrio de 2 cm de diámetro. Las resinas se acondicionan únicamente con agua destilada. A través de un lecho de resina de 15 cm de altura se hace pasar por las columnas 50 mL de una solución de DHFG de 0,5 g/L. En todas las resinas, la retención de DHFG fue completa. La elución se efectúa con agua y se recogen fracciones de 50 mL. La variación del contenido en DHFG, eluido de las columnas, y expresada en % respecto a la cantidad total de DHFG cargado en la columna, se representa en la [Figura 35](#) en función del volumen recogido con agua.

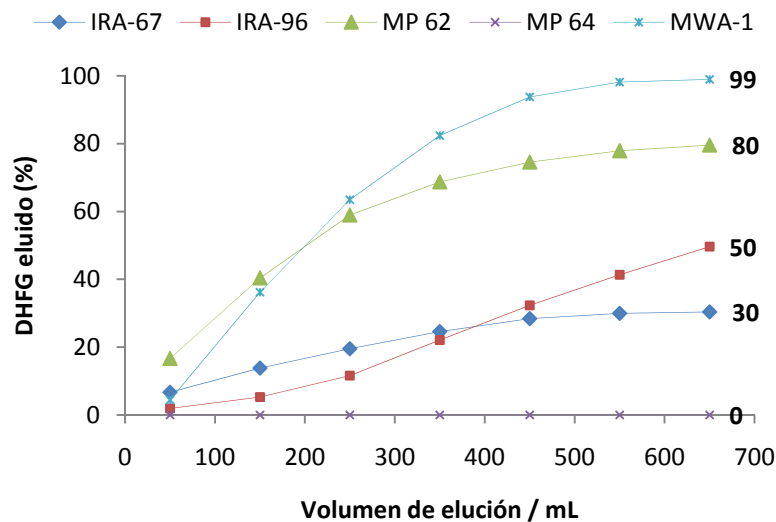


Figura 35. Curvas de elución de DHFG en diferentes resinas aniónicas débiles.

La gráfica muestra que ninguna de las resinas empleadas consigue mejorar el comportamiento de la resina Dowex MWA-1. Ésta consigue una elución y separación más eficiente (es necesario menos eluyente para una desorción superior al 90 %), en condiciones de funcionamiento equivalentes. Los porcentajes de DHFG recuperado tras la purificación en columna son más bajos que los obtenidos usando la resina MWA-1, en concreto, 30, 50, 80 y 0 %,

respectivamente a igual volumen de elución. El DHFG es más fuertemente retenido por las resinas utilizadas en este ensayo. La resina Dowex MWA-1 es la mejor elección en la purificación de soluciones de DHFG por el elevado rendimiento de elución. Por lo tanto, el uso de la resina MWA-1 se convierte en un factor clave en la purificación de soluciones acuosas de DHFG por los altos rendimientos de elución y la pureza obtenida.

5.2.4.3.- Ensayos de purificación de DHFG a nivel de laboratorio a partir de la fase acuosa obtenida del tratamiento térmico del alperujo.

A diferencia de los ensayos anteriores, en los cuales se habían usado soluciones acuosas de DHFG provenientes de la purificación de hidroxitirosol, los procedimientos de aislamiento y purificación de DHFG que se describen más adelante se han desarrollado a partir de la fracción líquida obtenida después de la centrifugación o filtración de alperujo sometido a un tratamiento térmico. Se pretende así establecer por primera vez un sistema completo de purificación de DHFG a partir de su fuente primaria. El paso previo es el pretratamiento inicial del alperujo para el cual 30 kg de alperujo fresco se someten a un tratamiento térmico a 150 °C durante 15 minutos. Tras este tratamiento el alperujo se somete a un proceso de centrifugación que separa el sólido y proporciona una fase o fracción acuosa de 19 L fuente de DHFG, en la que se encuentra solubilizado en una concentración de 0,2 g/L. Esta constituye la fracción denominada A1 (*Figura 36*).

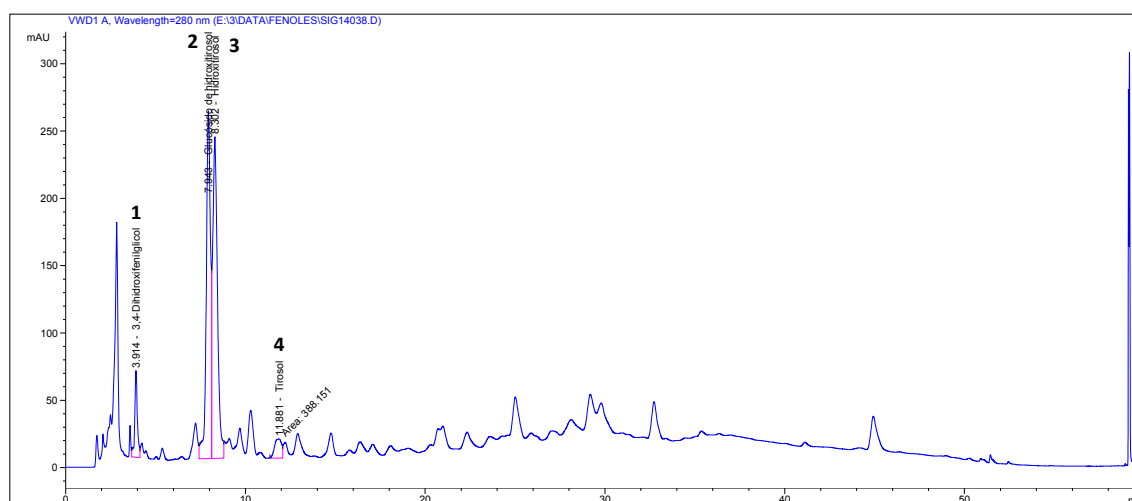


Figura 36. Cromatograma a 280 nm de la fracción A1, en el cual están señalados los principales compuestos fenólicos. Picos: (1) DHFG; (2) glucósido de hidroxitirosol; (3) hidroxitirosol y (4) tirosol.

Con base en los resultados obtenidos en los ensayos previos y en el hecho de que la solución de partida había sido parcialmente purificada mediante resinas de intercambio iónico y adsorción se puede deducir que la purificación de DHFG necesita de una combinación de etapas

de dichas resinas. La separación de compuestos fenólicos del agua de las aceitunas (alpechines) y de otros componentes de las aceitunas y sus residuos (alperujos), puede efectuarse por adsorción con resinas poliméricas del tipo XAD. La resina XAD16, por ejemplo, proporciona un procedimiento para el aislamiento de fenoles antioxidantes a partir de residuos de la producción del aceite de oliva ([Cuomo y Rabovski, 2001](#); [Johannisbauer y col., 2003](#)). Pero, sin duda, la resina aniónica débil MWA-1 es una excelente elección por su selectividad para la retención del DHFG, su eficacia en su purificación y sus elevados rendimientos de elución. Sin embargo, la fuente original de DHFG tiene el inconveniente de que, debido a su alto contenido en materia orgánica, encarecería el uso de las resinas XAD16 y MWA-1. En este sentido, la resina Amberjet A4200 es un intercambiador aniónico de base fuerte que tiene una muy buena afinidad por los compuestos fenólicos, como lo demuestran las experiencias de purificación de hidroxitirosol ([Fernández-Bolaños y col., 2002b](#)), y es adecuada para separarlos de la mayoría de las sustancias orgánicas de la fase acuosa del alperujo, por lo que sería una buena candidata para utilizarla en la primera etapa de purificación del DHFG.

Una vez seleccionadas las resinas, hay que establecer un procedimiento para la purificación. Es necesario estudiar y evaluar varios esquemas de purificación para obtener el diseño óptimo mediante una combinación de las resinas Amberjet 4200, Amberlite XAD16 y Dowex MWA-1. Algunas de las características físicas básicas de las resinas empleadas en el procedimiento de purificación se reúnen en la [Tabla 21](#). El fabricante de cada tipo de resina suministra información detallada sobre sus propiedades y comportamiento.

Tabla 21. *Propiedades físicas de las resinas de intercambio iónico y adsorción usadas en los ensayos de purificación de DHFG.*

Resina	Amberjet 4200	Amberlite XAD16	Dowex MWA-1
Tipo	Intercambio aniónico tipo 1 base fuerte	Adsorbente	Anión débil
Matriz	Estireno-Divinilbenceno	Polímero alifático macrorreticular	Estireno-Divinilbenceno, macroporosa
Grupo funcional	Amina cuaternaria	-	Amina terciaria
Forma iónica	Cl ⁻	No iónica	Base libre
Capacidad (eq/L)^a	> 1,3	-	1,3

^a Cantidad de iones que una resina puede intercambiar en determinadas condiciones experimentales (un equivalente es el peso molecular en gramos del compuesto dividido por su carga eléctrica).

El diseño de una secuencia óptima responde al requisito de obtener un compuesto con el máximo grado de pureza y el máximo rendimiento con el menor número de etapas. En cada etapa se pierde DHFG, por lo que hay que minimizar el número de operaciones y combinar los pasos de manera lógica para conseguir reducir los costos de la purificación. Son posibles varias

configuraciones y en diferente orden (en suma, seis posibilidades sin repetición). Sin embargo, se descartan las combinaciones en las que la primera etapa consiste en la utilización de una columna de la resina de adsorción XAD16 como fase estacionaria. El motivo es que esta resina tiene gran capacidad de adsorción de sustancias orgánicas de relativamente bajo a medio peso molecular. Esta característica limita la utilización de esta resina, en vista de los compuestos orgánicos contenidos en el alpechín y/o en la fase acuosa del tratamiento térmico del alperujo (ácidos orgánicos, hidrocarburos, lípidos, polialcoholes, polifenoles y proteínas), como fuentes directas de DHFG para la purificación. En estas condiciones hay que someter a la resina a regeneraciones periódicas cada pocos ciclos de carga con la ayuda de álcali (hidróxido sódico), peróxido de hidrógeno y de solventes orgánicos que encarecen considerablemente el proceso. Teniendo en cuenta, además, que esta resina tiene menor resistencia mecánica y estabilidad química y que su coste es aproximadamente tres veces mayor que el de las resinas iónicas, son inconvenientes suficientes que no aconsejan su empleo. Razones éstas por las que se prescinde de ella como primera etapa en el sistema de purificación de DHFG.

Para el estudio de purificación, los experimentos a escala de laboratorio se realizan con columnas de metacrilato con un diámetro interno de 7 cm y 1 m de longitud. Para obtener la máxima eficacia, el relleno de las columnas debe estar uniformemente empaquetado, evitando que se formen canales preferenciales o burbujas de aire en su interior. En todas las etapas de los procesos cromatográficos que se describen, la elución se efectúa con agua como único eluyente y la velocidad de flujo se mantiene constante e igual a 0,3 L/h.

A continuación se describen los posibles cuatro esquemas de proceso para la obtención y purificación de DHFG. La fracción A1 se divide en cuatro partes iguales, 4,75 L que contienen 0,95 g de DHFG, y cada una de ellas se utiliza (como licor de carga) para realizar los siguientes cuatro procedimientos de purificación:

Esquema de purificación 1

En la *Figura 37* se muestra la evolución de los perfiles cromatográficos (**a-j**) de los principales compuestos fenólicos en las diferentes etapas de purificación. Este esquema de purificación (*Figura 38a*) incluye en la primera etapa una columna de una resina de intercambio aniónica fuerte Amberjet 4200. Se introduce un 1 L de resina, cantidad mínima suficiente para la retención total del contenido de DHFG de la fracción A1 (criterio utilizado para el resto de etapas y esquemas de purificación). Antes de utilizar la resina, se lava con 1 L de solución acuosa de ácido fosfórico al 5 % (v/v) y después con 2 L de agua. La fracción A1 se pasa a través de la columna. El DHFG queda retenido en la resina. Se lleva a cabo la elución con agua de tal forma que se desechan las primeras fracciones eluidas (cromatogramas **a** y **b** de la *Figura 37*), que suman un volumen de 1,6 L que contienen 0,36 g de DHFG, siendo el glucósido de hidroxitirosol el componente mayoritario. Las fracciones siguientes (cromatogramas **c**, **d** y **e**) se mezclan para obtener 7,9 L de una fracción principal B1 (cromatograma **h**) que contiene 0,45 g de DHFG con una pureza que oscila entre el 5 y el 20 % en peso seco. La composición de esta fracción incluye, además, hidroxitirosol, glucósido de hidroxitirosol y tirosol. Para este porcentaje de elución de DHFG (85 %) la relación entre el volumen de elución y el volumen de carga es 2. Por último, se recoge una solución de 0,14 g de DHFG en la que predomina el hidroxitirosol (cromatogramas **f** y **g**), la cual juntamente con las primeras fracciones se pueden reciclar para aumentar el rendimiento.

En la segunda etapa cromatográfica la fracción B1 se hace pasar a través de una columna con 3 L de resina XAD16. Seguidamente, se eluye con agua la columna para obtener una fracción C1 (cromatograma **i**) de 8,5 L que contiene 0,26 g de DHFG con una pureza comprendida entre el 20 y el 30 % en peso. En esta etapa, se consigue la separación de DHFG del resto de fenoles principales.

La fracción C1 se concentra por ósmosis inversa antes de ser pasada a través de una columna de 0,5 L de resina aniónica débil, de donde se obtiene una fracción (I) (cromatograma **j**) de 0,15 g de DHFG lo que representa un rendimiento global del procedimiento del 16 % con respecto a la cantidad de DHFG contenido en la fracción A1 con una pureza entre el 60 y el 80 %. A fin de aumentar el rendimiento global se pueden reciclar los efluentes desechados.

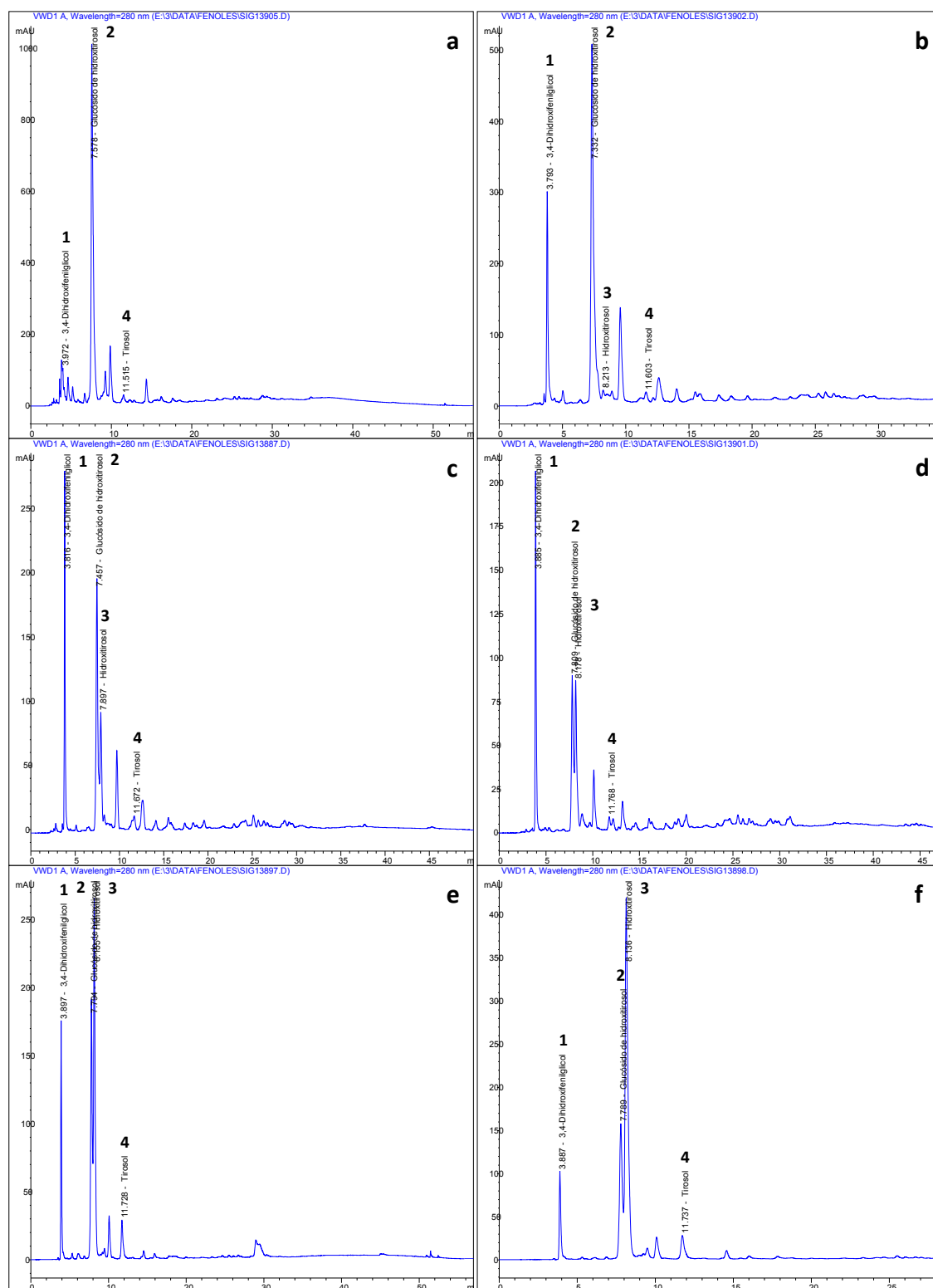


Figura 37. Evolución de los perfiles cromatográficos de los principales compuestos fenólicos: (1) DHFG; (2) glucósido de hidroxitirosol; (3) hidroxitirosol y (4) tirosol, en las diferentes etapas de purificación del esquema 1.

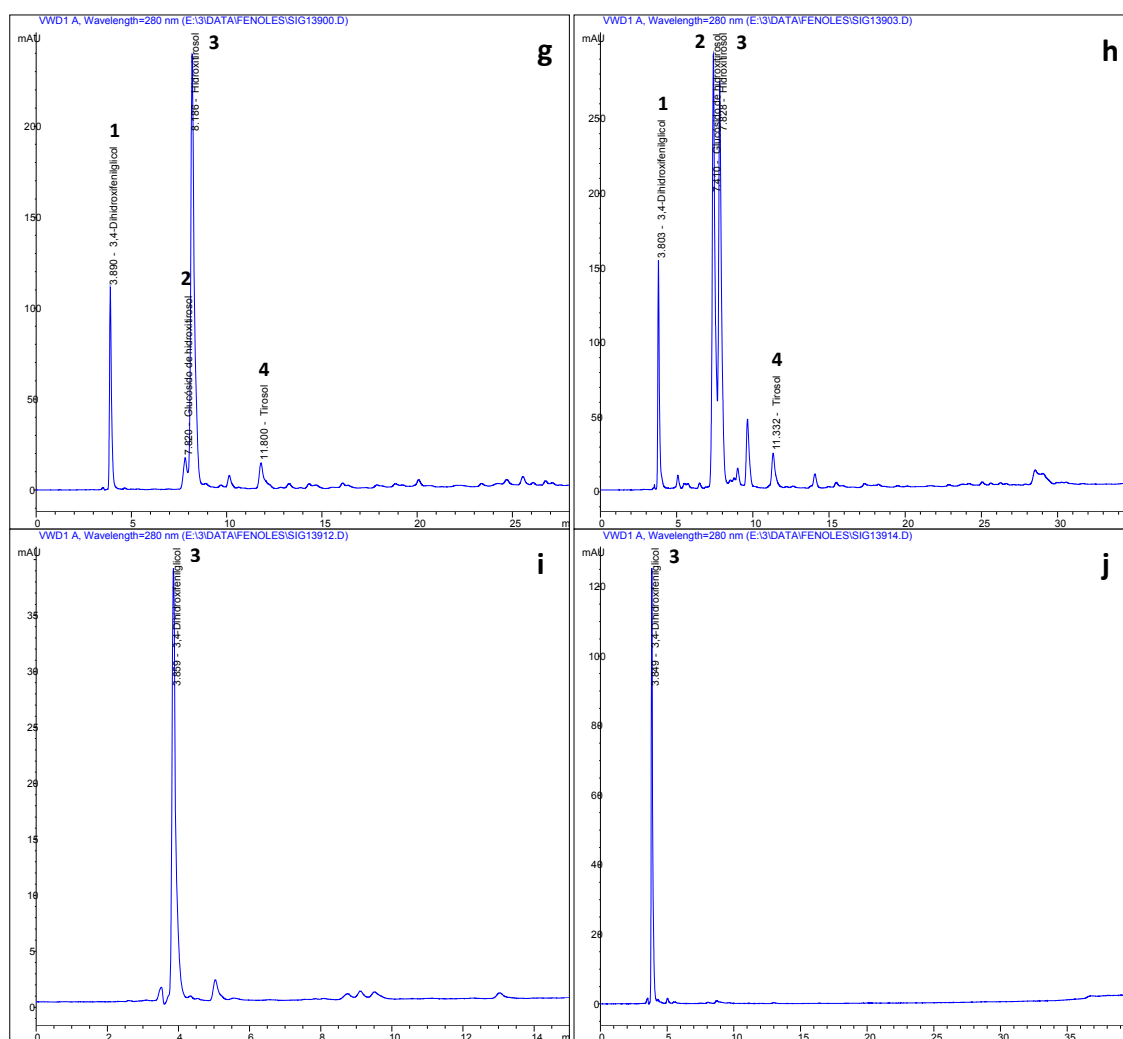


Figura 37. (Continuación) Evolución de los perfiles cromatográficos de los principales compuestos fenólicos: (1) DHFG; (2) glucósido de hidroxitirosol; (3) hidroxitirosol y (4) tiroso, en las diferentes etapas de purificación del esquema 1.

Esquema de purificación 2

En éste se suministró la misma muestra A1 y se hizo pasar por la misma columna que en el caso anterior, obteniendo la misma fracción B1. En este caso la fracción B1 se concentra por ósmosis inversa antes de su pase por una columna que contiene 1 L de resina aniónica MWA-1. Se calcula la cantidad de resina requerida sobre la base de la retención total del DHFG. La fracción B1 concentrada a 1,5 L contiene 0,41 g de DHFG. Tras eluir con agua se obtiene una fracción C2 de 4,3 L que contiene 0,30 g del compuesto con una pureza de entre el 15 y el 30 % en peso seco. Por último, la fracción C2 se pasó a través de la columna de 2 L de resina XAD16. Tras la elución con agua se obtiene una fracción (II) de 0,18 g de DHFG con una pureza que oscila entre el 70 y 90 %. El porcentaje de recuperación o rendimiento alcanza el 19 %, fácilmente mejorable reciclando las fracciones desechadas con menos proporción de DHFG.

Esquema de purificación 3

Se rellena una columna con 2,5 L de resina débilmente básica de intercambio aniónico MWA-1, con una altura de lecho de resina de 0,6 m que constituye la sección de carga. La fracción A1 se hace pasar por la columna y el DHFG queda completamente retenido. La resina retiene también un gran número de impurezas coloreadas. Las primeras fracciones eluidas, que representan un volumen de 4,5 L contienen esencialmente glucósido de hidroxitirosol y, por esta razón, se desechan. La fracción siguiente resultante B2 de 6,3 L contiene 0,56 g de DHFG con una pureza de entre el 5 y el 20 % en peso seco. La fracción B2 procedente de la primera etapa se carga en una columna con 2 L de resina aniónica fuerte Amberjet 4200. Con la elución se recoge una fracción C3 de 11,4 L que contiene 0,35 g de DHFG con una pureza de entre el 20 y el 40 % en peso seco. Finalmente, la fracción C3 se pasó a través de una columna con 2 L de resina XAD16. Tras la elución con agua se obtiene una fracción (III) de 0,27 g de DHFG con una pureza que varía entre el 70 y el 90 %. El rendimiento es del 28 %.

Esquema de purificación 4

Se procede de la misma forma que en la primera etapa del esquema de purificación 3. La fracción B2 se hace pasar a través de una columna con 3 L de resina XAD16. Tras eluir con agua se obtiene una fracción C4 de 16 L que contiene 0,54 g del compuesto con una pureza de entre el 50 y el 70 % en peso seco y un rendimiento global del 57 %.

Antes de cada columna las soluciones que contienen DHFG pueden concentrarse disminuyendo la cantidad de resina a utilizar en la siguiente etapa. Las soluciones purificadas finales se concentran por ósmosis inversa para obtener un producto enriquecido en DHFG.

A continuación se detallan los posibles cuatro esquemas de proceso para la obtención y purificación de DHFG que se representan en las *Figuras 38a y 38b*. La fracción A1 se divide en cuatro partes iguales, 4,75 L que contienen 0,95 g de DHFG, y cada una de ellas se utiliza (como licor de carga) para realizar los siguientes cuatro procedimientos de purificación (página siguiente):

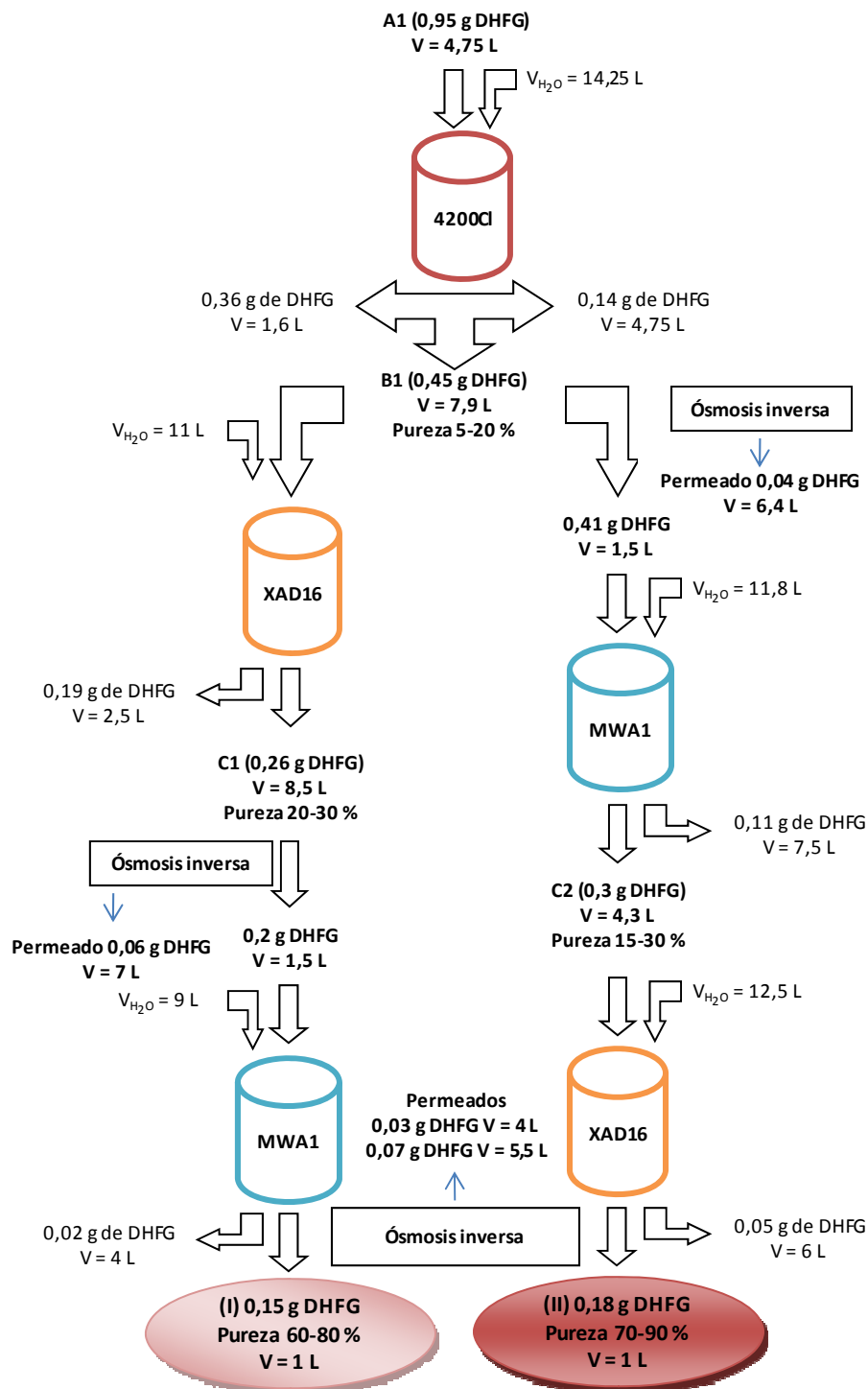


Figura 38a. Balances de materia correspondientes a los esquemas de purificación 1 (izquierda) y 2 (derecha) de DHFG. Se obtienen fracciones finales del compuesto purificado con un intervalo de pureza de 60-90 %.

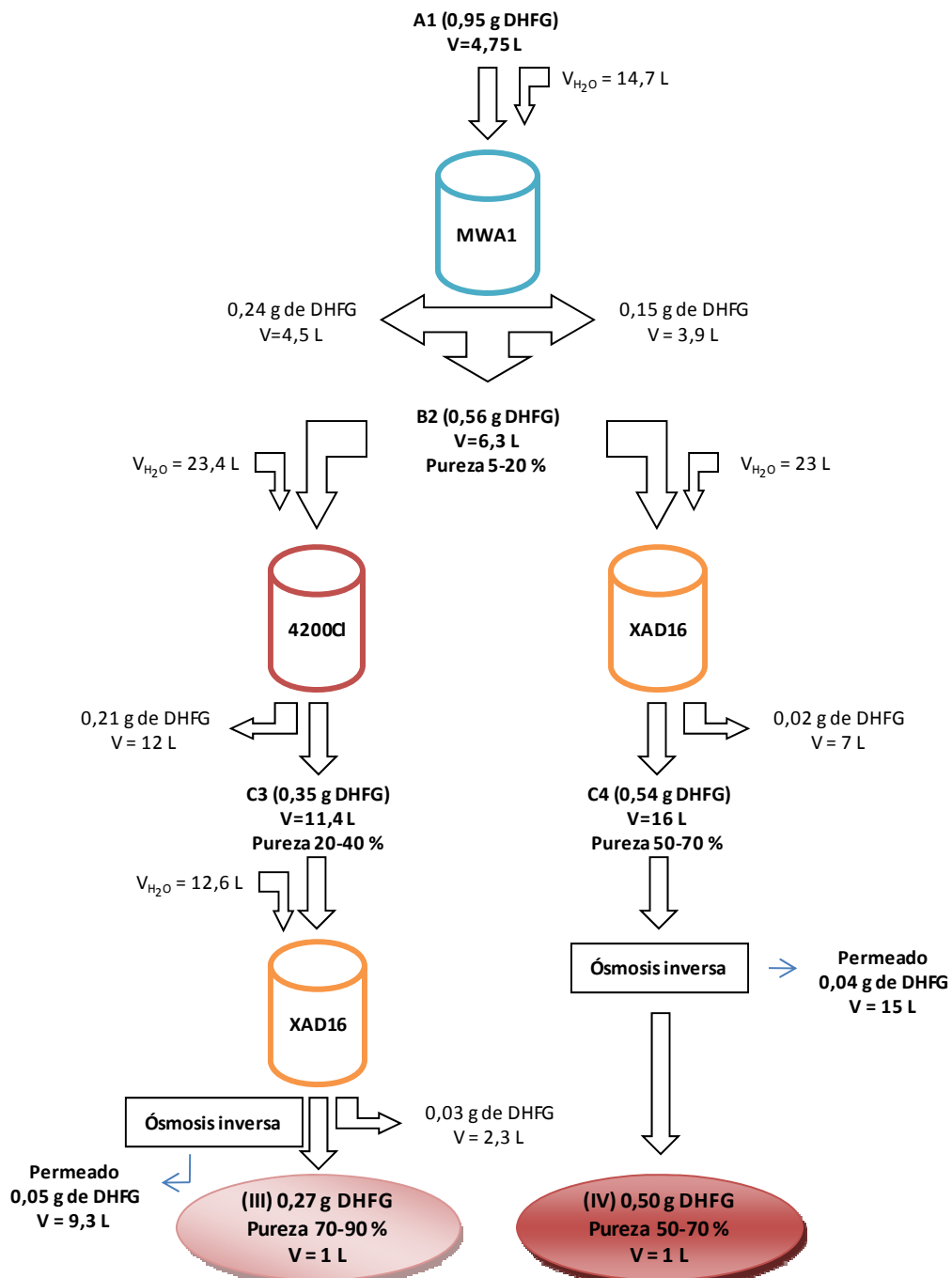


Figura 38b. (Continuación) Balances de materia correspondientes a los esquemas de purificación 3 (izquierda) y 4 (derecha) de DHFG. Se obtienen fracciones finales del compuesto purificado con un intervalo de pureza de 50-90 %.

5.2.4.4.- Selección de un sistema de purificación: análisis de los resultados obtenidos.

Al analizar los resultados obtenidos en los ensayos previos y en el desarrollo de los esquemas de purificación a nivel de laboratorio se prestó atención a la diferencia de comportamiento apreciada en las resinas de intercambio iónico Amberjet 4200 y MWA-1.

Por un lado, para el procesado y tratamiento en la primera etapa del alpechín y/o fase acuosa procedente del tratamiento térmico del alperujo, la resina aniónica de base fuerte Amberjet 4200 retiene menos carga orgánica que la resina aniónica débil MWA-1, facilitando su regeneración. La resina aniónica fuerte retiene ciertos compuestos fenólicos contenidos en el alpechín, pero muestra poca o ninguna afinidad por una gama de solutos que son eliminados parcialmente en la etapa de carga. Esto permite elegir los esquemas de purificación 1 y 2 y descartar los esquemas 3 y 4.

Por otro lado, el uso de la resina aniónica débil MWA-1 en la primera etapa del proceso de purificación, en la que se ha de enfrentar a una fuente rica en hidroxitirosol, presenta el inconveniente de su gran capacidad de retención de este compuesto, el cual es muy difícil separar y se necesitan muchos volúmenes de elución para su completa eliminación, lo que dificulta su limpieza y posterior regeneración. Esto permite descartar el esquema de purificación 2, pues en su segunda etapa la resina MWA-1 se enfrenta a un licor B1 con una cantidad importante de hidroxitirosol (cromatograma **h** de la [Figura 37](#)).

Teniendo presente estas consideraciones y a pesar de otros criterios de selección tales como el grado de pureza, el rendimiento final y el número de etapas de concentración se elige el esquema de purificación 1 para la realización de una experiencia a escala planta piloto.

5.2.4.5.- Experiencia de purificación de DHFG a escala de planta piloto.

El escalado del proceso de purificación permite comprobar la viabilidad técnica del sistema. Como se ha descrito en el apartado anterior, se han ensayado distintas opciones de operación para obtener DHFG y finalmente se seleccionó el sistema del esquema de purificación 1 de acuerdo con su simplicidad y probable reducción de los costes. Partiendo de dicho esquema de purificación propuesto se lleva a cabo la experiencia para su escalado a nivel semiindustrial o planta piloto. 250 kg de alperujo fresco (distinto al utilizado para los ensayos en laboratorio) se someten a tandas de tratamientos térmicos, de 30 kg cada una, y por centrifugación del alperujo tratado se obtiene una fracción E1 de 150 L de una fase acuosa o alpechín de una concentración de DHFG de 0,45 g/L que constituye la fracción de partida de esta experiencia.

Se describen a continuación las etapas definitivas para la obtención y purificación de DHFG, esquematizadas en la *Figura 39*, incluyendo alguna modificación respecto al esquema de purificación 1. Se simplifica el uso y las dimensiones de la columna de resina XAD16 al usarse como precolumna o filtro de acompañantes (glucósido de hidroxitirosol, hidroxitirosol y tirosol), eliminando al mismo tiempo la etapa intermedia de concentración. La planta piloto dispone de un equipo de purificación de agua (descalcificación, desmineralización y ósmosis inversa), que suministra una cantidad suficiente para abastecer las necesidades del proceso de purificación (*Figura 40*), además de un equipo de ósmosis inversa para la concentración de las soluciones purificadas de DHFG.

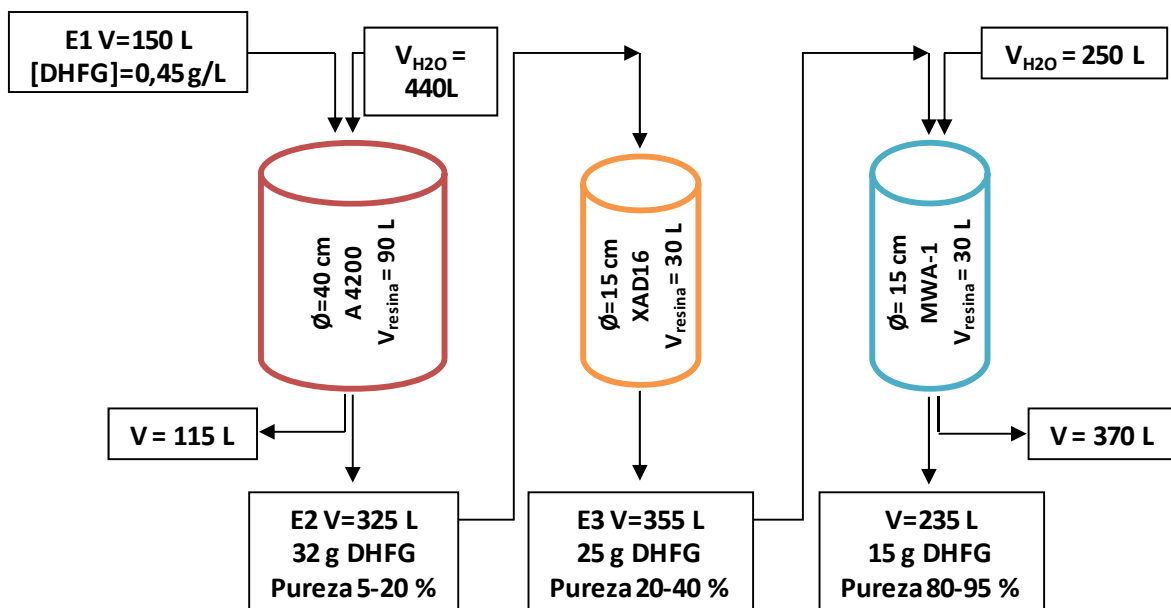


Figura 39. Representación esquemática del sistema óptimo para la purificación de DHFG.

La fracción E1 (*Figura 39*) se alimenta a una columna de 40 cm de diámetro que contiene 90 L de resina aniónica fuerte (altura de lecho 70 cm). El flujo durante el proceso se mantiene en torno a 0,5-1 L/min. Al completarse la carga, es decir, cuando comienza a eluir DHFG, la resina se lava con agua desionizada. Se recoge una fracción E2 de 325 L. La solución obtenida contiene 32 g de DHFG de una pureza comprendida entre el 5 y el 20 % en peso, e hidroxitirosol aproximadamente al doble. En esta etapa se pretende eliminar una cantidad importante de los compuestos orgánicos de la fracción líquida obtenida con el tratamiento térmico del alperujo. Para alcanzar porcentajes elevados de pureza es determinante no saturar la resina aniónica fuerte de DHFG en la etapa de carga, es decir, no agotar la capacidad de intercambio de la resina y que la concentración de DHFG en el efluente iguale a la concentración de entrada. La saturación supone la acumulación de otros compuestos, de tal manera se pretende que en la elución se obtenga la menor proporción posible de impurezas.

La fracción E2 obtenida en la etapa anterior se hace pasar a través de una columna de 15 cm de diámetro con 30 L de resina XAD16, en donde la mayor parte del DHFG eluye con la propia fracción E2 de carga. Después se recogen 30 L más de lavado con agua, obteniéndose una fracción E3 de 355 L con 25 g de DHFG con una pureza que oscila entre el 20 y el 40 % en peso. Es una etapa importante de la purificación para separar DHFG de hidroxitirosol. De manera que se adsorbe preferentemente el hidroxitirosol, evitando que éste alcance la resina aniónica débil e impidiendo de esa manera una saturación con hidroxitirosol, que puede interferir en la última etapa disminuyendo la pureza del DHFG, y facilitando la regeneración de la resina aniónica débil. Esta modificación implica dos cambios sustanciales, pues permite eliminar de la etapa de concentración previa a la etapa de carga de la resina XAD16, y prácticamente la etapa de descarga en relación con el esquema de purificación 1.

En la etapa siguiente, la fracción E3 es introducida en una columna de 15 cm de diámetro rellena con 30 L de resina MWA-1. Es la etapa más importante de la purificación, la cual produce el incremento significativo del grado de pureza. El eluido es una fracción de 235 L y 15 g de DHFG de una pureza entre el 80 y el 95 %, como demuestran los análisis de los espectros de RMN. La modificación introducida logra mejorar el grado de pureza y el rendimiento global del proceso que aumenta hasta el 22 %, es decir, la relación entre la cantidad de DHFG obtenido en el efluente purificado y la cantidad de DHFG en la fracción E1. La combinación de las etapas en el modo y orden indicado, asegura una forma simple y económica de purificación de DHFG a partir de alpechín, fase acuosa de alperujo tratado térmicamente o cualquier fuente acuosa de DHFG. La pureza de la última fracción se puede aumentar mediante un segundo ciclo por una columna con 2 L de resina aniónica débil, del que se obtiene finalmente una fracción de 10 g de DHFG con una pureza comprendida entre el 95 y el 100 % en peso. El rendimiento final del procedimiento es del 15 %, pero puede aumentar si se reciclan los efluentes con menos proporción de DHFG y se hace un mejor aprovechamiento de la fuente.

Los resultados obtenidos en la planta piloto muestran la efectividad y el alto grado de pureza proporcionado por el método de aislamiento y purificación propuesto y demuestran que el escalado del sistema no afecta a la eficacia del proceso. Mediante sencillas etapas de purificación sobre resinas intercambiadoras de iones y de adsorción, el procedimiento cromatográfico permite por primera vez obtener DHFG de una gran pureza a partir de los efluentes originados en la producción de aceite de oliva y altamente contaminantes. El éxito de la purificación proviene de obtener un compuesto prácticamente puro en cantidad de gramos a partir de una fuente en la cual el DHFG está muy diluido.

Este procedimiento es particularmente simple y “económico”, y tiene también la ventaja de usar cantidades muy limitadas de disolventes orgánicos (únicamente en la etapa de regeneración), pues se lleva a cabo fundamentalmente con agua. Además, dependiendo del grado de pureza que se requiera, los pasos de purificación pueden ser reducidos con el correspondiente ahorro

económico. La extrapolación de estos datos a gran escala supone la obtención de una gran cantidad de DHFG a partir de un material desechable y económico. A partir de 1000 kg de alperujo se podrían obtener 179 g de DHFG con una pureza del 95 % (*Figura 41*). Si se hace un mejor aprovechamiento de la fuente y se reciclan los efluentes generados, se puede obtener un mayor rendimiento, aumentando la cantidad de producto final. Sin duda, la purificación eficaz reduce el impacto ambiental por la eliminación de los principales compuestos fenólicos del alpechín.



Figura 40. Fotografías de la planta piloto para la purificación de DHFG (izquierda) y del equipo de ósmosis inversa utilizado para la concentración de las fracciones purificadas (derecha).

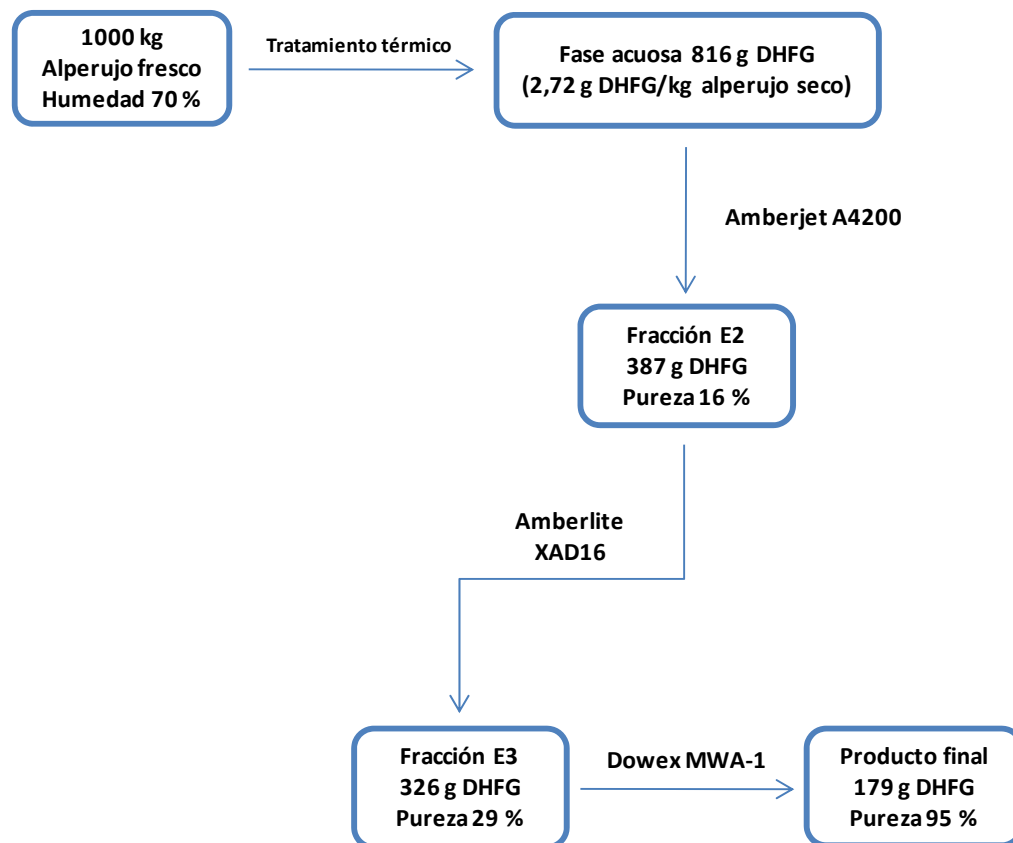


Figura 41. Balance de materia aproximado para el DHFG a partir de alperujo tratado térmicamente, suponiendo que la cantidad inicial de DHFG coincide con la máxima recuperada tras el tratamiento térmico en las mejores condiciones de solubilización (ver [Tabla 16](#)).

5.2.4.6.- Estabilidad del producto final.

De las experiencias de los ensayos de purificación del DHFG se puede concluir lo siguiente en cuanto a estabilidad del producto:

1. Se comprueba el hecho de que el DHFG resulta inestable a un valor de pH superior a 6,5.

2. A pH ácidos el DHFG se mantiene sin alteración en las soluciones purificadas. Por tanto, durante la purificación es aconsejable operar a pH bajos, así como conservar el producto final en solución a un valor de pH por debajo de 6,5, y mantener la temperatura de almacenamiento a -4 °C o inferior.

3. Los resultados experimentales indican que controlar el pH de las soluciones purificadas de DHFG en un intervalo apropiado puede disminuir la pérdida de DHFG durante el transcurso de la concentración. Mantener un intervalo de pH entre 6 y 6,5 evita la degradación del compuesto purificado.

Para estudiar la influencia del pH en la degradación y cuantificar la pérdida de DHFG durante esta etapa de concentración se toman alícuotas de 4 soluciones de DHFG purificado como producto final, sin control del pH, y se determina su contenido mediante HPLC antes y después de esta etapa. Cuando los residuos de las fracciones concentradas se redisuelven se comprueba una reducción sensible de la cantidad de DHFG en aquellas con valores iniciales de pH inferiores a 6. Los resultados se muestran en la [Tabla 22](#). Se repite esta operación ajustando previamente el valor de pH. El pH de la fracción 1 se ajusta a tres valores distintos añadiendo una solución diluida de hidróxido sódico. A un valor de 6,5 no se constata pérdida de DHFG después de la concentración y redisolución del residuo seco, tampoco a un valor ajustado de 6,3 (fracción 3), en comparación con la que se obtiene sin ajuste previo del valor de pH. En cambio, a pH 12 la pérdida de DHFG es total. Por lo tanto, es importante un control meticuloso de este parámetro antes y durante la operación unitaria de concentración para evitar la degradación del DHFG.

Tabla 22. Porcentajes de degradación de DHFG en las fracciones sometidas a concentración. Las fracciones se han enumerado del 1 al 4 detallando los valores de concentración y pureza.

Fracción	pH	[DHFG] (g/L)	Pureza (%)	Pérdida (%)
1	5,7 ^a	0,12	87	52
	6,5 ^b			0
	8,5 ^b			12
	12 ^b			100
2	5,5 ^a	0,07	77	33
3	5,3 ^a	0,03	76	41
	6,3 ^b			0
4	6,0 ^a	0,08	68	0

^a Valor de pH inicial.

^b Valor de pH ajustado antes de iniciar la concentración.

5.2.4.7.- Regeneración de la resina Dowex MWA-1.

Una vez agotada la capacidad de intercambio por el uso continuo, la resina se ha de regenerar periódicamente, con el fin de eliminar impurezas, y acondicionarla para su reutilización en el proceso. Esta etapa es importante en el proceso de purificación, puesto que el funcionamiento de la resina depende de una regeneración eficiente. La regeneración se lleva a cabo con una base fuerte tras muchos ciclos de purificación. Según las especificaciones del fabricante, se recomienda tratar con una disolución de hidróxido sódico al 2-4 % (p/v). Para ello, 50 mL de la resina utilizada en los experimentos anteriormente descritos se regeneró pasando a través de la columna (2 cm de diámetro) 50 mL de una solución de hidróxido sódico al 3 % (p/v) y asegurando un tiempo de contacto mínimo de treinta minutos. Tras la regeneración se lava la resina con agua desionizada hasta dejarla exenta de solución regenerante (4 volúmenes de lecho ó 200 mL). El lavado se realiza con agua desionizada dado que la presencia de iones puede producir merma en la capacidad de intercambio de la resina.

Para determinar la eficacia del procedimiento de regeneración descrito anteriormente se evaluó el comportamiento de la resina atendiendo al volumen de elución requerido, el perfil de concentración de DHFG en el efluente de salida y la pureza promedio. El buen funcionamiento del intercambiador se pone a prueba en un nuevo proceso de carga. Al representar la concentración de DHFG eluido en función del volumen de eluyente se obtiene una *curva de elución*, que presenta una dispersión de la concentración a uno y otro lado de la concentración máxima de forma de campana (*Figura 42*). La resina se usa para purificar 50 mL de un licor parcialmente purificado (proveniente de la purificación de hidroxitirosol) con un grado de pureza del 13 % en peso y de concentración 1,3 g/L, que ya se había utilizado en ensayos anteriores. Sin embargo, cuando se comprueba la funcionalidad de la resina regenerada con NaOH al 3 % se observa que el DHFG se retiene fuertemente y como disminuye significativamente la concentración de DHFG en las fracciones eluidas respecto del funcionamiento normal, el perfil de concentración no adquiere la forma característica acampanada, lo que significa que la resina rinde menos DHFG purificado para el mismo volumen de elución. El porcentaje de elución no supera el 40 %, indicando que la resina no se regenera adecuadamente con este método. Los valores promedio de concentración y pureza de DHFG y los porcentajes de elución obtenidos después de la regeneración se reflejan en la *Tabla 23*.

El proceso de regeneración de la resina aniónica débil con disolución de hidróxido sódico no es eficiente. Sin embargo, se comprueba que previamente hay que lavar la resina, es decir, retirar la mayoría de los compuestos coloreados fijados a la resina después de la etapa de purificación con una solución de ácido sulfúrico diluido. De modo que se efectúa un lavado con ácido. En este proceso se usa una solución de sulfúrico 0,1 M, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Nuevamente se procede a purificar licor. Se consigue concentraciones del producto más altas, el perfil de concentración o de elución observado corresponde de manera muy parecida

a aquel de un funcionamiento normal (*Figura 42*). El porcentaje de elución supera el 90 %. En cambio, el porcentaje de pureza promedio que se obtiene está muy por debajo de lo esperado. La pureza se incrementa sólo ligeramente comparada con el original (*Tabla 23*). Por lo tanto, la regeneración de la resina mediante un solo tratamiento es inadecuada. Considerando este hecho, es posible pensar en una combinación de ambos tratamientos. Se aplica entonces una limpieza o regeneración ácida con H_2SO_4 0,1 M seguida por una regeneración alcalina con NaOH 3 %. La resina regenerada con este nuevo proceso recupera la eficiencia y su capacidad para purificar DHFG, tal como se observa en la *Tabla 23*. El método de regeneración en dos etapas es el más eficaz después de varios ciclos de operación y aprovecha los siguientes puntos: el tratamiento con ácido sulfúrico produce la elución de los compuestos “adsorbidos” en la resina durante el proceso de purificación y la solución de hidróxido sódico devuelve la resina a su forma iónica inicial.

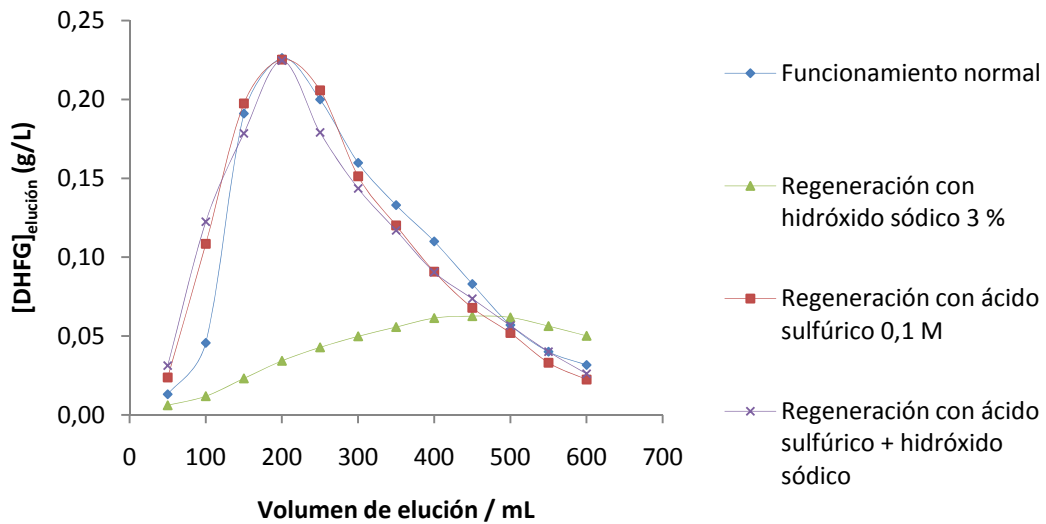


Figura 42. Comportamiento de la concentración de DHFG en el efluente durante la purificación para diferentes tratamientos previos de regeneración de la resina MWA-1.

Tabla 23. Valores promedio de concentración y pureza de DHFG y porcentajes de elución obtenidos después de los diferentes tratamientos de regeneración de la resina MWA-1.

Regeneración	[DHFG] _{promedio} (g/L)	Elución de DHFG (%)	Pureza _{promedio} DHFG (%)
Funcionamiento normal	0,11	98	58
NaOH 3%	0,04	39	-
H ₂ SO ₄ 1 M	0,11	98	26
H ₂ SO ₄ + NaOH	0,11	97	60

5.2.5.- Identificación del DHFG purificado.

Después de la purificación, se realizó la identificación del DHFG recuperado por comparación de su espectro de absorción ultravioleta-visible con el obtenido con el estándar comercial, mostrando ambos espectros idénticos ([Figura 43](#)).

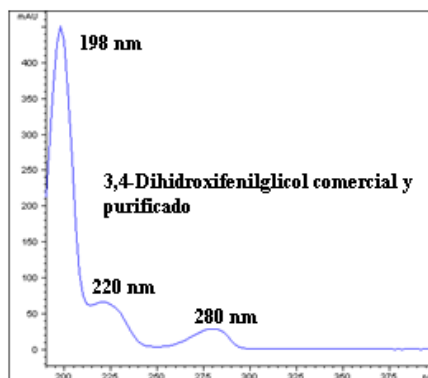


Figura 43. Espectros de absorción ultravioleta-visible para el DHFG comercial y purificado.

La estructura química y pureza de DHFG purificado se confirmó por espectroscopia de ^1H -RMN ([Figura 44](#)). La muestra analizada posee una riqueza del 92,5 % de DHFG. Los datos de ^1H -RMN para DHFG en acetona- d_6 son: δ 6,88 (1H, *d*, $^4J_{4,8} = 2,0$ Hz, H_4); 6,75 (1H, *d*, $^3J_{7,8} = 8,0$ Hz, H_7); 6,70 (1H, *dd*, H_8); 4,56 (1H, *dd*, $^3J_{1a,2} = 4,0$ Hz y $^3J_{1b,2} = 8,0$ Hz, H_2); 3,56 (1H, *dd*, $^2J_{1a,1b} = 10,9$ Hz, H_{1a}); 3,47 (1H, *dd*, H_{1b}). Los desplazamientos químicos están expresados en partes por millón (ppm) referidos a tetrametilsilano (TMS) como señal de referencia (0,00 ppm). Es importante destacar que en la bibliografía los únicos datos de resonancia magnética nuclear de ^1H que existen del DHFG aparecen en el estudio de Limiroli y col., 1996, que proporciona los desplazamientos químicos de todos los protones, pero a partir de un extracto de alpechín con acetato de etilo rico en compuestos fenólicos, y no del compuesto purificado.

Además, la pureza enantiomérica del DHFG también se determinó por ^1H -RMN ([Parker, 1991](#)). Para este propósito, $\text{Eu}(\text{tfc})_3$ se usó como reactivo de desplazamiento quiral, conocido por formar *in situ* complejos diastereoisoméricos con sustratos enantiómeros. El DHFG comercial se usó como estándar para el ajuste de las condiciones previamente descritas ([Sweeting y col., 1987](#)). Como puede verse en la [Figura 45](#), se obtiene un conjunto bien resuelto de dobletes para metino (H_2) y metileno (H_{1a} y H_{1b}) después de la adición del reactivo quiral. Similares resultados se obtuvieron con DHFG natural, mostrando su naturaleza racémica. Estos resultados están de acuerdo con la presencia de los epímeros (2''R)-2''-hidroxioleuropein y (2''S)-2''-hidroxioleuropein en el C-2'' del grupo 2-hidroxi-1-(3,4-dihidroxifenil)etanol, en proporción muy similar (3,9 y 3,5 mg

respectivamente) encontrados en *Fraxinus Americana* de la familia Oleaceae ([Takenaka y col., 2000](#)).

Figura 44. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H obtenido en DMSO-d_6 de DHFG comercial y purificado.

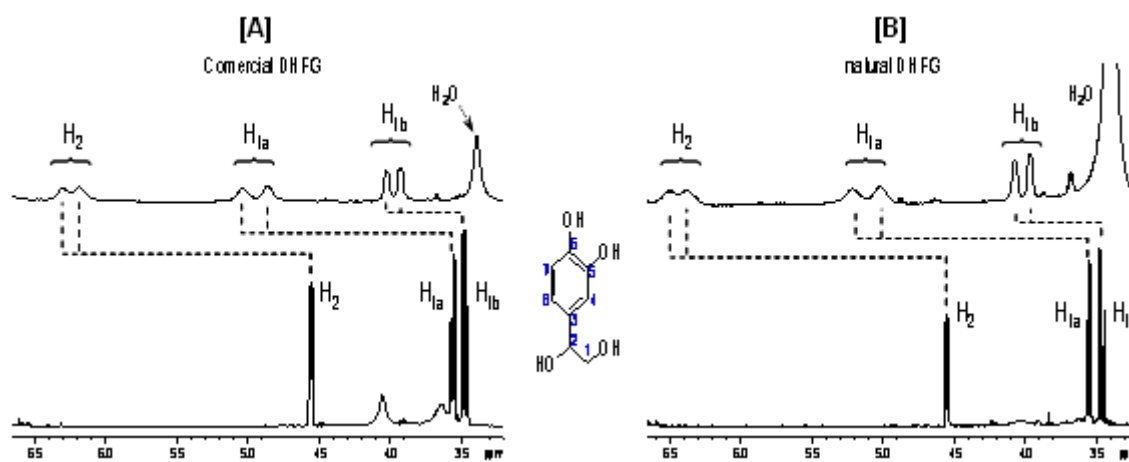


Figura 45. Comparación de los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H obtenidos en acetona- d_6 para DHFG comercial (**A**) y natural (**B**). Abajo se muestra una región seleccionada de ambos espectros. Arriba la misma región del espectro fue registrada después de la adición de 0,25 eq de $\text{Eu}(\text{tfc})_3$.

5.2.6.- Medida de la capacidad antioxidante del DHFG en matrices lipídicas.

Determinación de la estabilidad oxidativa por el método Rancimat.

Se ha comparado la capacidad antioxidante del DHFG purificado con la del hidroxitirosol, y con la de dos antioxidantes muy usados en alimentos, el α -tocoferol (natural) y el butilhidroxitolueno (BHT) (sintético) en una matriz lipídica. La capacidad antioxidante se ha evaluado midiendo la estabilidad oxidativa de la matriz lipídica en presencia de estos antioxidantes y utilizando el método Rancimat. Este método de oxidación acelerado es muy empleado para comparar la estabilidad oxidativa de aceites y grasas y evaluar el efecto de los componentes menores ([Velasco y Dobarganes, 2002](#)). Se ha realizado a una temperatura de 90 °C para minimizar las pérdidas de BHT por evaporación. La matriz lipídica ha sido obtenida de aceite de soja purificado por alúmina y sílica gel ([Yoshida y col., 1992](#)) para eliminar los antioxidantes. Los valores del período de inducción (tiempo transcurrido hasta que se producen los productos volátiles de la oxidación), obtenidos para los diferentes antioxidantes a una misma concentración de 0,5 mM, se muestran en la [Tabla 24](#). El DHFG muestra menor capacidad antioxidante que el hidroxitirosol, pero mayor que el BHT y el α -tocoferol (antioxidantes solubles en matrices lipídicas) a pesar de su mayor polaridad y de las condiciones forzadas en que se realiza la medida (a 90 °C a partir de 3 horas el DHFG sufre una importante degradación térmica ([Tabla 16](#)) a diferencia del hidroxitirosol que es más termoestable). En consecuencia, el efecto protector del DHFG purificado sobre el aceite podría haber sido mucho mayor (superior al hidroxitirosol) si la medida se hubiese realizado a menor temperatura para evitar la degradación térmica del compuesto. Por lo tanto, se puede afirmar que el DHFG presenta un alto potencial antioxidante en matrices lipídicas, lo que confirma los resultados ya obtenidos por nuestro grupo de investigación ([Rodríguez y col., 2007b](#)) y se corrobora con los nuevos datos que aportan los métodos que se detallan a continuación utilizando una emulsión de ácido linoleico.

Tabla 24. Valores del período de inducción (P.I.) del DHFG y otros antioxidantes a una misma concentración (0,5 mM) en aceite de soja.

Compuesto	P.I. (h)
Blanco	2,9 \pm 0,1
BHT	10,7 \pm 0,3
α-Tocoferol	13,2 \pm 0,2
Hidroxitirosol	22,0 \pm 0,5
3,4-Dihidroxifenilglicol	16,8 \pm 0,3

5.2.7.- Inhibición de la oxidación lipídica (primaria y secundaria) de una emulsión de ácido linoleico.

Las propiedades antioxidantes de DHFG y de otros compuestos usados como referencia (HT, Trolox y α -tocoferol) se evaluaron, con un inductor de la peroxidación ABAP [2,2'-azobis-(2-metil-propionamidina) diclorhidrato], mediante los ensayos del tiocianato férrico y del ácido tiobarbitúrico, en términos de su capacidad para proteger al ácido linoleico de la degradación oxidativa. Dado que la oxidación lipídica es una reacción en dos etapas, es oportuno analizar la acción del DHFG como potencial antioxidante en los diferentes pasos del proceso de oxidación. El primer método se relaciona con el primer paso del proceso de degradación de una matriz lipídica u oxidación primaria, cuyo producto final son los hidroperoxidienos. El segundo método, mediante el cual todos los compuestos se ensayaron, excepto el Trolox, concierne a la detección del malondialdehído, uno de los productos de la oxidación lipídica secundaria, cuya cuantificación da una medida de la extensión de la degradación lipídica.

Para evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos, se desarrolla un análisis de regresión con los datos obtenidos de los valores de absorbancia medidos (se fija un nivel de confianza del 95 %). El análisis de regresión y el efecto de estos compuestos sobre la inhibición de la oxidación a diferentes concentraciones se muestran en la [Figura 47](#). La capacidad antioxidante de los compuestos se recoge en la [Figura 46](#) y en la [Tabla 25](#). Los valores están expresados como EC_{50} que representa la concentración de compuesto antioxidante necesaria para inhibir la oxidación un 50 % con respecto al valor de absorbancia del ácido linoleico sometido a oxidación total sin antioxidante usado como control. Los resultados de este estudio indican que en la oxidación primaria, el DHFG (EC_{50} 0,83 mM) tiene una capacidad más alta que el hidroxitirosol (EC_{50} 4,66 mM), que muestra el valor más bajo. Si se tienen en cuenta los porcentajes de inhibición causados por una solución 1 mM de cada uno de los compuestos, el DHFG (55,2 %) inhibe la peroxidación del ácido linoleico aproximadamente el doble que el HT (21,6 %), y tiene una actividad similar al α -tocoferol y al Trolox (53,5 y 47,6 % respectivamente). Esto está en consonancia con los resultados obtenidos por [Rodríguez y col., 2007b](#). La presencia de átomos de hidrógeno disponibles a partir del grupo *o*-difenólico representa una buena barrera contra el proceso de oxidación primaria. La inclusión de un grupo hidroxilo adicional del DHFG puede explicar la mayor capacidad del compuesto en el proceso oxidativo que el hidroxitirosol.

Por lo que corresponde a la inhibición de la oxidación secundaria, dentro del intervalo de concentraciones empleadas, el DHFG muestra la actividad más alta y, a continuación, el HT y el α -tocoferol, en este orden (valores de EC_{50} 0,22; 0,47 y 1,21, respectivamente). La extraordinaria protección de DHFG puede verse claramente en la [Figura 47](#). Es evidente a partir de la figura que la curva de inhibición de la oxidación del ácido linoleico disminuye más rápidamente en presencia de DHFG, mientras que la caída de los otros dos antioxidantes es algo más lenta. Esto demuestra nuevamente la eficacia del DHFG en el proceso de inhibición.

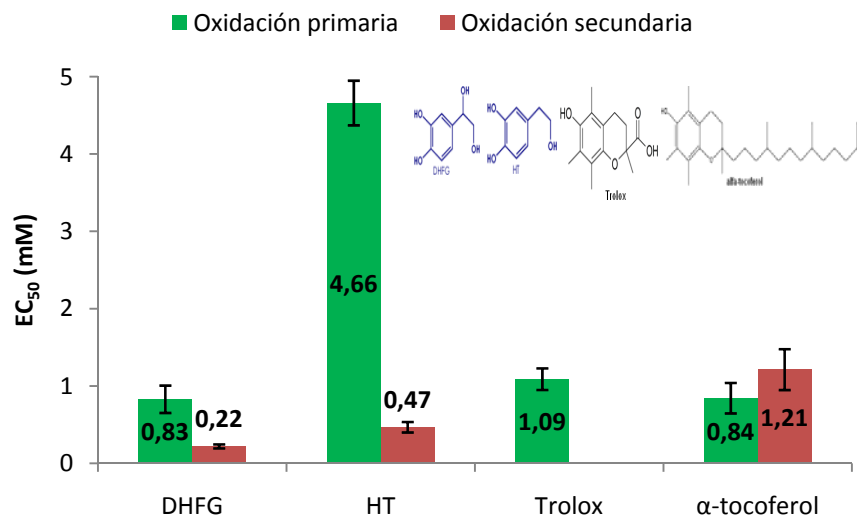


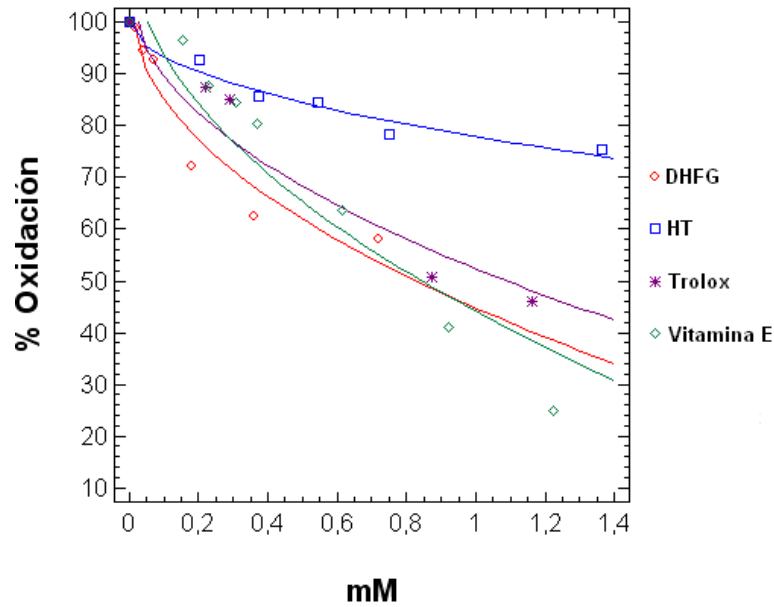
Figura 46. Valores de la actividad antioxidante del DHFG y de los compuestos de referencia hidroxitirosol (HT), Trolox y α -tocoferol, medidos en los dos diferentes experimentos de oxidación (primaria y secundaria). Los resultados, interpolados gráficamente a partir del análisis de regresión, están expresados en términos de concentración como mM \pm desviación estándar.

Tabla 25. Inhibición de la oxidación primaria y secundaria de ácido linoleico en emulsiones de LSS por parte de DHFG, HT, Trolox y α -tocoferol.

Compuesto	Oxidación primaria	Oxidación secundaria
	% Inhibición causado por una solución 1 mM del compuesto	
DHFG	55,2 \pm 2,8	94,3 \pm 2,5
HT	21,6 \pm 1,8	72,3 \pm 6,8
Trolox	47,6 \pm 3,8	-
α -Tocoferol	53,5 \pm 4,9	45,5 \pm 4,2

Los datos obtenidos son el promedio de tres determinaciones y se representan con su desviación estándar.

Oxidación primaria



Oxidación secundaria

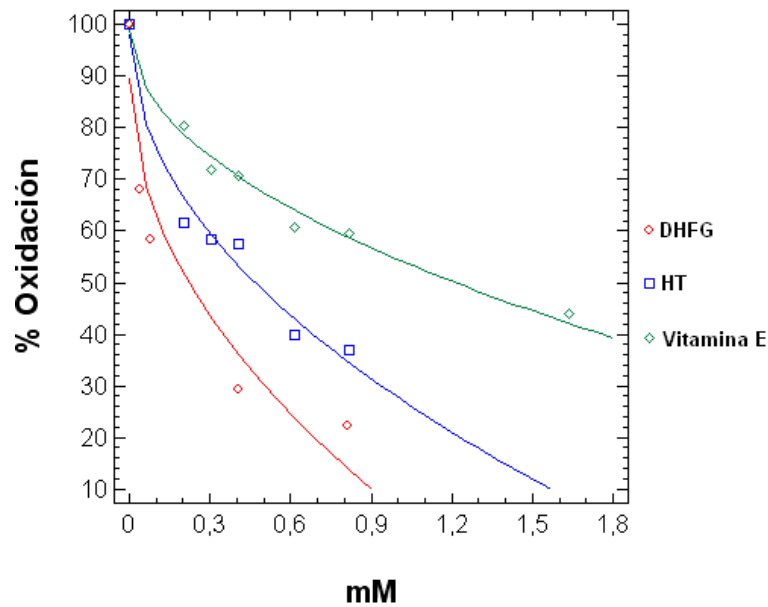


Figura 47. Líneas de tendencia de inhibición de la oxidación lipídica primaria y secundaria de ácido linoleico por DHFG, HT, Trolox y α -tocoferol (vitamina E). El análisis de regresión proporciona el modelo de mejor ajuste, que corresponde a $y = a + b\sqrt{x}$, obteniéndose coeficientes de correlación superiores a 0,96.

5.2.8.- Inhibición de la agregación plaquetaria.

En este estudio se investiga la actividad antiagregante plaquetaria de dos compuestos fenólicos importantes de la aceituna, presentes en el aceite de oliva y en el alperujo, el DHFG y el hidroxitirosol. El hidroxitirosol se ha obtenido a partir del procedimiento, simple y económico, de purificación a nivel industrial patentado ([Fernández-Bolaños y col., 2002b](#)). El DHFG se ha obtenido mediante el nuevo sistema de purificación desarrollado a escala planta piloto que está patentado ([Fernández-Bolaños y col., 2010](#)) y que forma parte del presente trabajo y se ha descrito anteriormente. En este estudio se han seleccionado concentraciones fisiológicas en las que estos compuestos están presentes en aceite de oliva y/o aceituna de mesa y que junto a su actividad antioxidante pudieran afectar al mecanismo de agregación plaquetaria *in vitro*. Se lleva a cabo un ensayo previo para evaluar el efecto en la inhibición de la agregación plaquetaria de dosis elevadas (2, 5 y 10 g/L) de hidroxitirosol y DHFG usando adenosindifosfato (ADP), colágeno o TRAP (péptido agonista del receptor de la trombina) como agonistas o estimulantes de la agregación ([Figura 48](#)). Como puede verse en la [Figura 48](#), los dos componentes (HT y DHFG) inhiben la agregación plaquetaria, particularmente la inducida por colágeno. Sin embargo, a dosis de 2 g/L, ninguno de ellos muestra una alta actividad antiagregante usando ADP. Las concentraciones testadas son mucho más altas que las concentraciones fisiológicas (las cuales están alrededor de 1 y 10 mg/L para DHFG e hidroxitirosol respectivamente, suponiendo una velocidad de absorción y biodisponibilidad del 100 % y un volumen de sangre de 5 L).

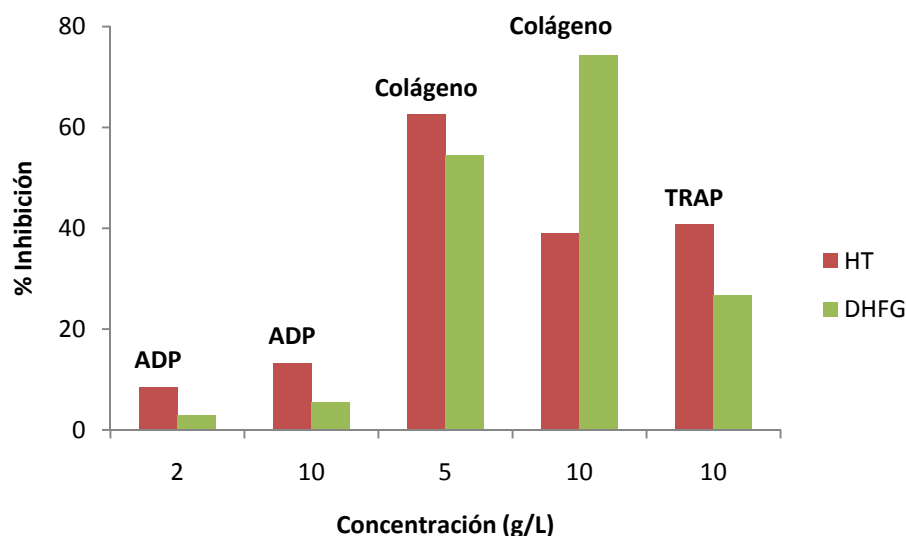


Figura 48. Inhibición de la agregación plaquetaria de HT (■) y DHFG (■) usando ADP, colágeno y TRAP como agonistas o estimulantes de la agregación. La inhibición plaquetaria está expresada en % de disminución de las áreas bajo la curva control de agregación plaquetaria.

Se llevan a cabo incubaciones en plasma rico en plaquetas (PRP) con hidroxitirosol y DHFG a concentraciones más bajas (HT 8, 16 y 40 mg/L y DHFG 1, 2 y 5 mg/L) y la mezcla de

ambos fenoles. A las concentraciones de HT 8, 16 y 40 mg/L no se observa inhibición significativa de la agregación plaquetaria inducida por colágeno o TRAP (*Figura 50*). Para DHFG 1, 2 y 5 mg/L únicamente resultó una inhibición significativa ($p < 0,05$) de la agregación inducida por colágeno del 3 % para el nivel de concentración más alto, y no hubo inhibición de la agregación plaquetaria inducida por TRAP. La mezcla de HT (40 mg/L) y de DHFG (5 mg/L) implicó una inhibición significativa ($p < 0,05$) de la agregación plaquetaria inducida por colágeno y TRAP del 12 y el 16 %, respectivamente. Los resultados de los estudios de agregación plaquetaria muestran el efecto sinérgico que tiene la mezcla de hidroxitirosol y DHFG.

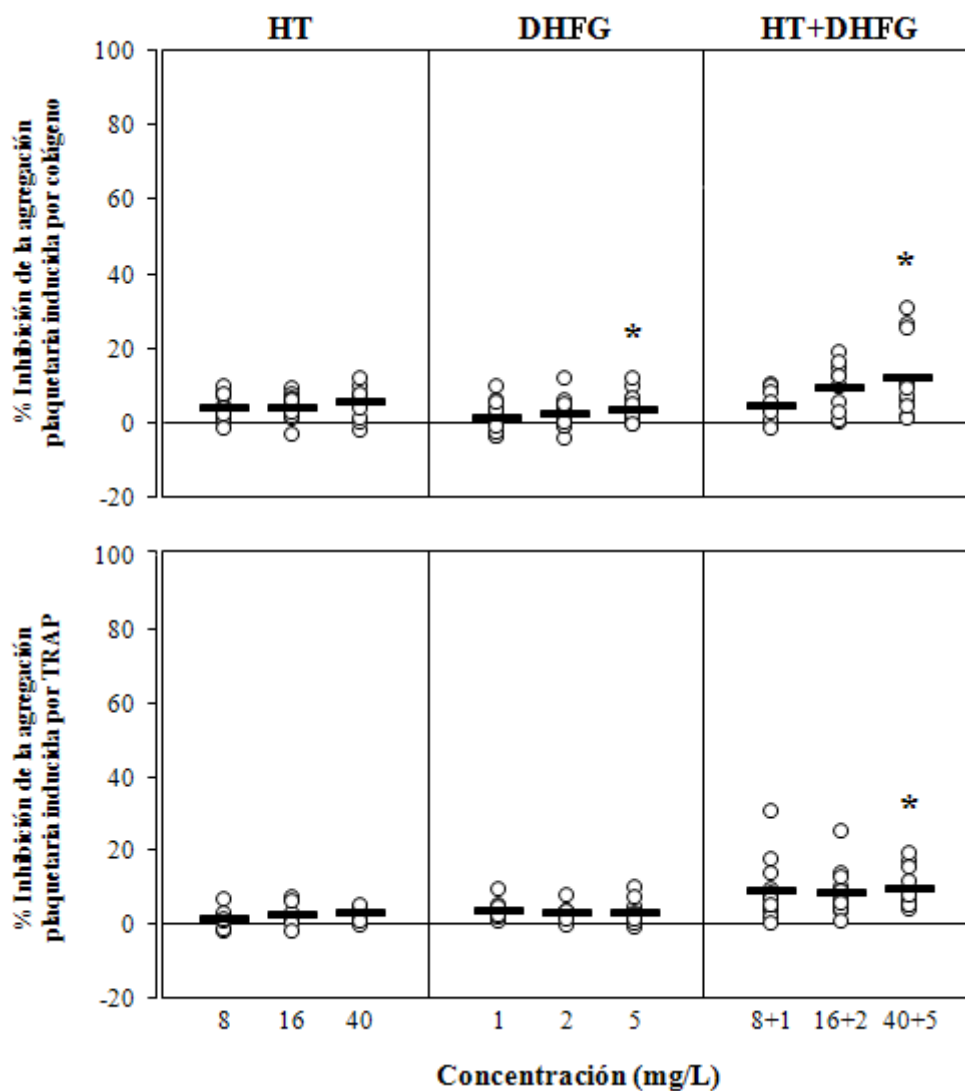


Figura 50. Inhibición de la agregación plaquetaria de HT, DHFG y mezcla de HT y DHFG usando colágeno y TRAP como agonistas. La inhibición plaquetaria está expresada en % de disminución de las áreas bajo la curva control de agregación plaquetaria midiendo la transmisión de luz y comparándola con el control (PBS). (*) Significativamente diferente del control ($p < 0.05$). (—) Valor promedio.

5.3.- Caracterización de las fracciones volátiles de los destilados de alperujo.

En este trabajo, se estudia el perfil volátil de los destilados obtenidos de los tratamientos hidrotérmicos del alperujo en dos trampas de condensados, una a 20 °C y otra enfriada a -40 °C, aplicando diferentes condiciones de recuperación y usando las técnicas de microextracción en fase sólida (MEFS) del espacio de cabeza y el análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas.

La composición de las diferentes muestras se recoge en la [Tabla 26](#). Los análisis de MEFS del espacio de cabeza de los destilados permitieron identificar 27 compuestos. La [Figura 51](#) muestra un cromatograma representativo a partir del análisis del espacio de cabeza. Los principales compuestos encontrados en los condensados de las fracciones volátiles fueron alcoholes, aldehídos y ésteres. En general, las concentraciones de los compuestos volátiles en los destilados son bajas (la extracción líquido-líquido con diclorometano no proporcionó un perfil cromatográfico, así que no fueron identificados compuestos en varias muestras analizadas). Sin embargo, a temperaturas más altas (150 y 170 °C muestras 23 y 24, respectivamente) la recuperación de compuestos volátiles es mayor. La mayoría de los compuestos identificados son moléculas pequeñas de solventes. El etanol (no cuantificado) y el acetato de etilo se identificaron en todas las muestras. Para evaluar si la diferencia entre muestras es significativa en relación a las condiciones de extracción, los datos fueron combinados y procesados mediante un modelo factorial general usando el programa Design-Expert. Se usaron cuatro factores para el análisis estadístico: tipo de alperujo, vacío/nitrógeno, temperatura y trampa (-20 ó -40 °C). Los análisis estadísticos de los perfiles volátiles de los destilados no mostraron diferencias significativas entre diferentes condiciones operativas de extracción (no se encuentran diferencias entre nitrógeno y vacío, 50 y 100 °C y 20 y -40 °C). Además, para algunos tratamientos el sistema no proporcionó condensado (principalmente los destilados a -40 °C). Por lo tanto, no se tiene un patrón real de datos en los destilados del alperujo.

Es de destacar la no presencia de compuestos como hexanal, (*cis*)-3-hexenal, (*trans*)-2-hexenal y (*trans*)-2-heptenal. Estos compuestos volátiles, de olores agradables, están presentes en altas cantidades en el aceite de oliva y en las pastas de aceituna ([Flamini y col., 2003](#)) y son productos típicos de degradación oxidativa de los ácidos grasos. Además muestran un amplio espectro de actividad antimicrobiana ([Kubo y col., 1995](#)). Además de estos compuestos acíclicos muy pocos terpenos son detectados (únicamente identificación tentativa por el espectro de masas), cuando se esperan concentraciones más altas de estos compuestos. Sin embargo, si están presentes otros compuestos detectados en aceite de oliva como octanal, nonanal y decanal ([Tura y col., 2004](#)), que presentan una fuerte actividad nematocida ([Kim y col., 2008](#)). Estos compuestos junto con el benzaldehído se usan en la composición de las pastas de dientes ([Hirano y col., 2005](#)) o en perfumes para eliminar el olor a tabaco ([Higashi y col., 2004](#)). Varios de los ésteres como acetato, hexanoato, octanoato y decanoato de etilo y acetato de hexilo, detectados

como compuestos volátiles en el alperujo, han sido también identificados en vino de fresa ([Kafkas y col., 2006](#)) y en aceites de semilla de uva ([Bail y col., 2008](#)). Otros compuestos identificados en los destilados, por ejemplo, 2-metilpropanal, 3-metilbutanal o benzaldehído son el resultado de la actividad metabólica de microorganismos y producen al mismo tiempo actividad antimicrobiana ([Smit y col., 2004](#); [Larsen y Knøchel, 1997](#)). Este es el primer estudio que se realiza sobre los compuestos volátiles del alperujo. Aunque los resultados no son concluyentes pueden ayudar a mejorar y rediseñar el sistema de recuperación de los compuestos volátiles. Los datos pueden ser muy útiles para optimizar las condiciones de operación para la recuperación de aquellos compuestos más interesantes y abundantes a escala industrial. Esta primera aproximación establece las bases para el uso de la fracción volátil generada a partir de los tratamientos hidrotérmicos del alperujo como posible fuente de productos bioactivos que contribuirá a revalorizar este subproducto y supondría un paso más en su utilización integral.

Tabla 26. Concentraciones de los compuestos volátiles de los destilados expresadas en $\mu\text{g/L}$ (ppb). La cuantificación se llevo a cabo eligiendo una relación masa-carga m/z , específica de cada compuesto, con la intensidad más alta.

Compuesto	IRL	Ion m/z	ID ^a	Muestra							
				1	2	3	4	5	6	7	8
2-Metilpropanal (1) ^b	<600	72	Std	8	0	4	60	0	10	3	5
3-Metil-2-butanona (2)	<600	43	IRL	22	7	11	84	0	33	12	40
Acetato de etilo (4)	616	43	Std	289	62	336	631	722	1085	442	83
2-Metil-1-propanol (5)	628	43	IRL	1769	1042	2465	3388	801	2407	2503	11176
3-Metil-1-butanol (6)	739	42	Std	751	2254	2993	2269	8043	1307	1803	15639
2-Metil-1-butanol (7)	742	56	Std	496	1469	2197	1497	6473	897	1090	10790
Butirato de etilo (8)	801	88	Std	1	0	22	3	37	1	2	0
1-Hexanol (9)	873	43	Std	37	241	70	360	5594	129	290	2866
Nonanal (10)	1110	82	Std	0	0	2	0	2	0	0	0
Acetato de Isoamilo (12)	878	43	IRL	2	4	34	5	36	3	5	0
Benzaldehído (13)	973	77	Std	0	0	0	38	1269	0	31	142
2-Metoxifenol (14)	1109	124	IRL	0	0	0	0	3216	0	2402	0
Nonanol (16)	1176	56	IRL	0	0	0	0	0	0	0	0
Octanoato de metilo (17)	1126	74	IRL	0	0	0,1	0	0	0	0	0
Octanal (18)	1007	84	Std	0	2	5	0,4	9	1	0,4	0
Hexanoato de etilo (19)	998	88	Std	0	0,4	10	0,2	14	0,1	0,2	0,4
Octanoato de etilo (20)	1198	88	Std	0	0	0,3	0	0	0	0	0
Decanoato de etilo (21)	1397	88	Std	0	0	0	0	0	0	0	0
3-Metilbutanal (22)	653	58	Std	5	2	9	91	112	6	4	11
1-Propanol (23)	<600	31	Std	724	0	0	1463	4061	4256	2584	15894
2-Butanona (24)	600	72	Std	161	0	202	346	149	23787	4333	2034
2-Butanol (25)	606	45	Std	12	0	0	23	101	290	75	249
Hexanoato de metilo (26)	925	74	Std	0	0	3	0,1	3	0,1	0,1	0
Decanal (27)	1212	57	Std	0	0	0	0	0	0	0	0
Acetato de isobutilo (28)	774	43	IRL	1	1	5	1	7	2	1	0
Acetato de hexilo (29)	1013	43	Std	0	0	2	0,1	2	0	0,1	0
2-Furaldehído (30)	841	95	Std	0	0	0	0	2709	0	60	0

^a Identificación con estándares puros (Std) y por comparación de los índices de retención lineales relativos a la serie de los n -hidrocarburos C_6 - C_{15} (IRL).

^b Número de pico con el que se identifica el compuesto en el cromatograma.

Tabla 26. (Continuación) Concentraciones de los compuestos volátiles de los destilados expresadas en $\mu\text{g/L}$ (ppb).

9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
5	0	10	28	38	0	0	144	1	0	13	0	0	0	0	0
2	0	4	19	13	0	0	622	5	0	5	0	0	0	0	0
368	1935	1140	1082	1421	2246	136	926	60	570	2558	22	85	3127	1853	2757
22	434	36	4498	61	1428	0	7842	623	503	14429	0	0	462	740	931
86	4349	170	3233	322	10611	64	11598	1088	6266	24833	0	0	3744	7758	8352
45	3339	119	2164	269	7851	37	8132	499	2369	12371	0	0	1676	6151	5906
1	56	4	3	9	86	4	7	2	88	836	0	3	207	67	85
0	3009	16	124	32	11285	0	1968	23	380	877	0	0	119	9689	8794
0	1	0	0	0	7	0	0	0,2	1	0	0	0	0	3	7
1	110	13	7	25	357	0	21	0,4	9	218	0	0	21	308	409
0	233	0	109	0	822	46	1915	148	623	6104	26	0	166	3995	7193
0	2459	0	0	0	2643	0	0	0	36	0	0	0	0	2427	3815
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0,1
0	5	0,3	0	0,2	32	0	7	1	3	464	0	0	1	26	67
0,1	24	1	1	1	176	1	2	0,2	9	300	0	0	1	96	224
0	0	0	0,2	0	3	0	0	0	0,2	42	0	0	0	1	4
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0,1	0
2	80	15	54	58	99	0	620	3	0	19	0	0	8	147	651
331	6942	402	19075	315	15389	0	73219	758	0	6681	0	0	0	10043	27499
3639	21776	34763	38318	58764	94029	0	85889	158	0	152	0	242	99	62486	70311
30	1179	91	1820	176	7553	13	54677	195	0	84	30	0	19	14658	44891
0	5	0,3	0,4	1	25	0,1	1	0,1	3	102	0	0	1	17	33
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
1	34	6	4	11	52	0	3	0	2	27	0	0	12	34	42
0	6	0,3	0	0,4	49	0	1	0	0	3	0	0	0	31	48
0	436	0	0	0	490	0	415340	2791	1695	1308	0	0	742	64251	323822

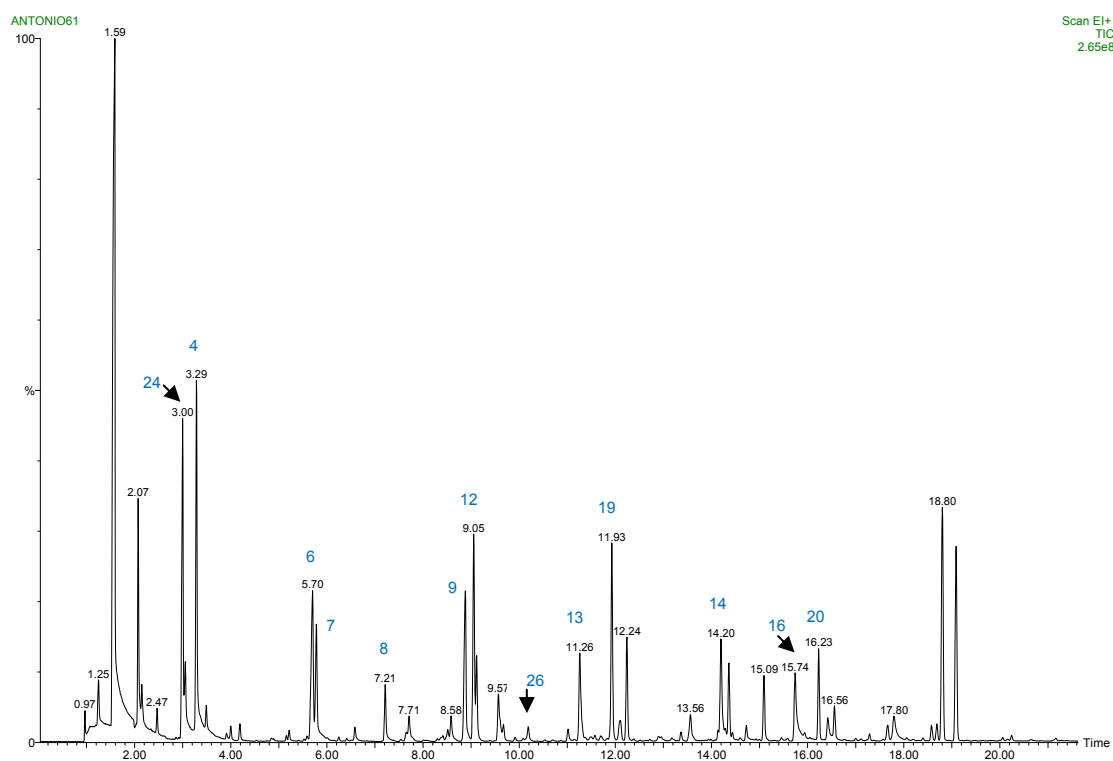


Figura 51. Cromatograma de gases de una muestra de destilado (están señalados algunos de los compuestos identificados que se recogen en la [Tabla 26](#)).

5.4.- Estudio de los aceites de orujo de oliva crudos extraídos de alperujos tratados térmicamente.

5.4.1. Evolución del contenido en componentes menores.

El aceite de orujo de oliva crudo se obtiene mediante extracción con disolvente (normalmente hexano comercial) a partir de orujo y alperujo seco, o bien mediante centrifugación de la pasta húmeda de aceituna en las industrias orujeras. El interés de la industria y de los investigadores por el aceite de orujo de oliva surge porque contiene todos los compuestos funcionales o biológicamente activos con propiedades saludables presentes en el aceite de oliva virgen (ácidos triterpénicos, esteroides, tocoferoles, etc.), excepto los polifenoles, en concentraciones incluso más altas. Estos compuestos son altamente demandados para aplicaciones alimentarias, cosméticas y farmacéuticas. El tratamiento térmico del alperujo con vapor en el nuevo reactor da como resultado un sólido enriquecido en aceite, hasta el 97 % (con respecto al control sin tratar) tras 60 minutos a 170 °C (ver [Tabla 12](#)). El objetivo de este estudio es evaluar los efectos del tiempo y la temperatura sobre la composición de los componentes menores y las modificaciones de las características fisicoquímicas de los aceites de orujo de oliva crudos obtenidos del alperujo después de dicho tratamiento. Dos muestras diferentes de alperujo, fresco y almacenado, se procesan en el nuevo reactor de tratamiento térmico a temperaturas comprendidas entre 150 y 170 °C y tiempos de 15 a 90 minutos. La muestra de alperujo fresco se obtuvo directamente a la salida de la centrífuga horizontal a partir del proceso de extracción del aceite de oliva virgen en la almazara experimental del Instituto de la Grasa (C.S.I.C.) y se trata inmediatamente en el reactor. La otra muestra de alperujo llevaba almacenada un cierto periodo de tiempo (2-3 meses) en la orujera industrial "Oleícola El Tejar".

La evaluación o determinación cuantitativa de los compuestos polares o productos de oxidación, polimerización e hidrólisis (oligopolímeros de triglicéridos, triglicéridos oxidados, diglicéridos y ácidos grasos libres) ([Tabla 27](#)) proporciona una indicación global del estado de degradación hidrolítica y oxidativa de los aceites ([Gomes y Caponio, 1997](#)). Los datos obtenidos muestran que los triglicéridos oxidados y el índice de peróxidos aumentan durante el tratamiento térmico con vapor del alperujo fresco y almacenado. No obstante, la formación de oligopolímeros de triglicéridos (dímeros) casi no tiene lugar ([Figura 52](#)), mostrando que el tratamiento térmico con vapor no trae consigo un nivel alto de deterioro oxidativo. La presencia de ácidos grasos libres y diglicéridos y los incrementos que se producen en sus concentraciones, principalmente debidos a las temperaturas que se alcanzan durante el tratamiento térmico con vapor, son indicativos de la degradación hidrolítica de los triglicéridos de los aceites ([Tabla 27](#)). La acidez aumenta en todas las muestras de aceites, tanto de alperujo fresco como almacenado. Sin embargo, mientras que los niveles de diglicéridos son más altos, los de los ácidos grasos libres sólo aumentan ligeramente. A pesar de los resultados, estos valores pueden considerarse "normales" para un

aceite de orujo de oliva y, en cualquier caso, el proceso de refinación posterior sirve para eliminar o reducir estos compuestos de alteración ([Gomes y Caponio, 1998](#)).

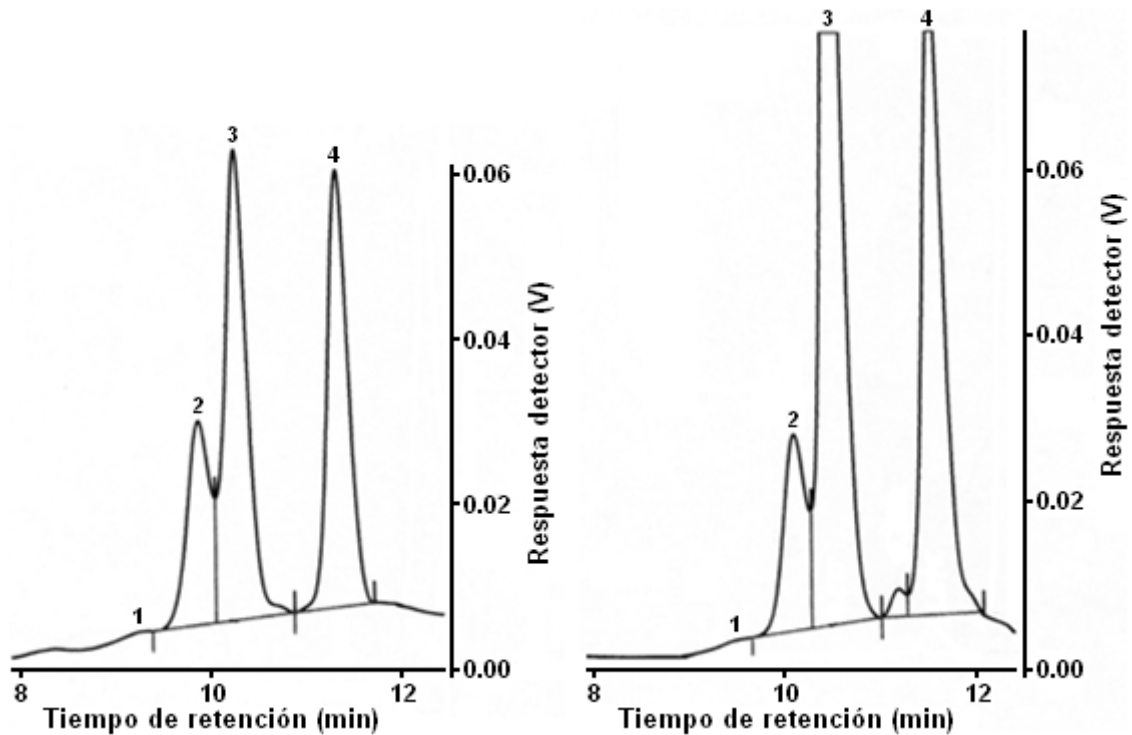


Figura 52. Cromatogramas de exclusión molecular del análisis de compuestos polares de los aceites de orujo de oliva crudo procedentes de alperujo fresco (izquierda) y alperujo tratado térmicamente 90 minutos a 160 °C (derecha): (1) dímeros de triglicéridos ($t_r = 9,4$ min); (2) triglicéridos oxidados ($t_r = 9,9$ min); (3) diglicéridos ($t_r = 10,4$ min) y (4) ácidos grasos libres ($t_r = 11,4$ min).

Tabla 27. Caracterización química de los aceites de orujo de oliva crudos obtenidos mediante extracción con hexano a partir de alperujos (fresco y almacenado) tratados térmicamente.

Componentes	Control	15'	30'	45'	60'	75'	90'
Alperujo fresco				Tratamientos a 160 °C			
Acidez							
(% ácido oleico > 0,5 %) ^b	2,0±0,1 ^a	2,7±0,1**	3,2±0,1***	3,2±0,1**	3,4±0,1***	3,6±0,1**	3,8±0,1***
I.P. (meq O ₂ /kg)	7,4±0,3	8,9±0,1	9,8±0,6**	11,9±0,4**	12,6±0,1***	13,4±0,2***	14,2±0,2***
Polares							
TG (%)	0,6±0,3	0,9±0,1	1,3±0,2*	0,7±0,1	0,9±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1
DG (%)	1,4±0,6	3,2±0,1*	3,5±0,1*	3,9±0,5*	3,7±0,1**	4,7±0,1***	5,1±0,3***
AGL (%)	1,3±0,4	2,6±0,1**	3,0±0,2**	2,7±0,4*	2,6±0,1*	2,4±0,1*	2,5±0,2*
Insaponificable (%)	2,23±0,02	3,02±0,23*	2,21±0,03	2,21±0,07	2,18±0,03	2,14±0,03	2,36±0,08
Componentes	Control	150 °C	160 °C	170 °C			
Alperujo almacenado		Tratamientos durante 1 hora					
Acidez							
(% ácido oleico > 0,5 %) ^b	3,6±0,1 ^a	4,7±0,1**	4,9±0,1**	5,1±0,1**			
I.P. ^c (meq O ₂ /kg)	8,7±0,8	9,4±0,7	10,9±0,1	12,3±0,4*			
Polares							
TG _{ox} ^c (%)	0,7±0,1	1,1±0,1**	1,1±0,1**	1,6±0,1***			
DG ^c (%)	2,5±0,1	5,2±0,1***	6,6±0,2***	6,6±0,2***			
AGL ^c (%)	3,3±0,1	2,8±0,1	2,9±0,1	2,8±0,1			
Insaponificable (%)	2,53±0,06	3,02±0,02**	2,50±0,01	2,54±0,01			

^a Desviación estándar (n = 3).

^b Límite característico relativo a la calidad del aceite de orujo de oliva crudo según el [Reglamento \(CEE\) nº 2568/91](#) y sus modificaciones.

^c Índice de peróxidos (I.P.); triglicéridos oxidados (TG_{ox}); diglicéridos (DG) y ácidos grasos libres (AGL).

* $p < 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$, respecto al control (sin tratar).

Esteroles

Las condiciones de tiempo y temperatura de los tratamientos térmicos afectan significativamente a las concentraciones de esteroides, alcoholes alifáticos y triterpénicos de todas las muestras de aceites (*Tablas 28 y 29*), ya sea alperujo fresco o almacenado, pero no a la composición cuantitativa de la fracción insaponificable, la cual se mantiene aproximadamente invariable para diferentes condiciones de tratamiento térmico (*Tabla 27*). El contenido de esteroides totales de las muestras de aceite extraído de alperujo fresco tratado a 160 °C de 15 a 90 minutos aumenta en todos los casos, y los incrementos varían del 17 al 32 %. Igualmente sucede con los aceites de alperujo almacenado tratado a 150, 160 y 170 °C durante 1 hora, con aumentos del 15 al 33 %. El tratamiento térmico del alperujo puede resultar probablemente en un aumento de la solubilidad de los esteroides presentes en la piel o en una mejor accesibilidad a la fracción de aceite de la semilla de la aceituna, abundante en esteroides, y explicaría la razón de estos incrementos. El aceite de la semilla es sólo parcialmente recuperado durante el procesamiento de la aceituna, y su contenido es bastante alto, aproximadamente el 27 % ([Ranalli y col., 2002](#)). Individualmente, los esteroides muestran en general la misma tendencia (*Tabla 28*) y los aceites procedentes de alperujo tratado contienen el mismo tipo de esteroides que el aceite control. β -Sitosterol es el principal esteroide cuantificado, representa aproximadamente el 90 % del contenido de esteroides totales, seguido por campesterol y Δ -5-avenasterol. La *Tabla 28* revela que 15 minutos de tratamiento térmico con vapor a 160 °C supone un notable incremento de las cantidades de β -sitosterol y campesterol, los cuales son particularmente abundantes en el aceite de la semilla como describen [Ranalli y col., 2002](#). Los resultados de este estudio sugieren que la fracción de aceite de la semilla puede contribuir a la composición de esteroides de los nuevos aceites de orujo de oliva.

Tabla 28. Composición esterólica (expresada en mg/kg de aceite) de los aceites de alperujo fresco y almacenado tratados térmicamente.

Componentes	Control	15'	30'	45'	60'	75'	90'
Alperujo fresco		Tratamientos a 160 °C					
Colesterol	5±1 ^a	15±1**	13±1**	7±1	11±1*	5±1	7±1
Campesterol	90±4	112±1*	117±2*	120±1**	123±1**	120±5*	126±9*
Campestanol	nd	7±1***	8±1***	7±1***	7±1***	7±1***	9±1***
Estigmasterol	23±1	29±1**	33±1**	30±1**	31±1**	33±2*	34±1**
Clerosterol	22±2	24±2	22±1	18±1	24±2	23±1	22±1
β-Sitosterol (≥ 93,0 %)^c	2495±42 (95,0 %) ^c	2966±29 (94,1 %)**	2289±113 (93,2 %)*	3208±10 (94,6 %)**	3234±53 (94,3 %)**	3264±133 (94,4 %)*	3277±61 (94,1 %)**
Sitostanol	48±2	48±4	47±5	47±4	49±3	45±3	49±1
Δ-5-Avenasterol	70±7	76±1	68±2	73±3	79±4	79±4	80±2
Δ-5,24-Estigmastadienol	11±2	15±1	13±1	14±1	17±1	20±1*	18±1*
Δ-7-Estigmastenol	7±1	10±1**	11±1*	8±1*	11±1**	12±1**	12±1**
Δ-7-Avenasterol	15±1	24±2*	39±1***	18±1*	23±3*	26±3*	29±1**
Total (≥ 2500)	2785±51	3326±25 (19) ^b **	3259±109 (17)*	3551±9 (28)**	3610±57 (30)**	3633±149 (30)*	3664±74 (32)*
Componentes	Control	150 °C	160 °C	170 °C			
Alperujo almacenado		Tratamientos durante 1 hora					
Colesterol	9±1 ^a	6±1	4±1**	5±1***			
Campesterol	145±1	175±12	196±3***	194±3***			
Campestanol	11±1	5±1**	8±1**	10±1			
Estigmasterol	47±1	50±1	53±4	47±3			
Clerosterol	34±2	21±2*	27±2*	24±2*			
β-Sitosterol (≥ 93,0 %)^c	4287±99 (94,4 %) ^c	5030±249 (94,8 %)*	5800±198 (95,0 %)*	5812±263 (95,1 %)*			
Sitostanol	nd	nd	nd	nd			
Δ-5-Avenasterol	304±1	317±22	372±16*	372±22*			
Δ-5,24-Estigmastadienol	25±2	22±1	23±1	25±1			
Δ-7-Estigmastenol	25±1	25±2	26±2	30±3			
Δ-7-Avenasterol	40±2	38±2	36±4	37±1			
Total (≥ 2500)	4927±104	5687±291 (15) ^b *	6546±216 (33)*	6555±298 (33)*			

^a Desviación estándar (n = 3).

^b Porcentajes de incremento con respecto al control sin tratar (en negrita valor máximo).

^c Límite característico relativo a la calidad del aceite de orujo de oliva crudo según el [Reglamento \(CEE\) n° 2568/91](#) y sus modificaciones.

* $p < 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$, respecto al control.

nd, no detectado.

Alcoholes alifáticos y triterpénicos

Las concentraciones de los alcoholes alifáticos (*Tabla 29*) alcanzan valores del 73 al 92 % más altos en las muestras de aceites extraídos de alperujo fresco tratado con vapor que en el aceite control correspondiente. En el caso de alperujo almacenado, cuyo contenido inicial de alcoholes alifáticos en el aceite control es mucho más alto, se observa únicamente un aumento del 10 % después de 1 hora de tratamiento a 170 °C. Los alcoholes alifáticos representan el 0,2 % de los lípidos en el hueso, y pueden alcanzar el 10 % en la piel, pero están prácticamente ausentes en la pulpa ([Bianchi, 2003](#)). El análisis de los alcoholes alifáticos de las muestras de aceite de alperujo fresco señalan que el alcohol alifático más abundante es el hexacosanol (C₂₆) y, a continuación, el tetracosanol (C₂₄) (*Tabla 29*). Los incrementos más acusados se producen para C₂₆ (80-90 %) y C₂₄ (60-70 %) para los tratamientos a 160 °C durante 15 a 90 minutos. Los resultados indican la contribución de la piel a la composición cuantitativa de alcoholes alifáticos de los aceites, la cual contiene cantidades más altas de C₂₆ que de C₂₄, mientras que en la fracción de aceite de semilla es más abundante C₂₄ que C₂₆ ([Ranalli y col., 2002](#)). En relación con el contenido en dialcoholes triterpénicos, conjunto de los dioles eritrodiol y uvaol, que están presentes principalmente en los lípidos cuticulares, el tratamiento térmico con vapor supone un aumento de los niveles de estos compuestos (*Tabla 29*); del 4 al 31 % en los aceites de alperujo fresco y del 6 al 23 % en los aceites de alperujo almacenado.

Tabla 29. Composición de alcoholes alifáticos y triterpénicos (mg/kg) de los aceites de alperujo fresco y almacenado tratados térmicamente.

Componentes	Control	15'	30'	45'	60'	75'	90'
Alperujo fresco		Tratamientos a 160 °C					
Alifáticos							
Docosanol	480±2 ^a	526±23	628±66	478±2	596±1***	575±7**	598±13**
Tetracosanol	962±10	1184±50*	1871±74**	1239±27**	1476±5***	1665±81**	1559±72**
Hexacosanol	1110±91	1609±154*	2356±22**	1980±96**	1856±24**	2178±144**	2004±127***
Octacosanol	315±39	470±26	636±16	555±3	483±5	551±35	514±38
Total	2866±139	3788±107 (32) ^{b*}	5490±101 (92)**	4251±123 (48)**	4412±33 (54)**	4968±267 (73)**	4675±250 (63)*
Triterpénicos							
Eritrodiol	394±3	404±5	516±5**	428±3**	473±9**	472±23*	499±6**
Uvaol	42±1	51±1***	56±2***	44±4	51±4*	54±3**	59±1**
Total	436±3	455±5	572±5	472±7	524±13	526±26	558±7
(> 4,5 %) ^c		(4)*	(31)***	(8)*	(20)**	(21)*	(28)***
	(13,5 %) ^c	(12,0 %)	(15,3 %)	(11,5 %)	(12,7 %)	(12,6 %)	(13,2 %)
Componentes	Control	150 °C	160 °C	170 °C			
Alperujo almacenado		Tratamientos durante 1 hora					
Alifáticos							
Docosanol	1120±29 ^a	904±53**	657±45**	827±155			
Tetracosanol	2738±39	2048±237	1846±176*	2310±54*			
Hexacosanol	2319±13	1885±269	2345±60	2332±183			
Octacosanol	888±4	695±143	1032±2***	920±94			
Total	5807±163	5532±703	5880±283 (1)*	6389±68 (10)*			
Triterpénicos							
Eritrodiol	880±49	929±26	1071±122	1045±94			
Uvaol	113±9	125±8	149±12	144±13			
Total	992±58	1054±34	1220±134	1189±107			
(> 4,5 %) ^c		(6) ^b	(23)	(20)			
	(17,8 %) ^c	(15,5 %)	(15,7 %)	(15,3 %)			

^a Desviación estándar (n = 3).

^b Porcentajes de incremento con respecto al control sin tratar (en negrita valor máximo).

^c Límite característico relativo a la calidad del aceite de orujo de oliva crudo según el [Reglamento \(CEE\) nº 2568/91](#) y sus modificaciones.

* $p < 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$, respecto al control.

Ceras, escualeno y tocoferoles.

Aparte de los ya mencionados, los aceites también contienen compuestos menos polares tales como ceras, hidrocarburos (escualeno) y tocoferoles. Las ceras son ésteres químicamente formados por una reacción de esterificación entre un ácido graso (C_{20} - C_{22}) y un alcohol (alifático C_{24} - C_{28} , terpénico o esterólico). Las ceras se encuentran en la semilla y en la cutícula de las aceitunas y de las hojas, y se incorporan al aceite durante la extracción, fundamentalmente con disolvente. Las ceras alifáticas C_{40} , C_{42} , C_{44} , C_{46} son muy abundantes en el aceite de orujo de oliva superando las 350 ppm ([Reglamento CEE nº 2568/91](#)). Como puede verse en la [Tabla 30](#), el aceite extraído de alperujo almacenado no tratado tiene dos veces más contenido de ceras que el aceite de alperujo fresco no tratado. Según trabajos previos, este resultado está de acuerdo con que la concentración de ceras es bastante más alta en aceites obtenidos de alperujo almacenado. El proceso de esterificación que ocurre espontáneamente durante el almacenamiento y que está influenciado por las condiciones de tiempo y temperatura ([Biedermann y col., 2008](#)) explica esta diferencia. En ambas muestras de alperujo analizadas, el tratamiento térmico con vapor parece favorecer la reacción de esterificación, pues la concentración de ceras aumenta hasta el 120 %, en ambos casos.

El escualeno es el principal hidrocarburo de los aceites de orujo de oliva crudos analizados y está presente de forma muy abundante ([Tabla 30](#)). Después de 15 y 30 minutos de tratamiento a 160 °C la concentración de escualeno se incrementa 57-54 % en los aceites de alperujo fresco. En cambio, entre 45 y 90 minutos de tratamiento, disminuye gradualmente. En el caso de alperujo almacenado, 1 hora de tratamiento a 170 °C aumenta la concentración de escualeno hasta el 43 %. Algunos autores han descrito cómo la temperatura es el parámetro más importante para la extracción efectiva de escualeno a partir de la biomasa de la aceituna ([Waldebäck y col., 2006](#)). Sin embargo, la particular estructura insaturada del escualeno puede ser dañada durante el tratamiento prolongado, produciéndose compuestos de isomerización del escualeno y productos de deshidratación del escualeno oxidado ([Lanzón y col., 1994](#)), lo cual parece no estar ocurriendo significativamente en este caso.

Otro importante grupo de componentes menores de los aceites extraídos son los tocoferoles (α , β y γ -tocoferol). Los resultados de los análisis de tocoferoles se recogen en la [Tabla 30](#), mostrando que el tratamiento con vapor mejora la posterior extracción de los mismos. Durante el tratamiento con vapor, la rotura de las paredes y compartimentos celulares, favorece la liberación de los tocoferoles en los aceites de alperujo fresco y almacenado. Los tocoferoles se oxidan fácilmente y las pérdidas por oxidación pueden ser importantes ([Gómez-Coronado y col., 2004](#)), pero bajo las condiciones de tiempo y temperatura de los tratamientos aplicados, el porcentaje de tocoferoles totales relativo al contenido inicial se incrementa hasta el 57 % en los aceites de ambas procedencias. El α -tocoferol es el más abundante y supone aproximadamente el 90 % del contenido total en las dos muestras de aceite de alperujo sin tratar. Después del

tratamiento, las proporciones relativas de los tocoferoles se modifican. Cada uno sigue una tendencia dependiendo del tipo de alperujo y de las condiciones del tratamiento. El β -tocoferol experimenta un considerable enriquecimiento de hasta 26 veces con respecto al aceite control de alperujo fresco; los contenidos de α y γ -tocoferol aumentan 1,3 y 2,4 veces, respectivamente. Sin embargo, en los aceites de alperujo almacenado, los niveles de α -tocoferol disminuyen ligeramente, y el contenido de γ -tocoferol se incrementa notablemente, aproximadamente 4, 11 y 10 veces más que en el aceite control tras los tratamientos a 150, 160 y 170 °C durante 1 hora, respectivamente.

Tabla 30. Composición total de ceras, escualeno y tocoferoles (mg/kg de aceite) de los aceites de alperujo fresco y almacenado tratados térmicamente.

Componentes	Control	15'	30'	45'	60'	75'	90'
Alperujo fresco		Tratamientos a 160 °C					
Ceras (C₄₀₋₄₆) (> 350)^c	702±7 ^a	791±28 (13) ^{b*}	1192±44 (70)**	1414±10 (101)***	1565±49 (123)**	1367±20 (95)***	1272±36 (81)***
Escualeno	3092±13	4860±146 (57)**	4763±136 (54)**	3709±345 (20)*	3640±220 (18)	3109±93 (1)	2716±36
Tocoferoles							
α-Tocoferol	328±5	325±14	237±6**	303±14	340±24	407±31*	355±21
β-Tocoferol	4±1	11±1*	42±5**	63±3***	57±3***	103±8***	94±7***
γ-Tocoferol	16±1	20±2	30±6	38±5*	30±4*	35±5**	38±8**
Total	347±7	356±18 (3)	309±16 (-11)*	404±21 (16)**	426±31 (23)*	545±44 (57)*	487±36 (40)*
Componentes	Control	150 °C	160 °C	170 °C			
Alperujo almacenado		Tratamientos durante 1 hora					
Ceras (C₄₀₋₄₆) (> 350)^c	1535±3 ^a	2971±5 (94) ^{b***}	3124±3 (104)***	3461±110 (125)***			
Escualeno	2404±36	2472±11 (3)	2729±109 (14)	3439±171 (43)*			
Tocoferoles							
α-Tocoferol	389±25	302±2*	334±3	223±1*			
β-Tocoferol	10±2	45±4*	38±3*	35±5*			
γ-Tocoferol	26±6	113±1**	296±9***	276±14**			
Total	425±33	460±6 (8)	668±14 (57)**	533±20 (25)*			

^a Desviación estándar (n = 3).

^b Porcentajes de incremento con respecto al control sin tratar (en negrita valor máximo).

^c Límite característico relativo a la calidad del aceite de orujo de oliva crudo según el [Reglamento \(CEE\) nº 2568/91](#) y sus modificaciones.

* $p < 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$, respecto al control.

Ácidos triterpénicos

Una gran proporción de ácidos triterpénicos pentacíclicos (maslínico y oleanólico) se concentran en el epicarpio (capa externa de la piel de la aceituna) ([Bianchi, 2003](#)). El sistema de extracción del aceite influye en las cantidades de ácidos triterpénicos que se transfieren de la aceituna al aceite, y los aceites de orujo de oliva crudos provenientes de extracción con disolvente muestran grandes cantidades de ácidos triterpénicos ([Pérez-Camino y col., 1999](#)). En la *Figura 53* se observa que el ácido oleanólico es el componente minoritario más abundante identificado en los aceites y se encuentra en una concentración mucho más alta que la del ácido maslínico, el cual es pobremente recuperado en el aceite obtenido mediante extracción con hexano ([García y col., 2008](#)). La concentración de ácido oleanólico es más alta en el aceite de alperujo almacenado no tratado que en el aceite de alperujo fresco no tratado. Este resultado confirma que la degradación del material de partida aumenta el contenido de ácidos triterpénicos ([Pérez-Camino y col., 1999](#)). Durante el periodo de almacenamiento del alperujo se concentran los compuestos lipofílicos en la fase oleosa, de aquí la diferencia de que el aceite tenga una concentración más alta de ácidos triterpénicos ([García y col., 2008](#)). Sin embargo, el comportamiento de ambos ácidos es muy diferente tras el tratamiento de alperujo fresco y almacenado. Las concentraciones de ambos ácidos en los aceites extraídos de alperujo fresco tratado son bastante similares a las del aceite control de alperujo fresco no tratado, pero cuando se trata de alperujo almacenado, la concentración de ácido oleanólico disminuye notablemente y la de ácido maslínico aumenta ligeramente.

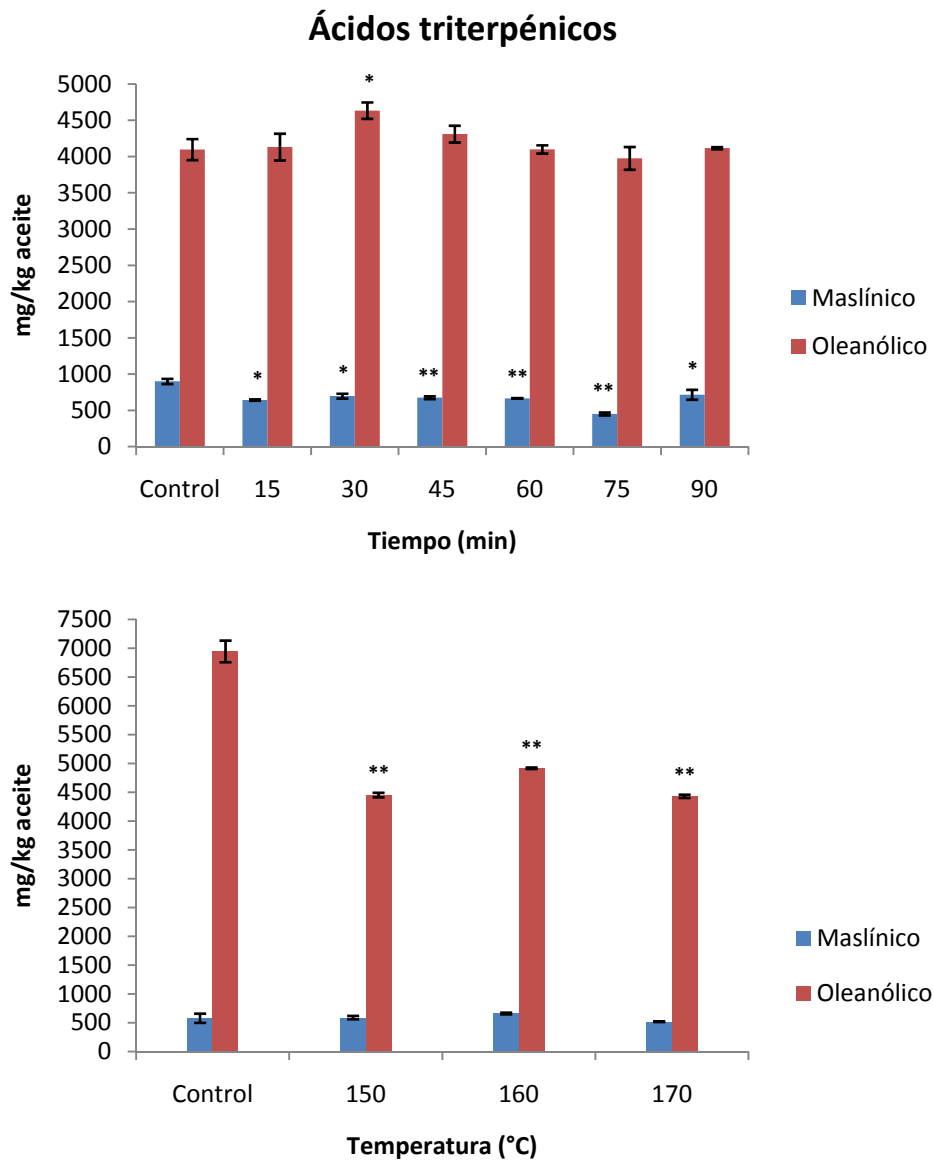


Figura 53. Concentración en ácidos triterpénicos de los diferentes aceites obtenidos después de los tratamientos hidrotérmicos. La figura muestra la evolución con el tiempo a 160 °C en alperujo fresco (arriba) y con la temperatura (después de 60 minutos de tratamiento) en alperujo almacenado (abajo). Las barras indican la desviación estándar de dos replicados. * $p < 0,05$, ** $< 0,01$, respecto al control sin tratar.

5.4.2.- Ventajas del tratamiento térmico sobre el nuevo aceite de orujo.

Los nuevos aceites de orujo de oliva crudo obtenidos mediante el tratamiento térmico tendrían que ser sometidos a un proceso de refinación para su utilización comercial (al igual que los aceites que se obtienen sin tratamiento). La refinación (física o química) del aceite de orujo de oliva crudo es un proceso necesario para eliminar o reducir sustancias indeseables tales como ácidos grasos libres, compuestos volátiles responsables del mal olor y compuestos coloreados, y hacerlo adecuado al consumo humano; pero la refinación también supone la pérdida de muchos componentes minoritarios con interesantes propiedades nutricionales (ácidos triterpénicos, esteroides, polifenoles, tocoferoles y otros). Por lo general, el contenido final de cada componente depende de las condiciones de las etapas de refinación física o química. El interés de la industria por la calidad nutricional de los aceites vegetales, teniendo en cuenta la importancia de estas sustancias, ha llevado a realizar mejoras en el proceso con el objetivo de lograr una refinación efectiva que elimine una menor proporción de componentes menores del aceite ([Antonopoulos y col., 2006](#)). Ciertamente, la concentración final de los componentes menores del aceite dependerá de los valores iniciales en el aceite crudo. En este trabajo se observa que estos nuevos aceites de orujo extraídos a partir de alperujo tratado se enriquecen en componentes menores lipofílicos durante el tratamiento térmico con vapor y retendrán, después de la refinación, una cantidad significativamente mayor de compuestos valiosos. De modo que estos aceites pueden ser considerados una buena fuente de compuestos con actividades biológicas, ya que durante la refinación muchos de ellos pueden ser recuperados.

Los ácidos triterpénicos y los tocoferoles son drásticamente reducidos por el proceso de refinación, de un 50 a un 80 % ([Pérez-Camino y col., 1999](#)) y hasta el 72 % ([Ortega-García y col., 2006](#)), respectivamente durante la etapa de desodorización. Sin embargo, con el tratamiento térmico con vapor el ácido oleanólico se incrementa un 16 % y los tocoferoles significativamente hasta un 57 %. Los resultados muestran que la nueva propuesta de tratamiento térmico del alperujo es coincidente con la tendencia actual de mantener concentraciones más altas de compuestos antioxidantes en los aceites de orujo de oliva y presenta las siguientes ventajas:

1. El tratamiento térmico del alperujo modifica las proporciones relativas de cada uno de los tocoferoles. Aumentan sobre todo β y γ tocoferol mientras que la concentración de α -tocoferol, el más abundante, o bien se incrementa ligeramente, o bien disminuye ([Tabla 30](#)). Se ha comprobado que el α -tocoferol es la forma más activa en los ensayos biológicos *in vivo*, pero su actividad en la inhibición de la peroxidación lipídica de aceites y grasas es la más baja. En cambio, el β -tocoferol tiene un efecto protector del medio lipídico mayor que la forma α y presenta una actividad *in vivo* media ([López y col., 2004](#)). Sin embargo, el isómero γ ha mostrado, recientemente, una alta actividad antiinflamatoria y anticancerosa en estudios en humanos ([Reiter y col., 2007](#)). Por lo tanto, el incremento en el contenido total de tocoferoles, principalmente β y γ -

tocoferol, no solo mejoraría la estabilidad oxidativa del nuevo aceite de orujo, sino también sus beneficios saludables por sus propiedades anticancerosas y antiinflamatorias, entre otras.

2. La refinación también causa una reducción significativa en el contenido de esteroides totales; de un 7,2 a un 24,3 % debido a la refinación física y de un 22,3 a un 43,0 % por refinación química durante los diferentes pasos del proceso (desgomado, decoloración, neutralización y desodorización) ([Ortega-García y col., 2006](#); [Ruiz Méndez y col., 2008](#)). Sin embargo, con el tratamiento térmico del alperujo en el nuevo reactor aumenta la concentración de esteroides hasta un 33 % con respecto al contenido total inicial, por lo que la concentración final de esteroides en este nuevo aceite de orujo después del proceso de refinación sería similar a la del aceite de orujo crudo tradicional antes de ser refinado, lo cual mejoraría la calidad nutricional y funcional del nuevo aceite de orujo de oliva. Con ello se potenciaría el buen efecto hipocolesterolemico del aceite (según las propiedades más significativas de los esteroides vegetales), que aumenta la relación HDL/LDL, con lo que se evita que las LDLs acumulen el colesterol en las arterias. Asimismo, se favorecerían otras propiedades relacionadas con los esteroides tales como posibles efectos antiinflamatorios y anticancerosos y potenciadores del sistema inmune.

3. Finalmente, la cantidad de escualeno de los aceites aumenta notablemente mediante el tratamiento térmico del alperujo alcanzando un valor máximo del 57 %. El contenido de escualeno se reduce extraordinariamente durante el proceso de refinación, pero este hidrocarburo insaturado antioxidante se recupera a partir de los destilados de la desodorización de estos aceites ([Bondioli y col., 2006](#)). El tratamiento térmico con vapor aumenta sustancialmente la cantidad de escualeno que puede ser recuperado. El escualeno protege la piel humana, potencia los efectos de algunos fármacos que reducen el colesterol y podría ser un interesante candidato para minimizar los efectos secundarios del tratamiento oncológico.

Por lo tanto, este estudio demuestra la efectividad del nuevo tratamiento térmico que podría mejorar el valor comercial del aceite de orujo al aumentar la concentración de sus componentes bioactivos.

5.5.- Obtención y purificación de oligosacáridos a partir del tratamiento térmico del alperujo.

5.5.1.- Obtención de oligosacáridos neutros y pécticos.

El tratamiento térmico con vapor del alperujo solubiliza azúcares en forma de monómeros y polisacáridos como las hemicelulosas y las pectinas, los cuales son recuperados en la fase líquida. En este estudio se usa la fracción líquida obtenida a partir de un tratamiento a 170 °C durante 15 minutos. En la *Tabla 31* se recoge un análisis de la composición de azúcares de esta fase acuosa liofilizada después de una extracción con acetato de etilo que la deja exenta, en principio, de compuestos fenólicos de bajo peso molecular (*Obied y col., 2005b*). Se observa por la composición de azúcares enlazados (obtenida mediante hidrólisis con TFA 2 N a 120 °C durante 2 horas) que el liofilizado de la fase acuosa contiene oligosacáridos y/o polisacáridos, cuyos monómeros están constituidos sobre todo por glucosa, arabinosa, ramnosa, xilosa y ácido galacturónico. Para obtener oligómeros de bajo peso molecular y, específicamente, oligosacáridos (DP 2-10) de azúcares neutros y ácidos es necesario hidrolizar los polisacáridos solubilizados.

Tabla 31. Composición de azúcares neutros y ácidos urónicos (libres y enlazados) del liofilizado de la fase acuosa de un alperujo tratado térmicamente a 170 °C durante 15 minutos.

Azúcares	% en peso (materia liofilizada)	
	Libres ^a	Enlazados ^b
Glucurónico	0,29 ± 0,03 ^c	nd
Galacturónico	0,61 ± 0,05	0,83 ± 0,06
Glucosa	30,04 ± 2,95	6,90 ± 0,27
Galactosa	nd	nd
Xilosa	0,28 ± 0,01	0,44 ± 0,04
Arabinosa	0,11 ± 0,01	2,75 ± 0,30
Fucosa	nd	0,05 ± 0,01
Ramnosa	0,07 ± 0,01	0,90 ± 0,08

^a El contenido de azúcares libres en la fase acuosa se determina directamente por HPLC como derivados de *p*-aminobenzoato de etilo (ABEE).

^b La cantidad de azúcares enlazados en las soluciones se calcula por diferencia entre la concentración de monosacáridos antes y después de una hidrólisis con TFA 2 N a 120 °C durante 2 horas.

^c Desviaciones estándar (n = 3).

nd, no detectado.

Para conocer la distribución de pesos moleculares de los azúcares solubilizados, el liofilizado de la fase acuosa se fracciona mediante precipitación con etanol. Se pesan 12,3 g de liofilizado, se disuelven en 250 mL de agua destilada y la solución se mantiene en agitación suave durante 3 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se centrifuga a 5000 rpm y se separa un residuo insoluble que constituye el 5 % del liofilizado inicial. La solución resultante o sobrenadante se somete a una precipitación fraccionada con concentraciones crecientes de etanol/agua al 20, 40, 60, 80 y 90 % (v/v). Alícuotas de etanol se añaden bajo agitación continua hasta una concentración final del 90 % (v/v). Las mezclas se mantienen en agitación durante 24 horas a 4 °C. Los precipitados se recuperan por centrifugación (5000 rpm, 20 min, 4 °C), se disuelven en agua desionizada y se liofilizan proporcionando cinco fracciones $F_{0-20\%}$, $F_{20-40\%}$, $F_{40-60\%}$, $F_{60-80\%}$ y $F_{80-90\%}$ que representan el 0,7, 20,3, 6,3, 11,8 y 2,7 % (porcentajes basados en la cantidad de liofilizado inicial), respectivamente. El etanol se elimina del sobrenadante en evaporador rotatorio y se recupera como fracción $F_{>90\%}$. Las fracciones $F_{0-20\%}$, $F_{20-40\%}$, $F_{40-60\%}$ y $F_{60-80\%}$ se reúnen para obtener una fracción $F_{0-80\%}$. Las fracciones $F_{80-90\%}$ y $F_{>90\%}$ se reúnen en una fracción denominada $F_{>80\%}$. A continuación se realizan ultrafiltraciones con membranas de corte molecular de 10000, 5000, 3000 y 1000 Da. Durante el proceso de ultrafiltración (según el esquema de la [Figura 54](#)), las fracciones de peso molecular inferior al corte pasan a través de la membrana (permeado) mientras que aquellas de mayor peso molecular se recogen como retenido. Las ultrafiltraciones se paran cuando se recogen 200 mL de permeado mediante lavado con agua. Los permeados y los retenidos de las fracciones $F_{0-80\%}$ y $F_{>80\%}$ se analizan mediante HPLC como derivados ABEE ([Tabla 32](#)).

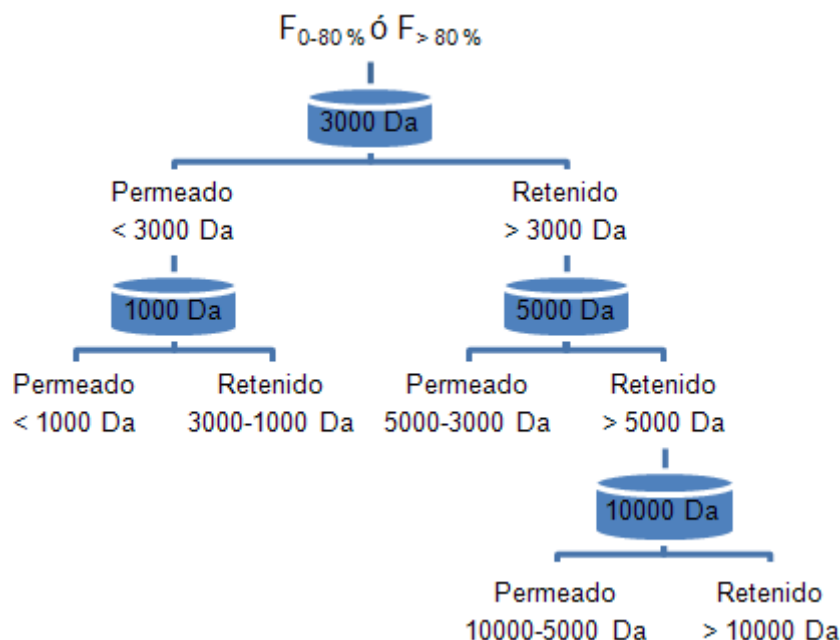


Figura 54. Esquema de ultrafiltración llevado a cabo para determinar la distribución de pesos moleculares de los azúcares solubilizados en la fase acuosa por el tratamiento térmico.

La solución acuosa de etanol al 80 % (v/v) favorece la solubilización de los fragmentos de peso molecular más bajo, por debajo de 3000 Da. Por el contrario los polisacáridos precipitados con una concentración de etanol de hasta el 80 % (v/v) muestran los pesos moleculares más altos (*Tabla 32*). Sin embargo, la solubilidad en alcohol de los carbohidratos, es dependiente, no sólo del grado de polimerización (DP), sino también de la estructura molecular. De ahí que los polisacáridos altamente ramificados puedan ser solubles en etanol al 80 %, a pesar de tener un DP considerable. Las fracciones de peso molecular superior a 3000 Da representan el 74,2 % de los polisacáridos cuantificados. En comparación con las otras fracciones, $F_{0-80\%}$ de peso molecular superior a 10000 Da y $F_{>80\%}$ entre 3000 y 1000 Da son significativamente diferentes ya que tienen el contenido más alto de polisacáridos (58,6 y 18,4 %, respectivamente). La *Figura 55* muestra los perfiles cromatográficos HPLC y la composición de azúcares libres y polisacáridos de las dos principales fracciones de polisacáridos ($F_{0-80\%}$ de peso molecular superior a 10000 Da y $F_{>80\%}$ de peso molecular entre 3000 y 1000 Da). Los resultados indican que la fracción $F_{0-80\%}$ de peso molecular superior a 10000 Da es rica en polisacáridos de ácido galacturónico y arabinosa principalmente (11,9 y 13,9 %). La fracción $F_{>80\%}$ de peso molecular entre 3000 y 1000 Da contiene fundamentalmente polisacáridos de glucosa. El tratamiento térmico consigue la producción de oligómeros y, sin duda, la fracción $F_{>80\%}$ (3000-1000 Da) es una buena candidata para obtener oligosacáridos, sin embargo aún queda un elevado porcentaje de polisacáridos que pueden ser hidrolizados para aumentar el rendimiento de estos oligómeros. Por esta razón, se procede a desarrollar métodos de hidrólisis que permitan aumentar la cantidad de oligómeros. Por un lado, se estudiarán hidrólisis químicas con ácido clorhídrico y trifluoroacético y, por otro, hidrólisis enzimáticas.

Tabla 32. Distribución de pesos moleculares y composición de azúcares libres y polisacáridos de los permeados y retenidos por ultrafiltración a partir de las fracciones separadas por precipitación con etanol. Los porcentajes están referidos a la cantidad total de azúcares libres y polisacáridos cuantificados, respectivamente.

Fracción	Rango de PM (Da)	Porcentaje de azúcares libres (%) ^a	Porcentaje de polisacáridos (%) ^b
F ₀₋₈₀ %	> 10000	0,2	58,6
	10000-5000	nd	4,0
	5000-3000	0,1	2,2
	3000-1000	0,3	4,6
	< 1000	6,5	2,8
F _{> 80} %	> 10000	nd	2,9
	10000-5000	nd	3,8
	5000-3000	0,1	2,7
	3000-1000	8,4	18,4
	< 1000	84,4	nd

^a Porcentaje de monómeros medidos directamente por HPLC como derivados ABEE.

^b El porcentaje de polisacáridos se calcula por diferencia entre la concentración de monosacáridos antes y después de una hidrólisis con TFA 2 N a 120 °C durante 2 horas.

nd, no detectado.

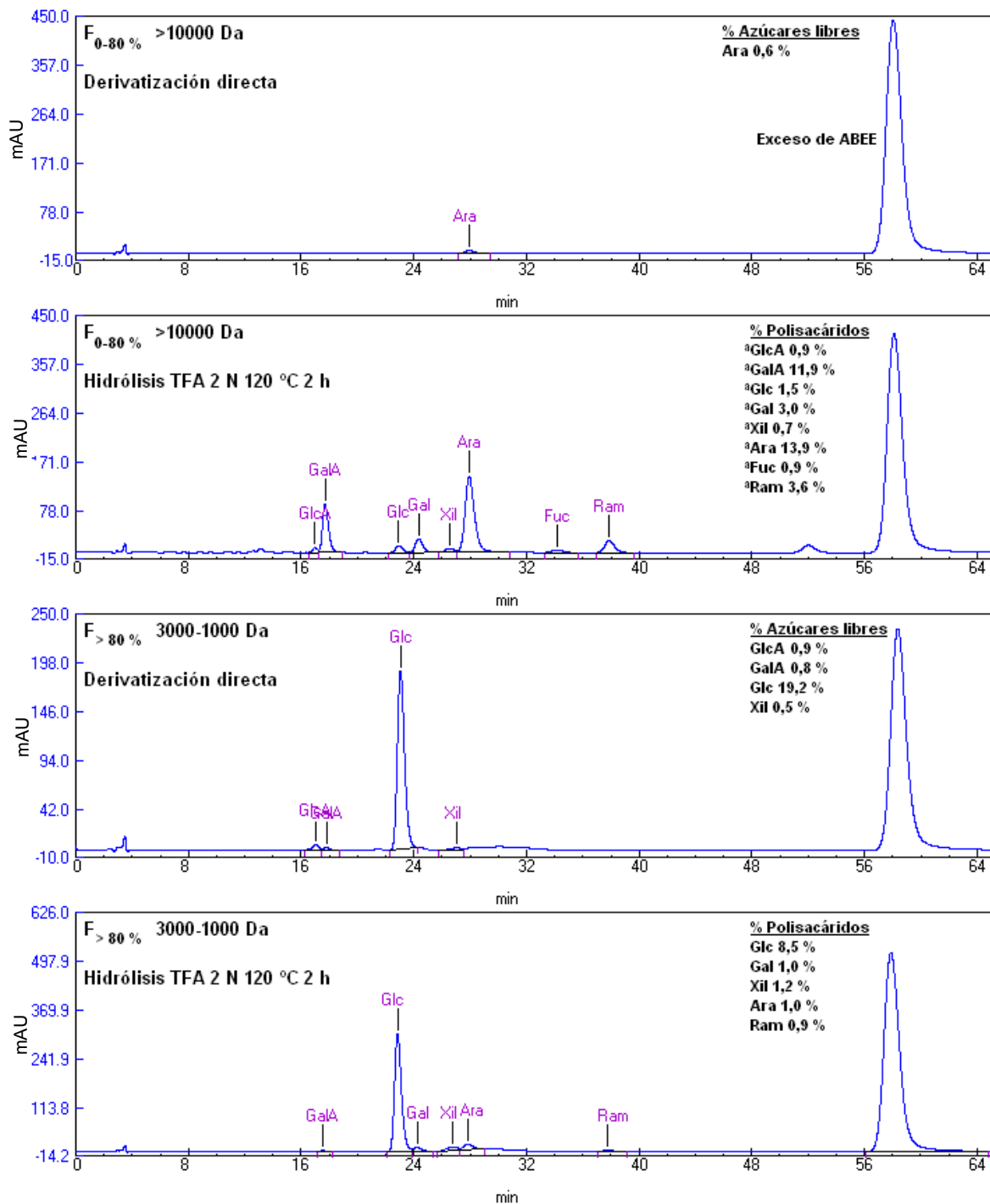


Figura 55. Cromatogramas HPLC de las fracciones F_{0-80} % mayor de 10000 Da y $F_{>80}$ % entre 3000 y 1000 Da (con y sin hidrólisis con TFA). Se muestra la composición de azúcares libres y polisacáridos (expresada en porcentaje de materia liofilizada inicial). El porcentaje de polisacáridos se calcula por diferencia entre la concentración de monosacáridos antes y después de una hidrólisis con TFA 2 N a 120 °C durante 2 horas. (a) GlcA, ácido glucurónico; GalA, ácido galacturónico; Glc, glucosa; Gal, galactosa; Xil, xilosa; Ara, arabinosa; Fuc, fucosa; Ram, ramnosa.

Se han estudiado las condiciones de hidrólisis para llevar a cabo la obtención de oligosacáridos neutros y ácidos o pécticos de diferentes grados de polimerización (DP 2-9 unidades) por vía química y/o enzimática. Previamente se llevan a cabo experiencias para desarrollar un método de análisis “rápido” para obtener la máxima liberación de ácido galacturónico que permita la cuantificación del mismo en los polímeros pécticos. Se realizan dos diferentes procedimientos de hidrólisis, uno químico con ácido trifluoroacético (TFA) a 120 °C, a diferentes concentraciones (0,2, 1; 2; 3 y 4 N) y tiempos (1, 2, 3, 4 y 5 horas), y otro enzimático con Olivex a 40 °C y diferentes tiempos (0-48 horas). La cromatografía HPLC-UV ha sido usada como técnica analítica para la cuantificación del ácido galacturónico, previamente derivatizado con *p*-aminobenzoato de etilo (ABEE), después de las hidrólisis.

Hidrólisis química para el análisis de pectinas

Los resultados obtenidos mediante hidrólisis química del liofilizado de la fase acuosa, de un alperujo tratado térmicamente a 170 °C durante 15 minutos, con diferentes concentraciones de TFA a 120 °C se muestran en la [Figura 56](#). Como se observa en la gráfica la recuperación de ácido galacturónico libre después del tratamiento con ácido trifluoroacético 0,2 y 1 N es más alta después de 3 horas (0,78 y 1,25 % p/p relativos a peso de liofilizado), y de 2 horas con TFA 2, 3 y 4 N (1,63; 1,52 y 1,25 %), respectivamente. La liberación de ácido galacturónico es más rápida con concentraciones más altas de TFA. La concentración de ácido galacturónico aumenta hasta alcanzar un valor máximo de 1,63 % (p/p) con la concentración intermedia, de entre las ensayadas, de ácido trifluoroacético (tratamiento 2 N durante 2 horas). Para tiempos de hidrólisis más largos el ácido galacturónico liberado experimenta mayor degradación, formando lactonas en cantidades indeterminadas ([Blake y Richards, 1968](#)). Los resultados de las hidrólisis químicas con TFA 2 N durante 2 horas a más bajas temperaturas, ensayadas para romper las cadenas de los polisacáridos neutros a oligómeros, proporcionan también bajas recuperaciones de ácido galacturónico libre: 0, 0,45 y 1,59 % para 70, 90 y 100 °C, respectivamente, pero más alta a 110 °C (bajo estas condiciones se cuantifica un máximo de 5,43 %). Se observan efectos similares de degradación de ácido galacturónico. Las condiciones ensayadas de hidrólisis ácida no son adecuadas para el análisis cuantitativo del contenido de ácido galacturónico en los oligosacáridos y polisacáridos pécticos.

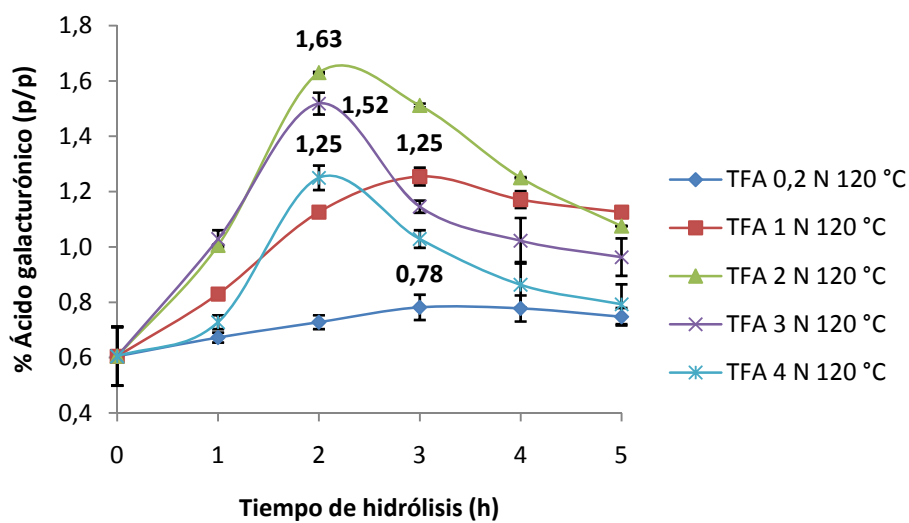


Figura 56. Porcentajes de liberación o recuperación de ácido galacturónico con el tiempo (expresados en g/100 g liofilizado) a partir del liofilizado de la fase acuosa libre de fenoles sometido a tratamiento con TFA 0,2, 1, 2, 3 y 4 N a 120 °C. En cada caso se indican los valores máximos de recuperación de ácido galacturónico. Las barras sobre los datos representan las desviaciones estándar.

Hidrólisis enzimática con Olivex para el análisis de pectinas

El contenido de ácido galacturónico recuperado mediante hidrólisis química es bajo. La hidrólisis enzimática de pectinas es una técnica más conveniente para la hidrólisis de estos polímeros sin degradación. Sin embargo, este procedimiento necesita de diferentes tipos de actividades enzimáticas tales como pectinolíticas, hemicelulolíticas e hidrolasas para la eficiente degradación ([Garna y col., 2006](#)). En este sentido, se investigan las condiciones de hidrólisis enzimática mediante el estudio de la liberación y degradación con el tiempo de las cadenas de ácido galacturónico con Olivex. Éste es un preparado enzimático comercial rico en diferentes enzimas pectinolíticas y con actividad hemicelulolítica y celulolítica (se desconoce la composición concreta) producido por *Aspergillus aculeatus* y adaptado para la extracción de aceite de oliva que produce casi una degradación completa de los polímeros a oligosacáridos y monosacáridos ([Vierhuis y col., 2003](#)). A diferencia de la hidrólisis ácida, la hidrólisis enzimática con Olivex conduce a rendimientos mucho más altos de ácido galacturónico (hasta un 18,5 % relativo a peso de liofilizado), que indican una despolimerización más completa de las cadenas de ácido galacturónico de las polisacáridos pécticos del liofilizado de la fase acuosa libre de fenoles ([Figura 57](#)) y, por tanto, se obtiene una mejor cuantificación de este componente. Según estos resultados, la hidrólisis enzimática con Olivex a 40 °C durante 6 horas puede usarse para cuantificar el ácido galacturónico de las pectinas sin degradación.

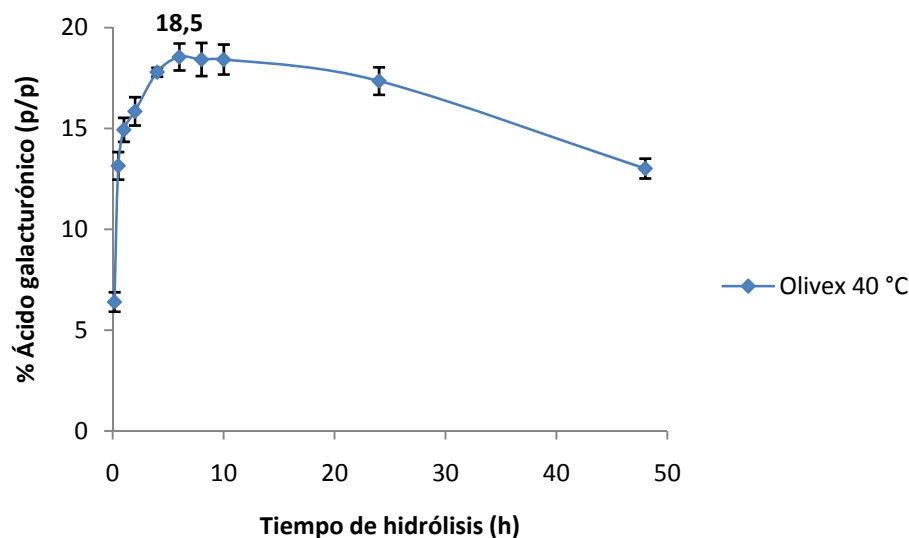


Figura 57. Porcentajes de liberación o recuperación de ácido galacturónico con el tiempo (expresados en g/100 g liofilizado) a partir del liofilizado de la fase acuosa libre de fenoles sometido a tratamiento con Olivex en buffer acetato sódico pH 5 a 40 °C y diferentes tiempos de hidrólisis. Se indica el valor máximo de recuperación de ácido galacturónico, que se obtiene después de 6 horas de incubación. Las barras sobre los datos representan las desviaciones estándar.

Hidrólisis química con ácido clorhídrico y trifluoroacético para la obtención de oligosacáridos.

A continuación se procede a determinar la mejor forma de obtener una alta recuperación de oligómeros de los polisacáridos, por lo que se llevan a cabo varios procedimientos de hidrólisis.

Muchos estudios han sido llevados a cabo sobre la hidrólisis química de cadenas de azúcares ([Salvador y col., 2000](#); [Le Goff y col., 2001](#); [Garna y col., 2004](#)). Ácidos tales como el ácido clorhídrico (HCl) y el ácido trifluoroacético (TFA) han sido probados para la hidrólisis de polisacáridos. Por ejemplo, mediante el tratamiento de hidrólisis ácido con HCl se consigue la obtención de oligosacáridos a partir de residuos de la industria alimentaria ([Suzuki y col., 2002](#)). El presente trabajo tiene como objetivo en este punto estudiar las condiciones de hidrólisis para producir la máxima cantidad de oligómeros de bajo grado de polimerización a partir de la fracción líquida obtenida del tratamiento térmico del alperujo. Las concentraciones, temperaturas y tiempos de hidrólisis comúnmente usadas en la bibliografía varían ampliamente. En este caso, se llevan a cabo dos experiencias utilizando una hidrólisis con HCl 0,5 N a 70 °C y diferentes tiempos (0,5, 1, 2, 4, 6 y 8 horas) y otra con TFA 2 N durante 2 horas a diferentes temperaturas (70, 90, 100 y 110 °C). Una muestra de la fracción F₀₋₈₀ % se hidroliza con 2 mL de ácido. El medio de reacción se neutraliza, se filtra y se somete a ultrafiltración con una membrana de corte de peso molecular de 3000 Da para separar los oligómeros con la distribución de masa molecular más pequeña. Se toman alícuotas de los permeados (líquidos que han pasado a través de la membrana) y se someten a una hidrólisis ácida cuantitativa con TFA 2 N a 120 °C durante 2 horas para convertirlos a sus monómeros constitutivos. Finalmente éstos se analizan mediante HPLC para evaluar la producción de oligómeros de bajo grado de polimerización.

La hidrólisis química con ácido HCl muestra que la liberación de oligómeros de azúcares neutros no se realiza a la misma velocidad para cada azúcar ([Tabla 33](#)). La hidrólisis química con ácido clorhídrico 0,5 N a 70 °C durante 2 horas se caracteriza por una buena liberación de oligómeros de glucosa (57 %), de xilosa (40 %), de galactosa (45 %) y de ramnosa (27 %). Sin embargo, con la hidrólisis química con TFA 2 N en las mismas condiciones (70 °C, 2 horas) se obtiene un menor rendimiento de la degradación a oligómeros de glucosa (31 %), de galactosa (40 %) y de ramnosa (27 %), aunque mayor de xilosa (63 %) ([Tabla 34](#)).

La hidrólisis química de los polisacáridos neutros con ácido parece combinar dos fenómenos simultáneos: primero, la liberación de azúcares a monómeros y oligómeros, como productos de la hidrólisis y, segundo, su degradación bajo la acción del ácido y el calor. Por este motivo la liberación de los diferentes azúcares de los polisacáridos no ocurre por igual y hay diferentes parámetros que se pueden tener en cuenta para optimizar la producción de los oligómeros (ácido, tiempo y temperatura). Sobre esta base, se puede concluir que las condiciones de hidrólisis con ácido HCl parecen ser más adecuadas para la producción de oligómeros.

Mientras, el uso de TFA para la hidrólisis de los polisacáridos causa menos degradación a los azúcares (los porcentajes de monómeros son mayores que los alcanzados con HCl). Por lo tanto, la hidrólisis con HCl 0,5 N a 70 °C durante 2 horas se elige para la producción de oligómeros de azúcares neutros. En cambio, la hidrólisis con TFA 2 N durante 2 horas se usa como un método para la cuantificación de la composición de los oligómeros neutros. Una hidrólisis bajo condiciones drásticas (ácido trifluoroacético 2 N a 120 °C durante 2 horas) es suficiente para obtener los monómeros de todos los azúcares y que, por lo tanto, permita, para el fin de este estudio, el análisis cuantitativo de la composición de los polisacáridos y oligosacáridos neutros.

Tabla 33. Análisis de la fracción inferior a 3000 Da resultante de la hidrólisis química de las cadenas de azúcares neutros de la fracción F_{0-80} % con HCl 0,5 N a 70 °C durante diferentes tiempos. Los resultados están expresados en porcentaje con respecto al contenido inicial cuantificado en el liofilizado (que incluye la fracción inferior y superior a 3000 Da) mediante una hidrólisis en condiciones drásticas con TFA 2 N a 120 °C durante 2 horas.

HCl 0,5 N 70 °C		Porcentaje de azúcares neutros (%)					
		½ h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h
Glc	Libre ^a	nd	nd	nd	nd	nd	65
	Enlazada ^b	29	38	57	63	70^c	8
Gal	Libre	nd	nd	nd	62	72	73
	Enlazada	23	27	45	nd	5	9
Xil	Libre	nd	nd	nd	nd	nd	77
	Enlazada	nd	58	40	21	8	nd
Ara	Libre	12	48	98	99	99	99
	Enlazada	46	24	nd	nd	nd	nd
Ram	Libre	nd	nd	nd	nd	37	43
	Enlazada	nd	nd	27	32	nd	nd

^a Monómeros medidos directamente por HPLC como derivados ABEE.

^b Oligómeros de peso molecular inferior a 3000 Da. Se calculan por diferencia entre la concentración de monosacáridos antes y después de una hidrólisis con TFA 2 N a 120 °C durante 2 horas.

^c Porcentajes máximos de liberación (en negrita).

nd, no detectado.

Tabla 34. Análisis de la fracción inferior a 3000 Da resultante de la hidrólisis química de las cadenas de azúcares neutros de la fracción F_{0-80} % con TFA 2 N a diferentes temperaturas durante 2 horas. Los resultados están expresados en porcentaje con respecto al contenido inicial cuantificado en el liofilizado (que incluye la fracción inferior y superior a 3000 Da) mediante una hidrólisis en condiciones drásticas con TFA 2 N a 120 °C durante 2 horas.

TFA 2 N 2 h		Porcentaje de azúcares neutros (%)			
		70 °C	90 °C	100 °C	110 °C
Glc	Libre ^a	20	85	73	86
	Enlazada ^b	31	34^c	nd	nd
Gal	Libre	12	62	98	100
	Enlazada	40	27	nd	nd
Xil	Libre	nd	61	80	71
	Enlazada	63	10	nd	nd
Ara	Libre	77	73	99	100
	Enlazada	nd	15	nd	nd
Ram	Libre	12	42	62	90
	Enlazada	27	21	16	nd

^a Monómeros medidos directamente por HPLC como derivados ABEE.

^b Oligómeros de peso molecular inferior a 3000 Da. Se calculan por diferencia entre la concentración de monosacáridos antes y después de una hidrólisis con TFA 2 N a 120 °C durante 2 horas.

^c Porcentajes máximos de liberación (en negrita).

nd, no detectado

Las hidrólisis ácidas con HCl (0,5 N a 70 °C y tiempos de 0,5-8 horas) y TFA (2 N durante 2 horas a temperaturas de 70-110 °C) son insuficientes, como se ha visto anteriormente, para hidrolizar eficientemente los polisacáridos pécticos y conllevan una baja obtención de oligómeros de ácido galacturónico. La hidrólisis química más suave con ácido diluido HCl 0,5 N no hidroliza los polisacáridos pécticos. La hidrólisis con TFA 2 N a 100 °C durante 2 horas es el tratamiento químico que proporciona el rendimiento más alto de fragmentos de ácido galacturónico de bajo peso molecular (inferior a 3000 Da), un 0,77 %. En oposición, los tratamientos enzimáticos ensayados que serán detallados en los siguientes apartados producen rendimientos más altos de oligómeros mediante una hidrólisis dirigida de los polisacáridos pécticos.

Dos tipos diferentes de hidrólisis enzimáticas se llevan a cabo para obtener la máxima despolimerización de las cadenas de los polisacáridos pécticos en forma de oligómeros. Para tratar de hacer más eficiente las hidrólisis enzimáticas, se decide saponificar (desesterificar) previamente los polisacáridos pécticos. Los hidrolizados enzimáticos se someten a ultrafiltración a través de una membrana de 3000 Da con objeto de separar aquellos oligómeros con el grado de polimerización más bajo. El porcentaje de azúcares y ácido galacturónico libres se determina directamente. El porcentaje de los oligómeros pécticos recuperados en los permeados (inferior a 3000 Da) y el restante en los concentrados (superior a 3000 Da) se calcula por diferencia entre la concentración de monosacáridos antes y después de la hidrólisis enzimática con Olivex a 40 °C durante 6 horas.

Hidrólisis enzimática con endo-poligalacturonasa para la obtención de oligosacáridos pécticos.

Se estudia la degradación enzimática con endo-poligalacturonasa de *Aspergillus niger* de Megazyme (Wicklow, Irlanda) para obtener la mayor proporción de oligosacáridos ácidos en la fracción de peso molecular inferior a 3000 Da. La endopoligalacturonasa realiza una hidrólisis al azar que rompe enlaces en el interior del polímero, en el homogalacturonano de la molécula péctica. En la [Tabla 35](#) se muestra el rendimiento que presenta la actividad de la endopoligalacturonasa en la despolimerización de la fracción péctica hasta oligómeros con y sin saponificación previa. La endo-poligalacturonasa es capaz de romper las cadenas de ácido galacturónico en forma de oligómeros. Después de una incubación prolongada (24 horas) el hidrolizado contiene muy poca cantidad de productos oligoméricos sin saponificación previa, pero el porcentaje se duplica cuando la muestra se desesterifica con anterioridad. La acción de la endopoligalacturonasa promueve una clara disminución del peso molecular de los polisacáridos pécticos mediante la liberación de oligómeros pécticos (2,36 % p/p relativo a liofilizado inicial), pero contribuye también de manera importante la formación de ácido galacturónico libre (2,70 %).

Tabla 35. Balance del proceso de ultrafiltración del hidrolizado enzimático con endopoligalacturonasa después de 24 horas de incubación a 40 °C en buffer acetato sódico 50 mM y pH 5. En rojo se resaltan los porcentajes de recuperación de oligómeros de ácido galacturónico con y sin saponificación previa.

Azúcares	Sin saponificación			Con saponificación		
	< 3000 Da		> 3000 Da	< 3000 Da		> 3000 Da
	M ^a	O ^a	O	M	O	O
GlcA	0,55 ^b ±0,04 ^c	nd	0,15±0,01	0,50±0,03	nd	0,06±0,01
GalA	0,78±0,03	0,93±0,09	10,47±0,55	2,70±0,10	2,36±0,13	9,63±0,11
Glc	0,13±0,01	0,42±0,04	0,64±0,03	0,20±0,02	nd	0,09±0,01
Gal	nd	0,70±0,15	5,96±0,10	0,41±0,02	0,76±0,04	4,73±0,33
Xil	nd	1,05±0,06	1,29±0,04	nd	0,58±0,03	0,60±0,01
Ara	nd	nd	0,17±0,01	nd	nd	nd
Fuc	0,72±0,06	nd	0,37±0,02	nd	0,67±0,06	0,24±0,02
Ram	nd	nd	1,98±0,17	nd	0,10±0,01	2,52±0,06

^a M: monómeros; O: oligómeros.

^b El contenido de azúcares (% p/p) se determina mediante una hidrólisis con Olivex en buffer acetato sódico 50 mM a pH 5 y 40 °C durante 6 horas.

^c Desviaciones estándar (n = 3).

nd, no detectado.

Hidrólisis enzimática con pectinesterasa (PE), pectinliasa (PL) y endo y exo-poligalacturonasa (PG) para la obtención de oligosacáridos pécticos.

Las pectinas son polisacáridos de estructura compleja, cuya hidrólisis eficiente requiere de la participación de diferentes enzimas. Las mejores condiciones para la hidrólisis enzimática se obtienen utilizando una mezcla de enzimas: pectinesterasa (PE), endo y exo-poligalacturonasa (PG) y pectinliasa (PL) (Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca) durante 72 horas de tratamiento. La enzima pectinesterasa actúa sobre los polisacáridos pécticos desesterificando los grupos metoxilo y facilitando la acción de las otras pectinasas como la poligalacturonasa y la pectinliasa, que degradan las moléculas del polímero ([Rajal y col., 1999](#)). La pectinliasa rompe los enlaces α - $(1\rightarrow4)$ glicosídicos por un mecanismo de β -eliminación, formando en el galacturónido un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 en el extremo no reductor. La endo-poligalacturonasa realiza una hidrólisis aleatoria del polímero, entre unidades de ácido galacturónico adyacentes, que produce una importante disminución del peso molecular de los polisacáridos pécticos, mientras que la exo-poligalacturonasa actúa secuencialmente por el extremo no reductor ([Gámez y Díaz, 2008](#)).

El tratamiento con esta mezcla de enzimas (PE, PG y PL) de la muestra saponificada proporciona el rendimiento más alto de oligómeros de ácido galacturónico en la fracción de bajo grado de polimerización, el permeado de peso molecular inferior a 3000 Da, después de 24 de incubación ([Tabla 36](#)). Por esta razón, se prolonga la hidrólisis hasta las 72 horas. Cada 24 horas se detiene la incubación calentando a 100 °C durante 15 minutos. Se ultrafiltra el hidrolizado a través de una membrana de 3000 Da, se recupera el permeado y se analiza la producción de oligómeros de bajo grado de polimerización. La fracción de hidrolizado de corte molecular superior a 3000 Da se vuelve a incubar con la adición de una nueva solución mezcla de enzimas. En la [Tabla 36](#) se muestran los porcentajes parciales de recuperación de oligómeros de ácido galacturónico y la ventaja de saponificar previamente las pectinas (el rendimiento de recuperación aumenta del 0,70 al 6,69 %). Aunque en ambos casos se trata con pectinesterasa, la saponificación o desesterificación química con NaOH es más efectiva que la enzimática. La hidrólisis enzimática con la mezcla de enzimas produce una alta recuperación de oligómeros después de 72 horas de incubación (se obtiene un total acumulado de 13,82 %). La combinación de PE, endo y exo-PG y PL y una cantidad adicional de endo-poligalacturonasa (utilizada en el ensayo anterior) no aumenta la cantidad de oligómeros pécticos después de 24 horas de incubación (datos no mostrados). El análisis de los permeados revela cantidades bajas de azúcares neutros de las cadenas laterales lo que pone de manifiesto la especificidad de las enzimas, que actúan en la región del homogalacturonano.

Tabla 36. Balance del proceso de ultrafiltración del hidrolizado enzimático con la mezcla de enzimas PE, PG y PL después de 24, 48 y 72 horas de incubación a 40 °C en buffer acetato sódico 50 mM y pH 5. En rojo se resaltan los porcentajes parciales de recuperación de oligómeros de ácido galacturónico y en verde los porcentajes restantes de polisacáridos pécticos.

Azúcares	24 h / Sin saponificación			24 h / Con saponificación		
	< 3000 Da		> 3000 Da	< 3000 Da		> 3000 Da
	M ^a	O ^a	O	M	O	O
GlcA	0,31 ^b ±0,02 ^c	nd	nd	1,49±0,01	nd	nd
GalA	0,46±0,05	0,70±0,07	12,91±1,01	1,17±0,01	6,69±0,66	11,06±0,46
Glc	0,34±0,03	0,39±0,03	0,71±0,03	0,51±0,03	0,14±0,04	0,31±0,02
Gal	nd	0,80±0,05	5,80±0,33	nd	1,68±0,09	4,86±0,06
Xil	0,14±0,01	0,71±0,02	1,55±0,12	nd	0,90±0,02	1,30±0,05
Ara	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fuc	nd	0,23±0,01	0,10±0,01	nd	0,73±0,01	0,64±0,03
Ram	nd	0,26±0,02	2,27±0,18	nd	0,12±0,02	2,23±0,15
Azúcares	48 h / Con saponificación			72 h / Con saponificación		
	< 3000 Da		> 3000 Da	< 3000 Da		> 3000 Da
	M	O	O	M	O	O
GlcA	0,49±0,04	nd	nd	nd	nd	nd
GalA	1,13±0,03	4,80±0,35	5,61±0,55	0,85±0,01	2,33±0,19	2,57±0,04
Glc	nd	0,24±0,02	0,13±0,01	nd	0,17±0,02	0,17±0,01
Gal	nd	1,58±0,10	2,46±0,22	nd	0,81±0,01	1,56±0,06
Xil	nd	0,95±0,05	0,88±0,07	nd	0,75±0,05	0,85±0,08
Ara	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fuc	nd	0,70±0,04	0,70±0,02	nd	0,82±0,07	0,81±0,05
Ram	0,42±0,01	nd	1,32±0,18	nd	0,35±0,03	0,53±0,03

^a M: monómeros; O: oligómeros.

^b El contenido de azúcares (% p/p) se determina mediante una hidrólisis con Olivex en buffer acetato sódico 50 mM a pH 5 y 40 °C durante 6 horas.

^c Desviaciones estándar (n = 3).

nd, no detectado.

Obtención de oligosacáridos ácidos y neutros

Una vez que se han definido unas condiciones de hidrólisis óptimas para obtener oligómeros de azúcares neutros y ácidos se sigue el procedimiento que se representa esquemáticamente en la [Figura 24](#) (apartado [4.7.2](#)) para la obtención y purificación de oligosacáridos de bajo grado de polimerización. Para ello 10 g de liofilizado de la fase acuosa se calientan con 200 mL de HCl 0,5 N a 70 °C durante 2 horas. A continuación se realiza una ultrafiltración en una membrana de 3000 Da. A partir del permeado obtenido (inferior a 3000 Da), se procede a la purificación, aislamiento y caracterización de los oligosacáridos neutros obtenidos. En la [Tabla 37](#) se muestra la composición de los mismos determinada por cromatografía de gases. La fracción del hidrolizado con HCl 0,5 N a 70 °C durante 2 horas, después de la ultrafiltración, de peso molecular superior a 3000 Da (retenido) se utiliza para la obtención de oligosacáridos ácidos. Esta fracción representa el 10 % del liofilizado de la fase acuosa obtenida del tratamiento térmico. En la [Tabla 38](#) se muestra su composición de azúcares neutros y ácidos urónicos. El análisis muestra la presencia principalmente de polímeros pécticos. Las pectinas son mezclas complejas de polisacáridos. El componente principal consiste en unidades de α -D-galacturónico (en este caso representa el 12,44 % p/p del hidrolizado) unidas por enlaces glicosídicos α -(1→4). En esta cadena principal, unidades de β -L-ramnosa se insertan ocasionalmente a través de enlaces glicosídicos (1→4) y (2→1) y los grupos carboxilos están parcialmente esterificados con grupos metilo. Otros azúcares neutros tales como arabinosa, galactosa, glucosa, xilosa y manosa pueden estar enlazados como cadenas laterales ([Vierhuis y col., 2003](#); [Cardoso y col., 2003](#)).

Tabla 37. Composición de azúcares neutros de la fracción de hidrolizado (con HCl 0,5 N a 70 °C durante 2 horas) de peso molecular inferior a 3000 Da. Los valores están expresados en g/100 g de permeado liofilizado (% p/p).

Azúcares	Monómeros^a	Oligómeros^b
Ramnosa	0,06 ± 0,01 ^c	0,14 ± 0,01
Fucosa	nd	nd
Arabinosa	0,69 ± 0,05	0,60 ± 0,05
Xilosa	0,05 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Manosa	5,17 ± 0,44	3,51 ± 0,34
Galactosa	0,15 ± 0,01	0,23 ± 0,02
Glucosa	10,52 ± 1,03	8,00 ± 0,78

^a Medidos directamente por cromatografía de gases como acetatos de alditol.

^b De peso molecular inferior a 3000 Da. Se calculan por diferencia entre la concentración de monosacáridos antes y después de una hidrólisis con TFA 2 N a 120 °C durante 2 horas.

^c Desviaciones estándar (n = 3).

nd, no detectado.

Tabla 38. Determinación de la composición de azúcares de los polisacáridos de la fracción de hidrolizado (con HCl 0,5 N a 70 °C durante 2 horas) de la fase acuosa de peso molecular superior a 3000 Da antes de los tratamientos enzimáticos. Los valores están expresados en g/100 g de hidrolizado liofilizado.

Azúcares	Porcentaje de polisacáridos (%) ^a
Glucurónico ^b	0,20 ± 0,02 ^d
Galacturónico ^b	12,44 ± 1,22
Glucosa ^c	0,66 ± 0,05
Galactosa ^c	6,24 ± 0,55
Xilosa ^c	0,61 ± 0,05
Arabinosa ^c	0,10 ± 0,01
Fucosa ^c	0,20 ± 0,02
Ramnosa ^c	1,98 ± 0,19

^a El contenido de azúcares (% p/p) se determina mediante una hidrólisis con Olivex en buffer acetato sódico a pH 5 y 40 °C durante 6 horas.

^b Los ácidos urónicos se cuantifican por HPLC como derivados ABEE.

^c Los azúcares neutros se determinan por cromatografía de gases como acetatos de alditol.

^d Desviaciones estándar (n = 3).

5.5.2.- Aislamiento y purificación de los oligosacáridos pépticos.

Purificación de los oligosacáridos pépticos mediante cromatografía de adsorción

Después de las hidrólisis enzimáticas (24, 48 y 72 horas de incubación), los permeados (fracciones de peso molecular inferior a 3000 Da) obtenidos de la ultrafiltración se reúnen y la mezcla se pasa a través de una columna de 2 cm de diámetro rellena con 50 mL de resina Amberlite XAD16, previamente lavada con etanol al 95 % y después con agua. Para el análisis de las respectivas fracciones eluidas de la columna se usa el método del fenilfenol o *m*-hidroxibifenilo para determinar el contenido total de ácidos urónicos. Todos los oligosacáridos pépticos se retienen en la columna; el efluente de la muestra que se pasa a través de la resina se analiza colorimétricamente (ensayo negativo). La resina se lava con cuatro porciones de 50 mL de agua destilada que permite la elución completa de los oligosacáridos pépticos. Se reúnen las fracciones que colorimétricamente dan positivo según este método. La solución final se denomina fracción A (ver esquema del proceso de obtención de oligosacáridos de la [Figura 24](#)).

Distribución de pesos moleculares de los oligosacáridos pépticos por cromatografía aniónica de alta eficacia

Para evaluar la distribución de grados de polimerización de los oligosacáridos obtenidos después de la hidrólisis enzimática con PE, PG y PL, la fracción A se analiza en el sistema Dionex. El perfil cromatográfico de los oligosacáridos obtenidos proporciona cuatro picos, indicando que cada uno corresponde a una estructura de oligosacárido diferente ([Figura 58](#)). Los picos 1 y 3 con tiempos de retención de 9,87 y 18,75 minutos respectivamente, se identifican como los ácidos mono- y trigalacturónico por comparación con los estándares comerciales disponibles (con tiempos de retención de 9,85 y 18,78 minutos, respectivamente). Los picos 2 y 4 con tiempos de retención de 14,67 y 21,72 minutos, respectivamente, podrían ser asignados a los ácidos di- y tetragalacturónico por su posición con respecto a los picos 1 y 3.

Aislamiento de los oligosacáridos pépticos

Después de la purificación de los oligosacáridos pépticos usando una columna de resina Amberlite XAD16 la fracción A obtenida se somete a una separación semipreparativa en dos columnas cromatográficas de exclusión molecular Superdex Peptide HR 10/30 conectadas en serie. La [Figura 59](#) muestra los perfiles de elución de los cromatogramas de índice de refracción del hidrolizado químico (de peso molecular superior a 3000 Da) antes del tratamiento enzimático, de los oligosacáridos obtenidos enzimáticamente y de los picos de los compuestos de referencia, los ácidos tri- y monogalacturónico, analizados bajo las mismas condiciones. Se pueden observar los importantes cambios en los perfiles por el efecto de la despolimerización; la fracción péptica de alto grado de polimerización y tiempo de retención más bajo se desplaza hacia un aumento de los

oligosacáridos con un bajo grado de polimerización y tiempos de retención mayores. Los picos 1, 2 y 3 contienen oligómeros que van de 4 a 2 unidades (aproximadamente 190-730 Da) y se recogen separadamente dentro de los siguientes intervalos de tiempo: (1) 58,2-60,6; (2) 60,8-64 y (3) 64,2-67,6 minutos. Las inyecciones de 100 μ L se realizan cuatro veces y los oligosacáridos de las 4 independientes separaciones se colectan para su concentración y posterior identificación y caracterización mediante HPLC-ESI-MS/MS. El pico (4) de más bajo peso molecular contiene el monómero de ácido galacturónico (67,6-71 minutos) y no se recoge.

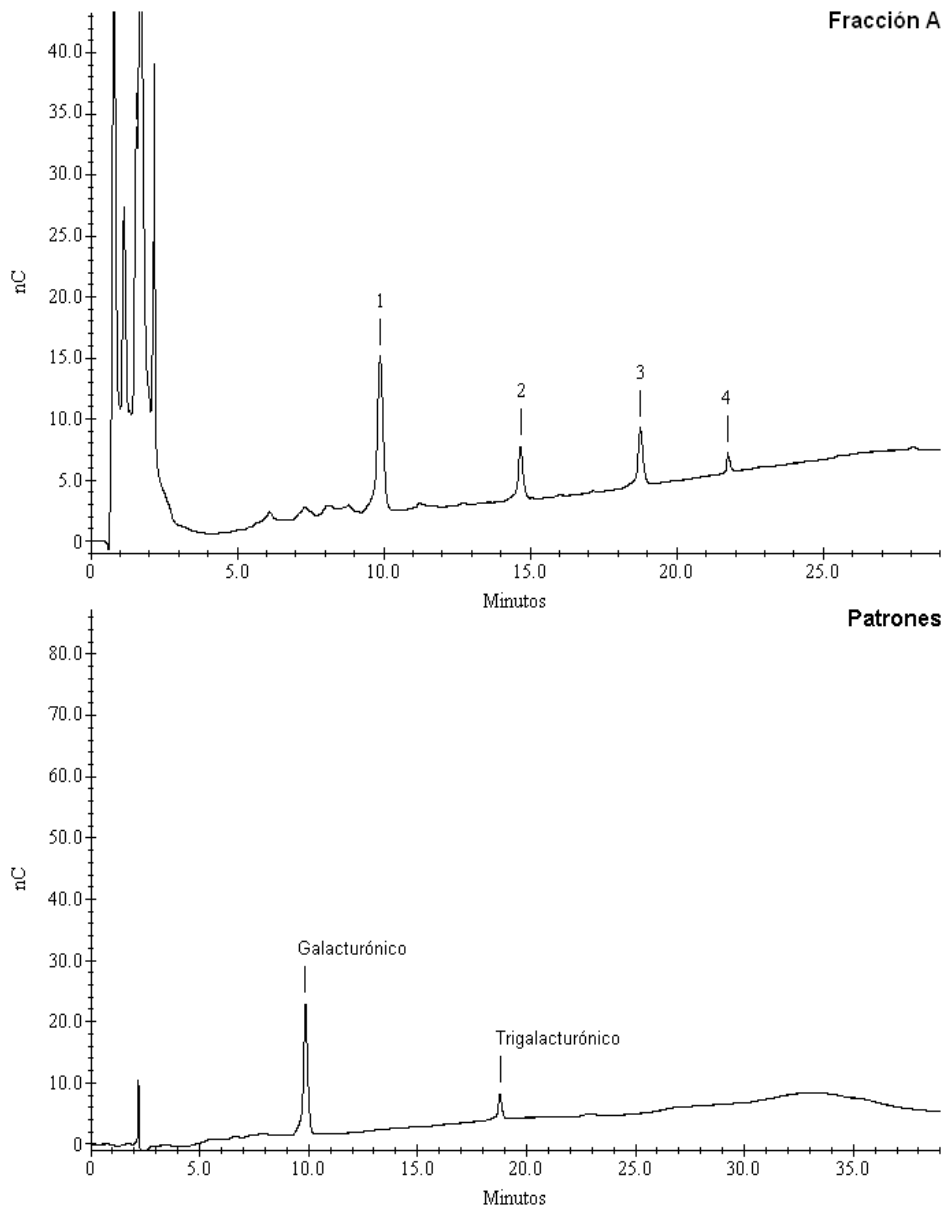


Figura 58. Perfiles cromatográficos HPAEC-PAD de la fracción A de oligosacáridos péclicos purificados (picos 1, 2, 3 y 4 de tiempos de retención 9,87, 14,67, 18,75 y 21,72 minutos, respectivamente) (arriba) y de una solución estándar que contiene los ácidos tri- y monogalacturónico (con tiempos de retención de 9,85 y 18,78 minutos, respectivamente) (abajo).

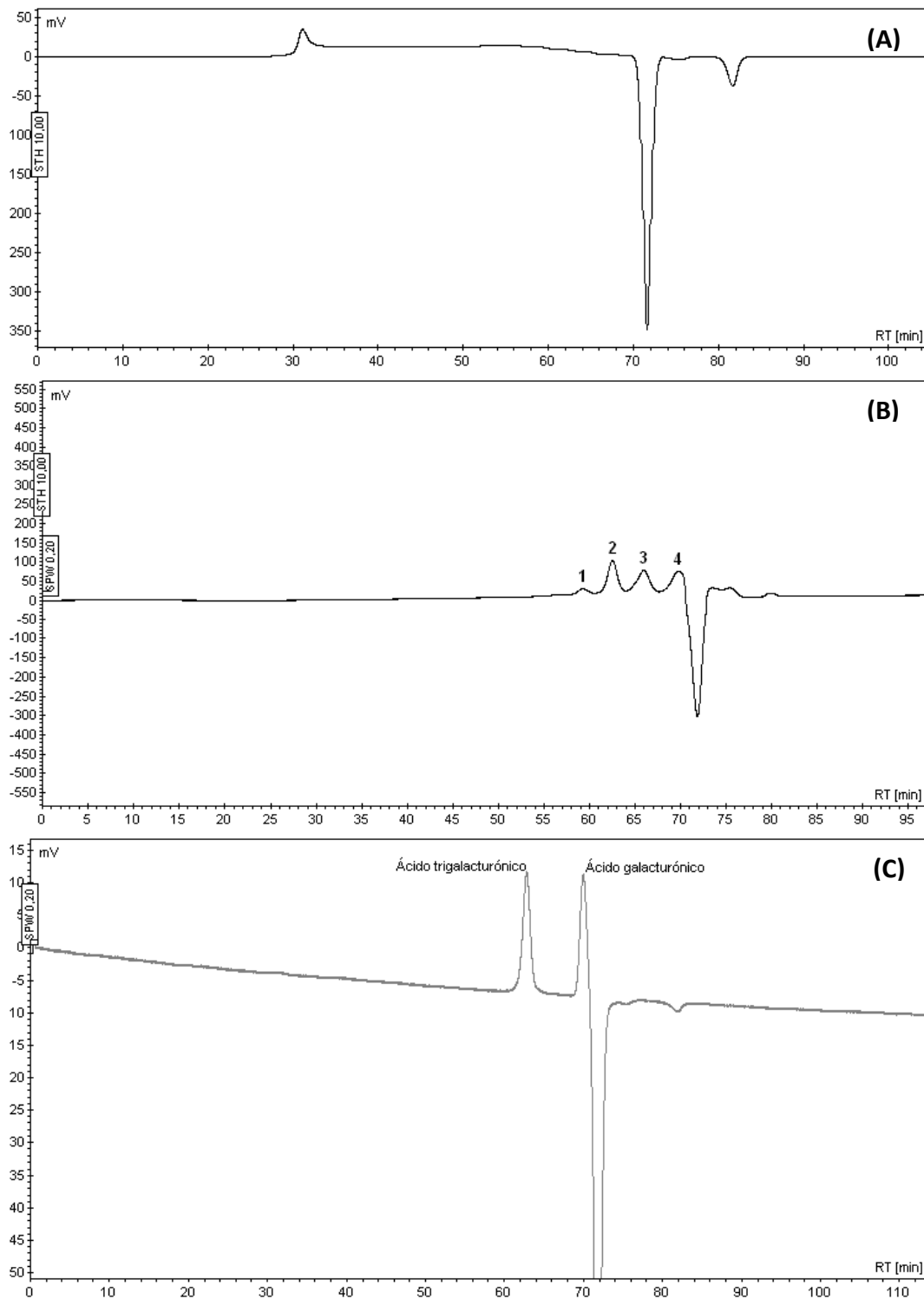


Figura 59. Perfiles de elución de índice de refracción mediante cromatografía de exclusión molecular usando Superdex Peptide de la fracción péctica del hidrolizado químico de corte molecular superior a 3000 Da antes del tratamiento enzimático (A), de la fracción A de oligosacáridos pécticos obtenidos enzimáticamente y purificados (B) y de una solución estándar que contiene los ácidos tri- y monogalacturónico (C).

5.5.3.- Caracterización estructural de los oligosacáridos pépticos mediante HPLC-ESI-MS/MS.

Después del paso de separación usando la cromatografía de filtración en gel, los oligosacáridos pépticos aislados a partir de la fracción A se analizan para determinar sus estructuras. Para caracterizarlos se llevan a cabo experimentos de espectrometría de masas usando la técnica HPLC-ESI-MS/MS.

Los espectros de masas adquiridos en modo ion negativo de las fracciones aisladas revelan que los oligosacáridos presentes corresponden a los dímeros, trímeros y tetrámeros de ácido galacturónico (picos 1, 2, y 3, respectivamente, de los perfiles de elución de los cromatogramas de índice de refracción obtenidos mediante cromatografía de filtración en gel) de relación masa-carga m/z 370, 546 y 722, respectivamente. En todos los espectros, destaca la presencia de los iones moleculares desprotonados $[M-H]^-$.

Para establecer el patrón de fragmentación se llevan a cabo experimentos MS/MS sobre los iones cuasi-moleculares $[M-H]^-$ de relación masa-carga (m/z) 369, 545 y 721 que confirman estas estructuras. Los espectros que se obtienen se muestran en la [Figura 60](#). Algunos autores han descrito que la secuencia y patrones de ramificación de los oligosacáridos pueden ser obtenidos usando ESI MS/MS en modo negativo ([Chai y col., 2002](#); [Vakhrushev y col., 2004](#)). La principal ventaja de los espectros de fragmentación MS/MS en modo negativo es producir una serie de iones característicos resultantes de la rotura de enlaces glicosídicos que proporcionan información sobre el tipo de enlace y que, en este caso, revela la existencia de la cadena lineal de unidades de ácido galacturónico.

Según la nomenclatura de [Domon y Costello, 1988](#), cuatro diferentes series de iones surgen a partir de la rotura del enlace glicosídico, dos de las cuales contienen el extremo reductor (series Y_i y Z_i), y dos el extremo no reductor (series B_i y C_i) ([Figura 61A](#)). La fragmentación “cruzada” del anillo se denota por A y X ([Figura 62B](#)). La fragmentación de los iones cuasi-moleculares $[M-H]^-$ está dominada por los iones de estas series (m/z 175, 193, 351, 369, 527 y 545). Los espectros también revelan la presencia de iones específicos de rotura del anillo ($^{0,2}A$) de relación m/z 661, 485, 467, 309, 291 correspondientes a la pérdida de fragmentos de 60 Da, probablemente por pérdida de $C_2H_4O_2$ ([Harvey, 2000](#)), que junto con la ausencia de los iones fragmentos de masa 30 (CH_2O) y 90 ($C_3H_6O_3$), es indicativa de enlaces glicosídicos tipo 1,4 ([Ralet y col., 2009](#)). Los iones $^{0,2}A$ de rotura cruzada del anillo experimentan pérdida de agua para producir iones fragmentos $^{0,2}A - 18$ (por ejemplo m/z 273). El mecanismo de formación de estos iones ha sido propuesto por [Mulrone y col., 1999](#).

Los iones específicos de rotura del anillo ($^{0,2}X$) de m/z 411, 235 son resultantes de una pérdida de 134 Da a partir de los iones cuasi-moleculares $[M-H]^-$. Los oligosacáridos

caracterizados no están metilados pues no se observa una pérdida de metanol de 32 Da que [Quéméner y col., 2003](#) correlacionan con la presencia de grupos ésteres metílicos sobre la unidad de ácido galacturónico en el extremo reductor.

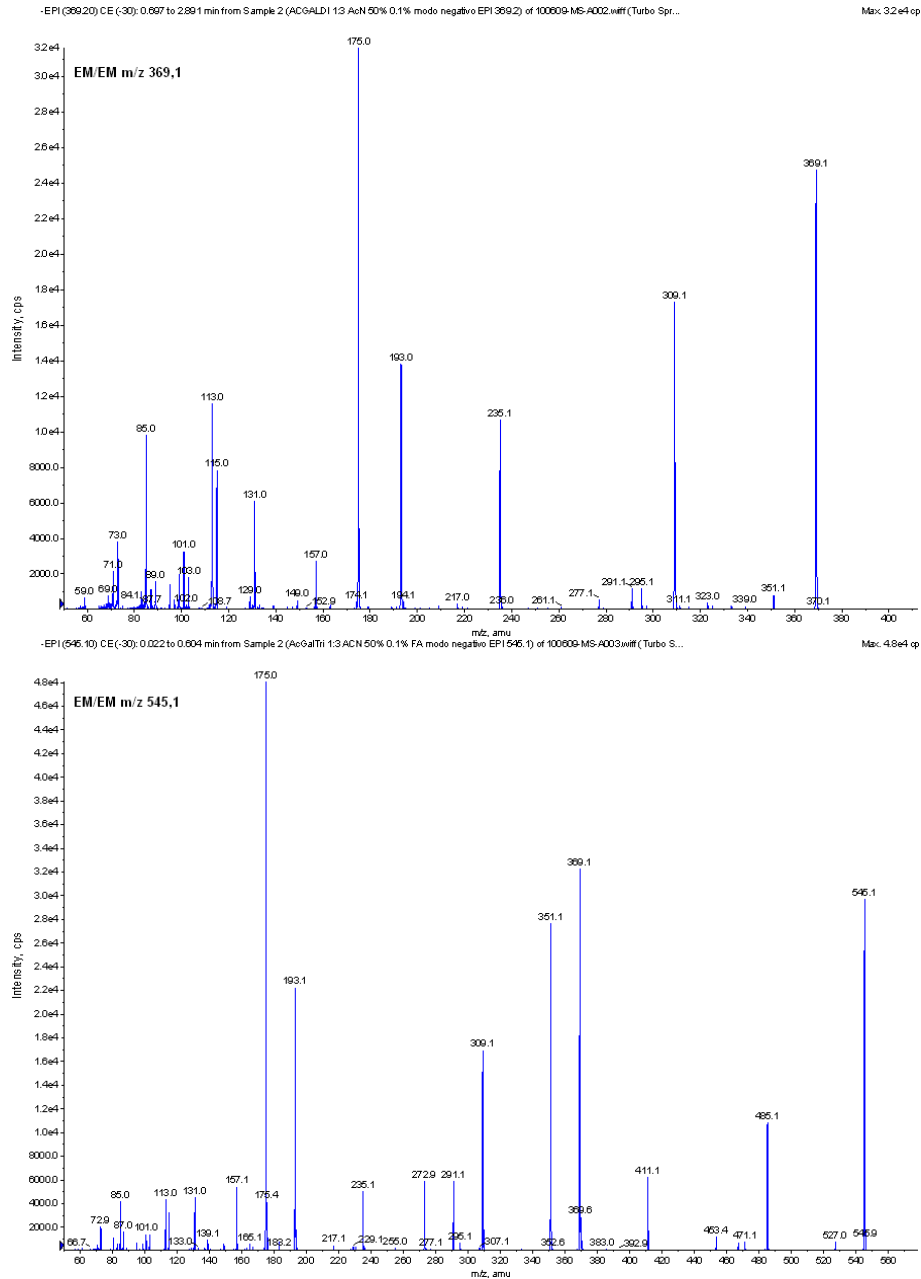


Figura 60. Espectros MS/MS adquiridos en modo negativo de los iones cuasi-moleculares $[M-H]$ de los ácido di- y trigalacturónico de la fracción purificada A.

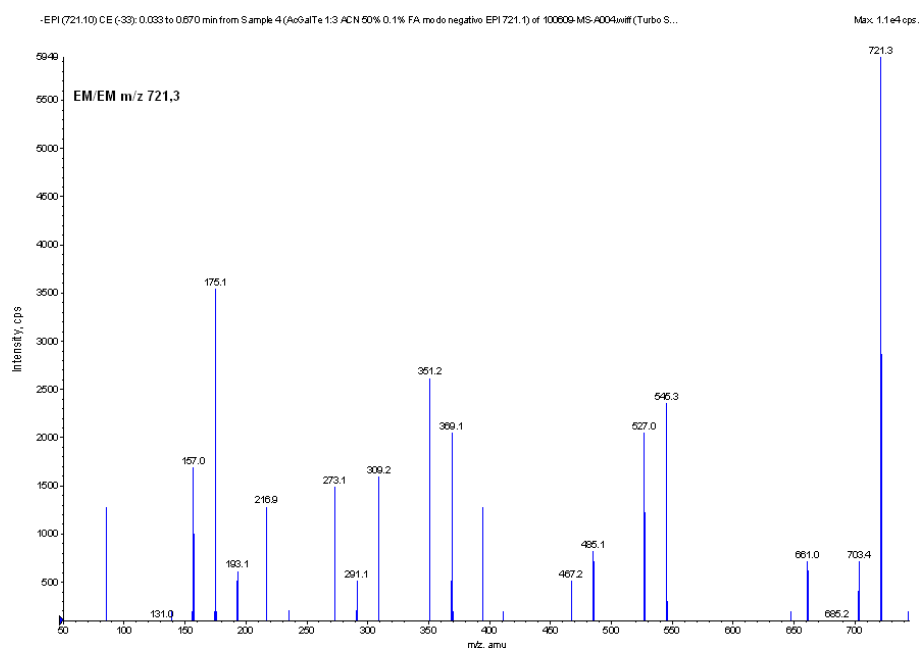


Figura 60. (Continuación) Espectro MS/MS adquirido en modo negativo del ion cuasi-molecular $[M-H]$ del ácido tetragalacturónico de la fracción purificada A.

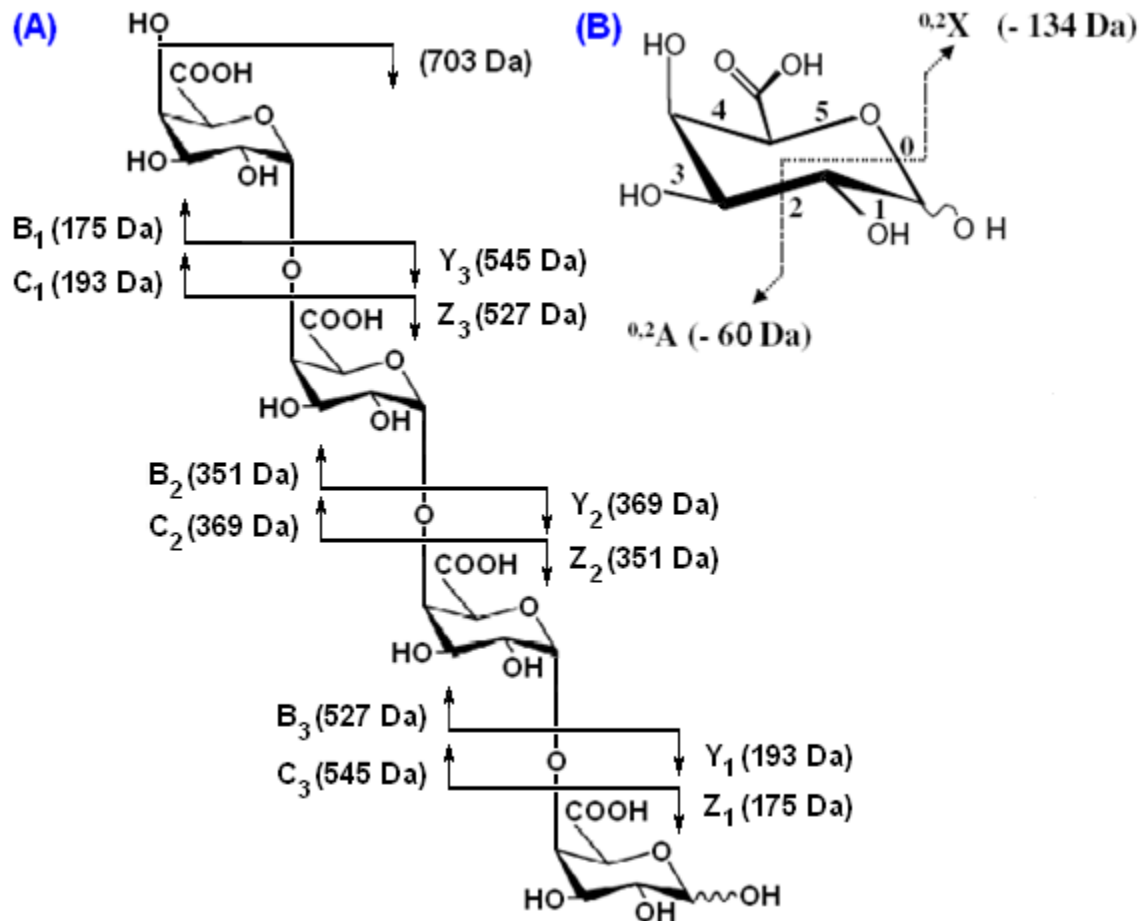


Figura 61. Esquema de fragmentación para los oligómeros de ácido galacturónico (dímero, trímero y tetramero). (A) Roturas de los enlaces glicosídicos. Los fragmentos B_i y C_i contienen el extremo no reductor. El subíndice “i” determina el número de enlaces glicosídicos a partir del extremo no reductor. (B) Roturas del anillo. La fragmentación cruzada del anillo se denota por A_i (contiene el extremo no reductor) y X_j (contiene el extremo reductor). La posición exacta de la rotura del anillo está descrita por el superíndice en el lado izquierdo. (Adaptado de [Ralet y col., 2009](#)).

5.5.4.- Aislamiento y purificación de los oligosacáridos neutros.

Los resultados de la [Tabla 37](#) muestran que los oligosacáridos del hidrolizado de peso molecular inferior a 3000 Da están acompañados de una gran cantidad de azúcares libres principalmente manosa (5,17 %) y glucosa (10,52 %), junto con niveles más bajos de otros monosacáridos neutros. El primer paso para purificar los oligosacáridos obtenidos es la separación de los monosacáridos. El hidrolizado (permeado por debajo de 3000 Da), recuperado de la ultrafiltración, que contiene los oligosacáridos de azúcares neutros se purifica usando dos pasos de separación, que incluyen precipitación con etanol y cromatografía de adsorción. En cada fracción separada, se analiza la presencia de oligosacáridos.

Precipitación con etanol

La solubilidad en alcohol de los carbohidratos es dependiente del grado de polimerización. Los monosacáridos pueden ser solubles en soluciones acuosas de etanol al 80 % y superior. Por lo tanto, en teoría, la separación de los oligosacáridos, de los monosacáridos, puede ser posible. Los oligosacáridos neutros se separan mediante precipitación paso a paso con concentraciones de etanol al 80 y 90 % v/v, dando dos precipitados (P80 y P90) y una solución sobrenadante o fracción F80+90. La [Tabla 39](#) muestra el porcentaje de los azúcares, monosacáridos y oligómeros, recuperados en las tres fracciones. La cantidad de azúcares se mide por cromatografía de gases. La concentración de azúcares libres se determina directamente como acetatos de alditol. La cantidad de oligómeros en las soluciones se calcula por diferencia entre la concentración de monosacáridos antes y después de una hidrólisis con TFA 2 N a 120 °C y 2 horas. La fracción soluble (F80+90) contiene el 94,8 % de los monosacáridos totales, pero a la vez el 91,9 % de los oligómeros. Según estos resultados la presencia de bajas cantidades de oligómeros en los precipitados alcohólicos recuperados indica que la precipitación con etanol al 80 y 90 % no proporciona una adecuada separación. Se recurre entonces a la cromatografía de adsorción como posible alternativa a la precipitación con etanol para la separación de los oligómeros.

Tabla 39. Distribución en tanto por ciento de los azúcares neutros (en forma de monómeros y oligómeros) que constituyen el total de las distintas fracciones obtenidas por precipitación con etanol.

Azúcares (%)	P80		P90		F80+90	
	M ^a	O ^a	M	O	M	O
Ramnosa	0,01	0,1	nd	0,1	0,4	2,1
Fucosa	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Arabinosa	0,2	0,4	0,1	0,1	4,0	9,6
Xilosa	0,01	0,4	nd	0,3	0,3	1,5
Galactosa	1,2	1,5	0,4	0,6	0,8	0,9
Manosa	0,04	0,6	0,02	0,3	29,6	30,5
Glucosa	2,2	2,3	1,0	1,4	59,7	47,2
Total	3,7	5,3	1,5	2,8	94,8	91,9
	4,2		1,9		93,9	

^a M: monosacáridos; O: oligómeros.

nd, no detectado.

Cromatografía de adsorción

El permeado de peso molecular inferior a 3000 Da liofilizado se redisuelve en 100 mL de agua y la solución se carga sobre una columna de vidrio (40 de altura x 3 cm de diámetro interno) rellena con resina Amberlite XAD16 (previamente lavada con etanol al 95 % y después con agua). La elución se realiza sucesivamente con agua y metanol al 20 % (v/v). El contenido total de azúcares neutros se determina colorimétricamente por el método de la antrona para hacer un seguimiento de las fracciones eluidas. La composición de monosacáridos y oligosacáridos en cada fracción de la purificación por cromatografía de adsorción se determina mediante cromatografía de gases. Las cantidades de azúcares en cada fracción se recogen en la [Tabla 40](#). Inicialmente, todos los oligosacáridos son prácticamente retenidos en la columna (fracción F1 o licor pasado por la columna). A continuación, la aplicación de agua destilada permite la elución de casi todos los monosacáridos. La fracción F2 contiene la mayoría de los azúcares neutros en forma de monosacáridos (92,28 %), principalmente manosa (o posiblemente manitol, muy abundante en aceituna) y glucosa, y de una parte de los oligosacáridos (20,15 % en la fracción F3). El resto de los oligosacáridos (74,25 %), la mayor parte, más fuertemente adsorbidos por la resina se eluyen en la fracción F4 usando una solución acuosa de metanol al 20 %.

Tabla 40. Composición de azúcares neutros libres y de los oligómeros (en tanto por ciento de la cantidad total eluida) de las fracciones purificadas sobre Amberlite XAD16 eluidas con agua (F2 y F3) y con metanol/agua al 20 % (F4).

Azúcares	F1		F2		F3		F4	
	M ^a	O ^a	M	O	M	O	M	O
Ramnosa	nd	0,16	0,28	2,34	0,05	1,30	nd	1,21
Fucosa	nd	nd	0,04	nd	nd	0,07	nd	0,02
Arabinosa	0,15	nd	4,75	nd	0,48	4,25	nd	2,37
Xilosa	0,01	0,09	0,33	1,49	0,03	2,33	nd	4,59
Manosa	1,39	nd	33,81	nd	1,29	1,15	0,21	7,56
Galactosa	0,02	0,10	0,61	1,43	0,04	1,86	nd	2,28
Glucosa	2,30	nd	52,10	nd	1,83	9,18	0,25	56,21
Total^b	3,88	0,35	92,28	5,26	3,37	20,15	0,47	74,25

^a M: monosacáridos; O: oligómeros.

^b Porcentajes de la cantidad total eluida de monosacáridos y oligosacáridos de Amberlite XAD16, determinados mediante cromatografía gaseosa como acetatos de alditol.

nd, no detectado.

Ultrafiltración

Las fracciones F3 y F4 eluidas con agua y metanol respectivamente de la columna Amberlite XAD16, más ricas en oligómeros (éstas representan aproximadamente el 95 % de los oligosacáridos totales eluidos), se someten a ultrafiltración a través de una membrana de 1000 Da con objeto de separar aquellos oligómeros con el grado de polimerización que nos interesa (oligosacáridos de 2 a 10 unidades). La hidrólisis parcial con HCl da un hidrolizado que estará constituido por oligómeros de muy variado peso molecular (inicialmente se fraccionó por una membrana de corte de 3000 Da) (*Figura 24* apartado 4.7.2). La ultrafiltración proporciona cuatro fracciones, dos por encima (concentrados) de 1000 Da y, por lo tanto, entre 1000 y 3000 Da, y dos por debajo (permeados) de 1000 Da. Las fracciones son entonces liofilizadas para los análisis posteriores. La *Tabla 41* muestra la composición de azúcares enlazados de los permeados (fracciones C y E) y de los concentrados (fracciones B y D). El porcentaje de oligosacáridos en las fracciones B, C, D, E con respecto a peso liofilizado es 6,8, 10,5, 10,7 y 12,0 % respectivamente.

Tabla 41. Composición, determinada por cromatografía de gases como acetatos de alditol, de los oligómeros de las fracciones resultantes de la ultrafiltración. Los resultados están expresados en tanto por ciento con respecto al contenido total.

Azúcares	B ^a (1000-3000 Da)	C ^a (< 1000 Da)	D ^b (1000-3000 Da)	E ^b (< 1000 Da)
Ramnosa	3,8 ± 0,1 ^c	1,7 ± 0,2	3,6 ± 0,3	0,9 ± 0,1
Fucosa	nd	0,5 ± 0,1	nd	nd
Arabinosa	8,3 ± 0,5	13,4 ± 0,3	6,1 ± 0,5	2,0 ± 0,2
Xilosa	4,5 ± 0,2	3,5 ± 0,1	9,8 ± 0,8	3,4 ± 0,1
Manosa	17,2 ± 1,5	19,9 ± 1,4	9,9 ± 0,9	8,5 ± 0,8
Galactosa	10,7 ± 0,7	3,0 ± 0,3	6,6 ± 0,6	1,0 ± 0,1
Glucosa	55,5 ± 1,7	58,1 ± 2,7	64,0 ± 6,3	84,3 ± 8,3

^a Procedentes de la fracción 3 de elución con agua; ^b Procedentes de la fracción 4 de elución con metanol al 20 % (v/v).

^c Desviaciones estándar (n = 3).

nd, no detectado.

Distribución de pesos moleculares por cromatografía aniónica de alta eficacia

Las fracciones B, C, D y E de la ultrafiltración se analizan mediante HPAEC-PAD en un sistema Dionex para determinar la distribución aproximada de pesos moleculares o grados de polimerización (DP) de los oligosacáridos. La [Figura 62](#) muestra los perfiles de elución de los oligosacáridos patrones de la familia de la celobiosa y de la maltosa. La [Figura 63](#) muestra el perfil de elución del cromatograma de la muestra E obtenida por ultrafiltración. Se observa que los picos señalados del 1 al 8 eluyen de la columna en el mismo intervalo de tiempos de retención que los oligosacáridos de referencia. Esto sugiere que el grado de polimerización de algunos de estos oligosacáridos podría estar comprendido entre 2 y 7.

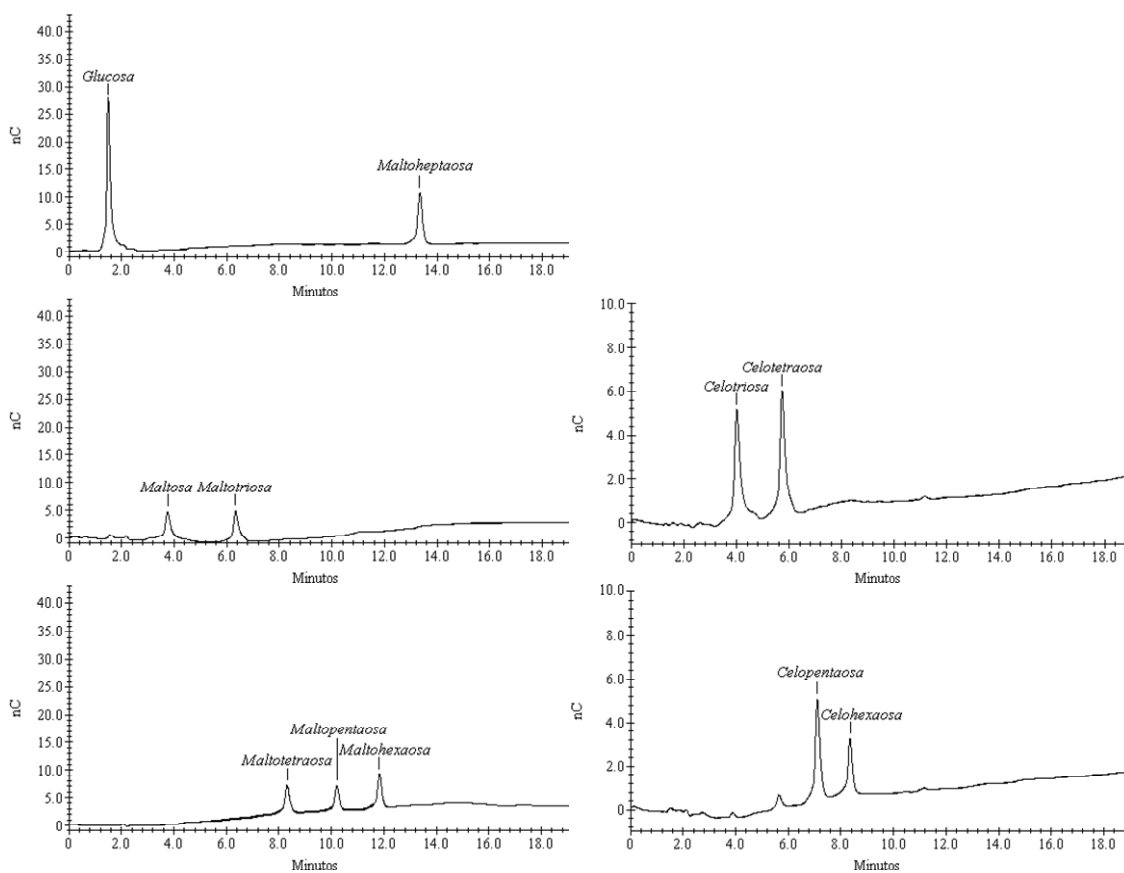


Figura 62. Perfil de elución por cromatografía aniónica de alta eficacia de la glucosa ($t_r = 1,5$ min) y de oligosacáridos de referencia de la familia de la maltosa ($t_r = 3,8$ min) (maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa y maltoheptaosa; $t_r = 6,3; 8,3; 10,2; 11,8$ y $13,4$ min, respectivamente) y la celobiosa (celotriosa, celotetraosa, celopentaosa y celohexaosa; $t_r = 4,0; 5,7; 7,1$ y $8,4$ min, respectivamente).

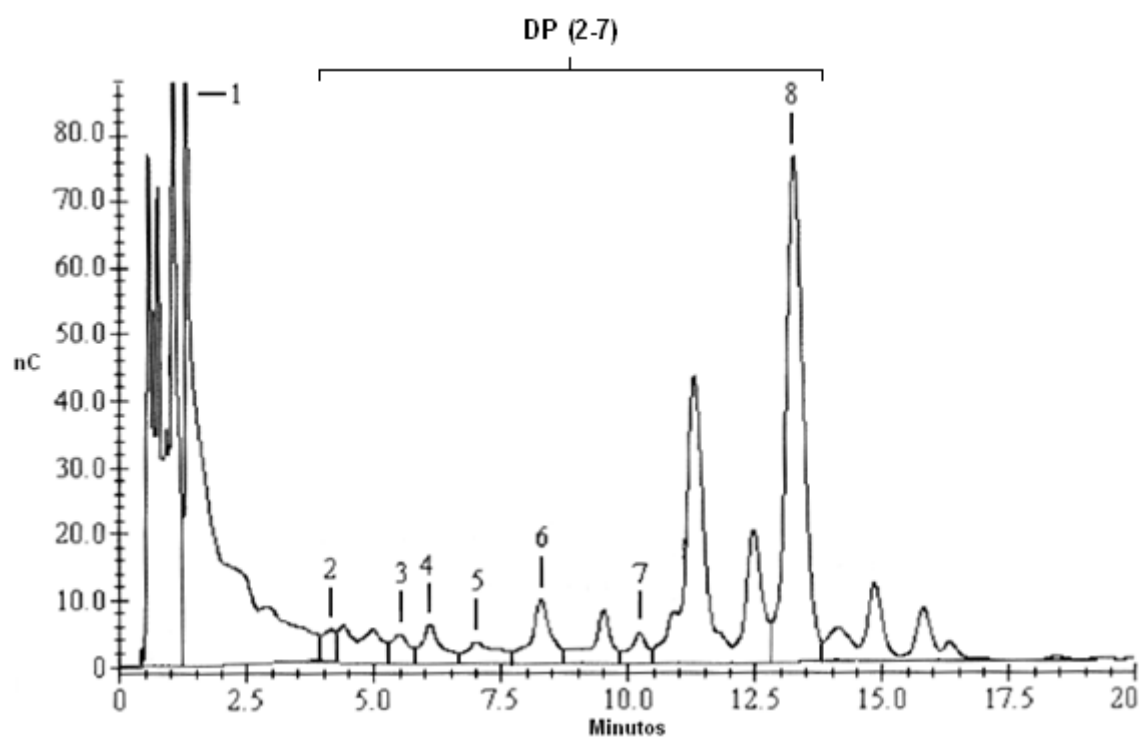


Figura 63. Cromatograma de HPAEC de la fracción E. Los tiempos de retención de los oligosacáridos de la muestra señalados (del 1 al 8) coinciden aproximadamente con los de compuestos de referencia, y son los siguientes: (1) $t_r = 1,32$; (2) $t_r = 4,15$; (3) $t_r = 5,50$; (4) $t_r = 6,08$; (5) $t_r = 7,00$; (6) $t_r = 8,28$; (7) $t_r = 10,22$ y (8) $t_r = 13,27$ minutos.

Cromatografía de filtración en gel, de exclusión molecular o por tamaño

El análisis de las fracciones B, C, D y E, obtenidas a partir de la ultrafiltración, usando HPAEC-PAD demuestra que las mismas contienen oligosacáridos. A continuación se hace una separación semipreparativa de los mismos. Alícuotas de las fracciones (100 μ L) se inyectan en un equipo de cromatografía HPLC, conectado a dos columnas en serie de filtración en gel Superdex Peptide HR 10/30 (30 x 1 cm) y con detectores de índice de refracción y ultravioleta. Las inyecciones se repiten cuatro veces y los oligosacáridos de las 4 independientes separaciones se colectan en hasta 11 fracciones que se reúnen para su concentración y posterior identificación y caracterización mediante MS y RMN. La [Figura 64](#) muestra los cromatogramas de oligosacáridos de referencia de la familia de la celobiosa. En la [Figura 65](#) se pueden ver los perfiles de elución de índice de refracción de las cuatro fracciones B, C, D y E. Se puede observar que los oligosacáridos de las fracciones se separan en el mismo intervalo de tiempos de retención que los oligosacáridos patrones de referencia. En todos los cromatogramas aparece un pico en dirección opuesta a los producidos por los componentes de las muestras. Los picos “negativos” respecto a la línea base números 6 de las fracciones B y C y 7 y 5 de las fracciones D y E, respectivamente corresponden a un fuerte cambio de polaridad debido al disolvente de las muestras, en este caso agua, con índice de refracción menor que el de los compuestos que eluyen.

Las fases estacionarias de filtración en gel o exclusión molecular son sólidos con poros de un determinado tamaño y separan las moléculas en función de éste. Así, las moléculas de analito de mayor tamaño que el del poro atraviesan más rápidamente la columna que las de menor tamaño que penetran dentro del gel. A diferencia de otras formas de cromatografía, no hay interacción atractiva entre la fase estacionaria y el soluto en el caso ideal de una exclusión molecular. Sin embargo, en este caso, hay una interacción con algunos de los solutos de las cuatro fracciones, pues como se observa aparecen picos que eluyen después del monosacárido y el disolvente. Es el caso de los picos más intensos 8 y 9 de la fracción E, que indican que la columna Superdex Peptide no se comporta como de filtración en gel puramente. Los productos que eluyen de la columna después del disolvente deben tener estructuras diferentes de los oligosacáridos.

La [Tabla 42](#) presenta el contenido de azúcares totales en cada fracción recogida, el cual se determina por el método de la antrona y después, en las que dan ensayos positivos, se analiza la composición de los oligosacáridos usando una hidrólisis ácida con TFA 2 N a 120 °C durante 2 horas para obtener la hidrólisis completa a azúcares neutros libres. A partir de los resultados de los análisis de azúcares neutros, se observa que los oligosacáridos obtenidos están formados principalmente de glucosa, aunque también son abundantes en algunas fracciones la arabinosa, la manosa y la xilosa, composición que sugiere la presencia de glucanos, xilooligosacáridos (tipo xilanos y xiloglucanos), oligosacáridos de arabinosa, de galactosa y glucomanos, todos ellos

procedentes de los polisacáridos aislados y caracterizados en la pared celular de las aceitunas ([Jiménez y col., 1994, 2001a, 2001b](#); [Coimbra y col., 1994](#)).

Se lleva a cabo también un análisis UV para obtener el espectro de cada fracción. Los datos de las señales UV muestran que las cuatro fracciones B, C, D y E tienen una fuerte absorbancia a 240 y 280 nm, lo cual está de acuerdo con la existencia de grupos fenólicos que podrían estar directamente enlazados a las cadenas de los oligómeros (los espectros UV de algunos picos revelan absorción entre 270-280 nm debido a grupos fenólicos). Por otro lado, hay un significativo número de las fracciones aisladas que tienen un máximo de absorbancia alrededor de 230-240 nm (*Figuras 66a, b, c y d*) característico de núcleos secoiridoides ([Tanahashi y col., 2009](#); [Dinda y col., 2007](#); [Silva y col., 2010](#)), que sugiere que podrían ser detectados compuestos como el ácido elenólico o derivados secoiridoides fenólicos.

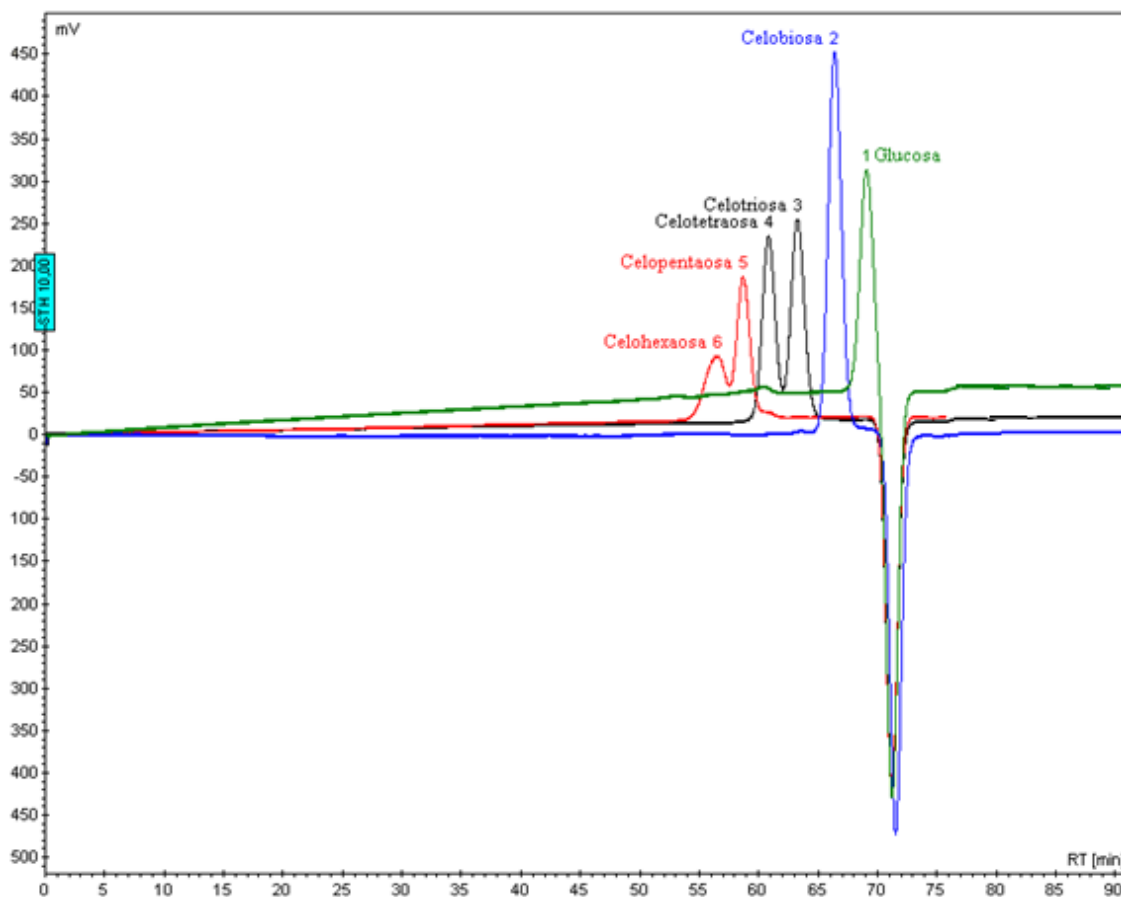


Figura 64. Perfiles de elución de índice de refracción mediante cromatografía de exclusión por tamaño de la glucosa ($t_r = 69,5$ min) y de los compuestos oligosacáridos de referencia de la serie de la celobiososa ($t_r = 66,5$ min; celotriosa, celotetraosa, celopentaosa y celohexaosa; $t_r = 63,5$; $61,1$; $59,0$ y $56,2$ min, respectivamente).

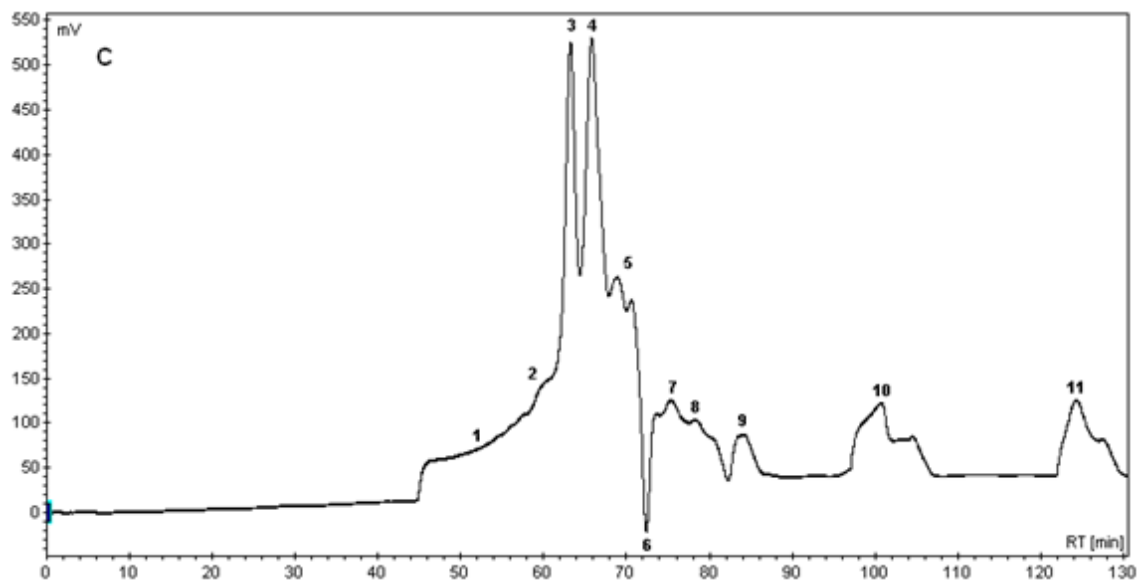
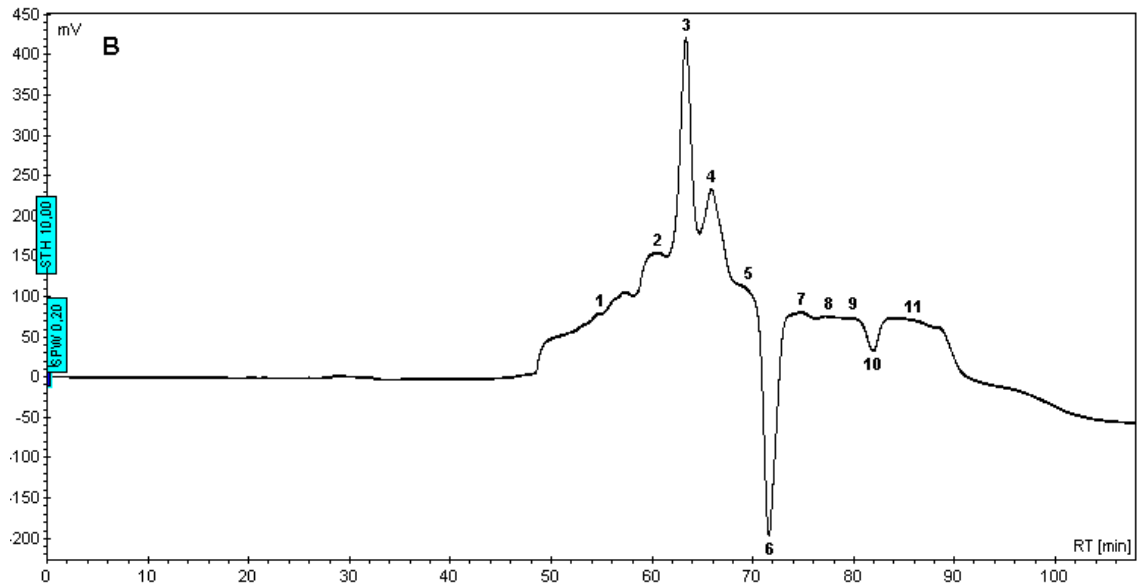


Figura 65. Perfiles de elución de índice de refracción mediante cromatografía de exclusión por tamaño de los oligosacáridos obtenidos en las fracciones B (arriba) y C (abajo).

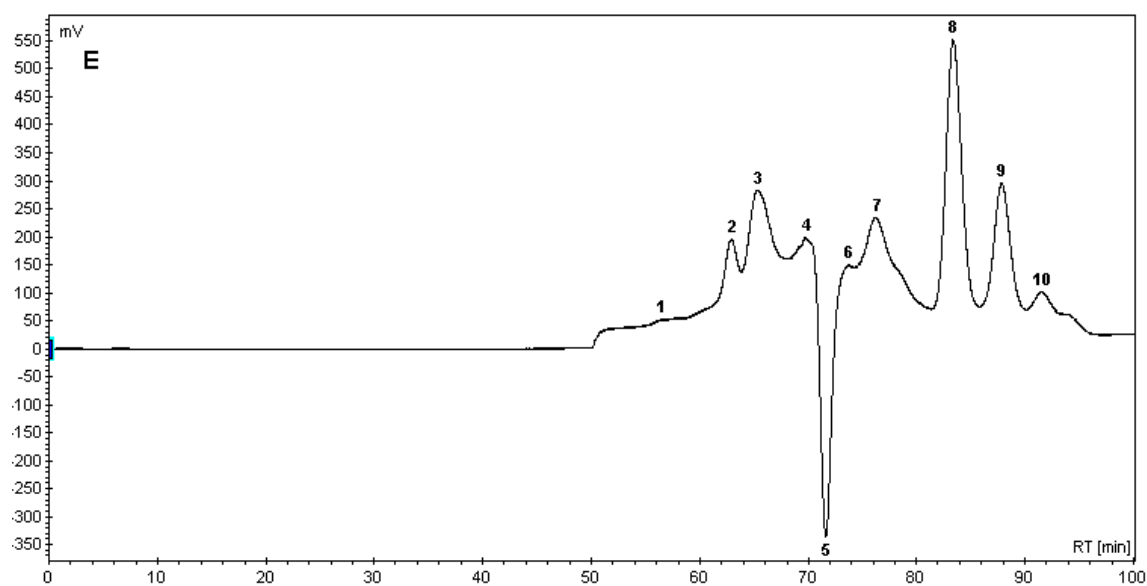
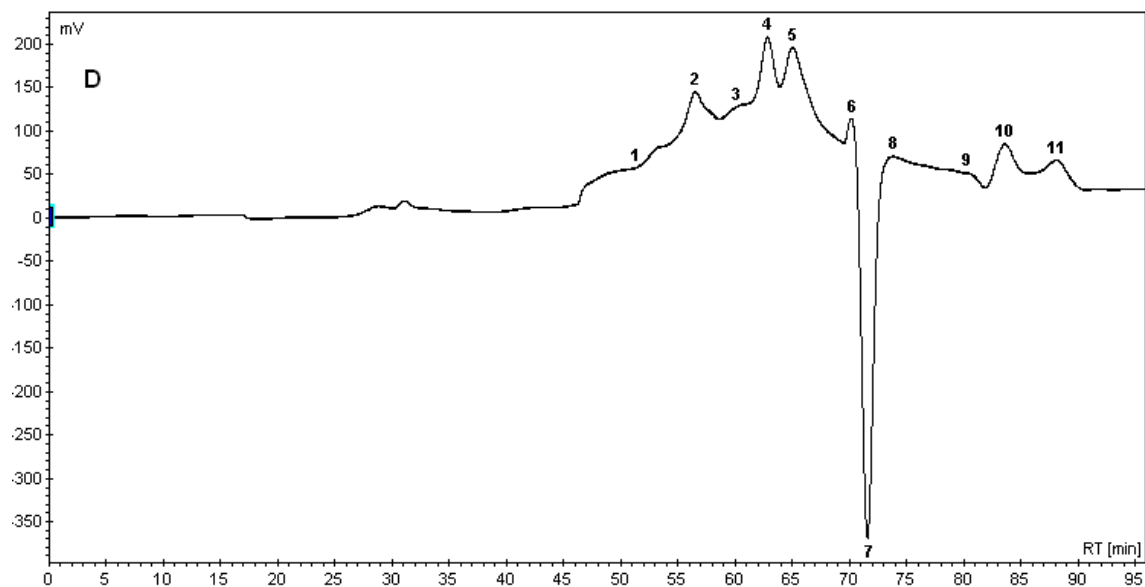


Figura 65. (Continuación) Perfiles de elución de índice de refracción mediante cromatografía de exclusión por tamaño de los oligosacáridos obtenidos en las fracciones D (arriba) y E (abajo).

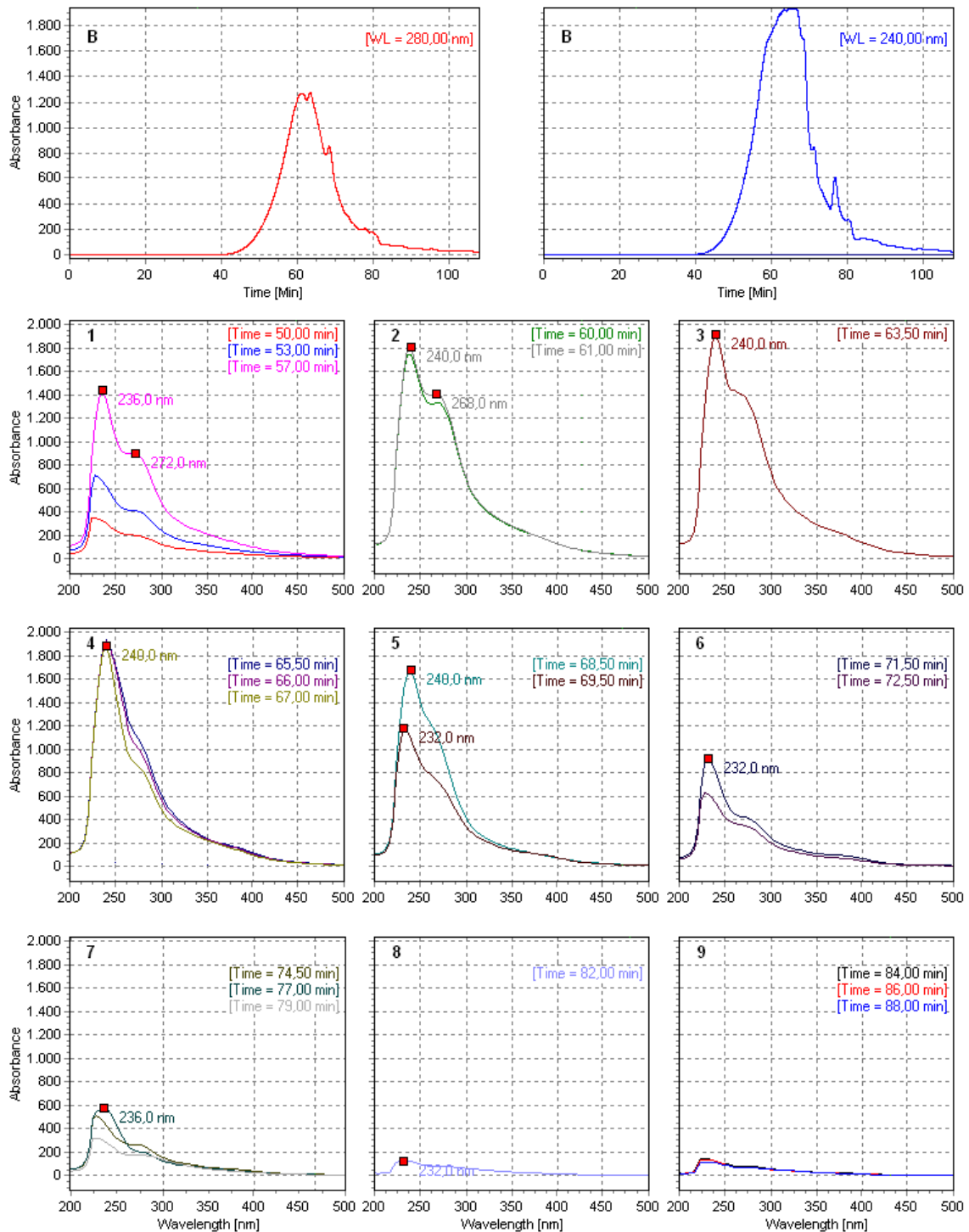


Figura 66a. Perfiles cromatográficos registrados a 240 y 280 nm de la fracción B (arriba) y espectros de absorción ultravioleta de cada una de las fracciones separadas (1-9) indicadas en la Figura 65.

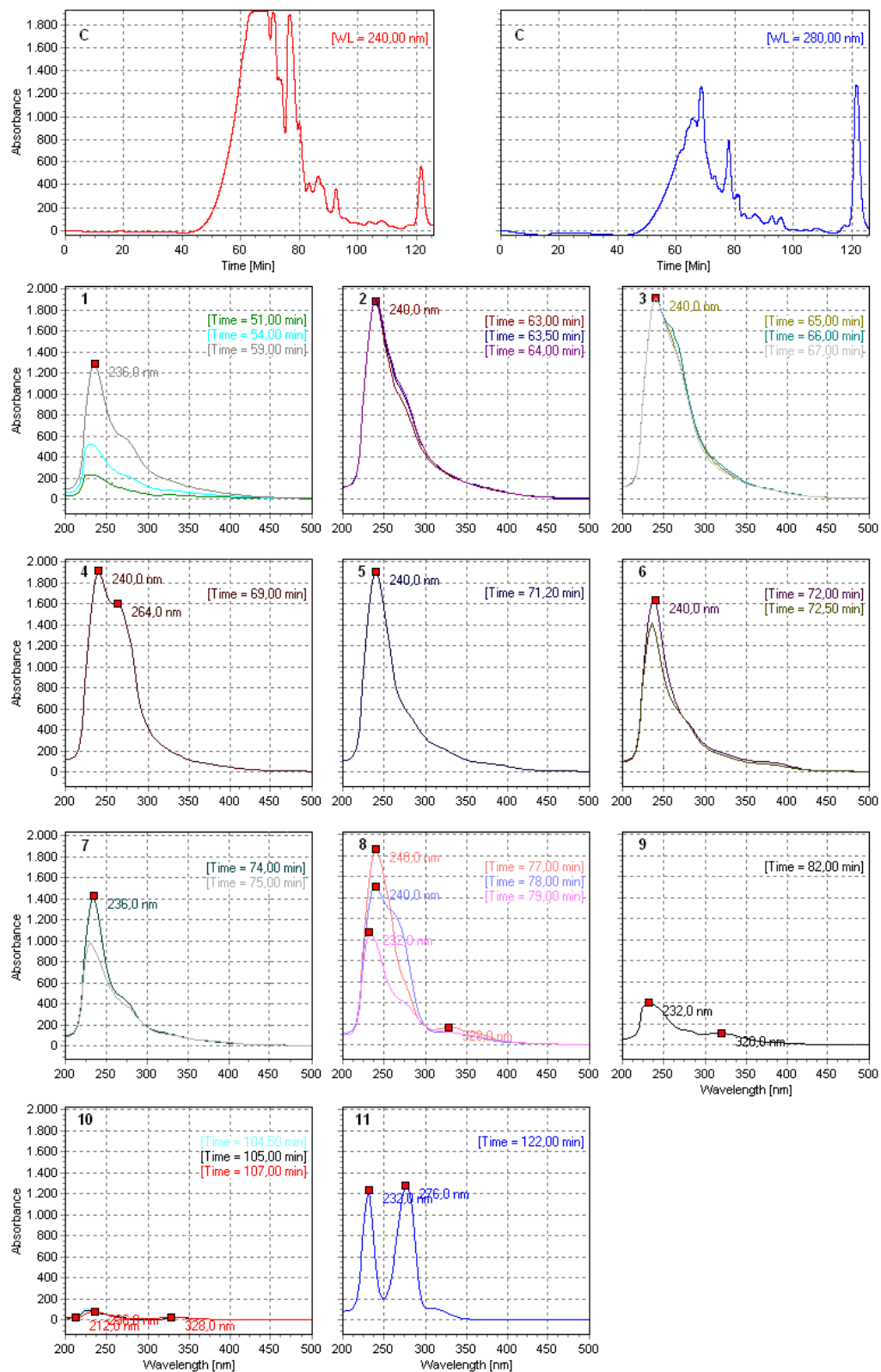


Figura 66b. Perfiles cromatográficos registrados a 240 y 280 nm de la fracción C (arriba) y espectros de absorción ultravioleta de cada una de las fracciones separadas (1-11) indicadas en la Figura 65.

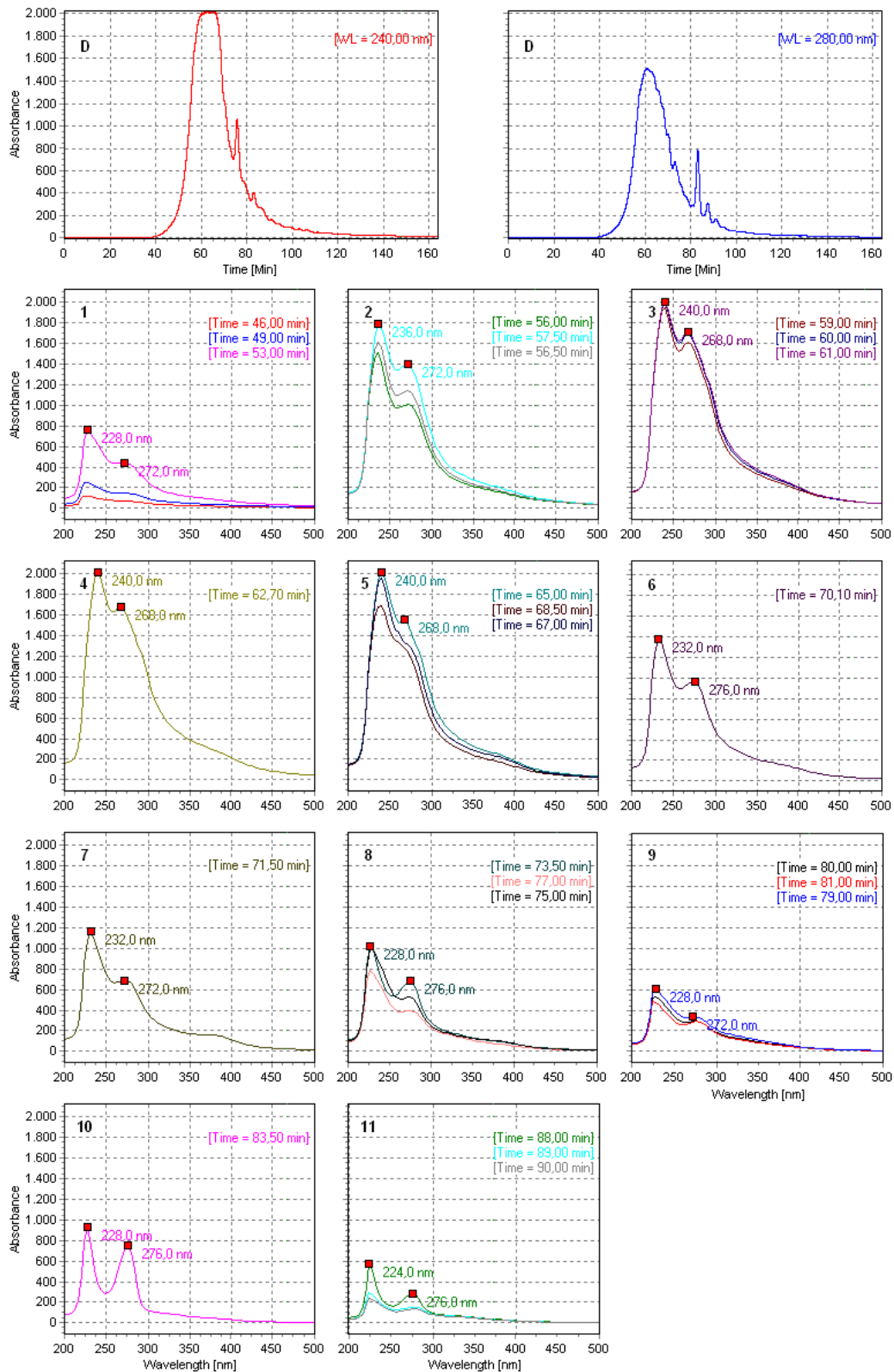


Figura 66c. Perfiles cromatográficos registrados a 240 y 280 nm de la fracción D (arriba) y espectros de absorción ultravioleta de cada una de las fracciones separadas (1-11) indicadas en la Figura 65.

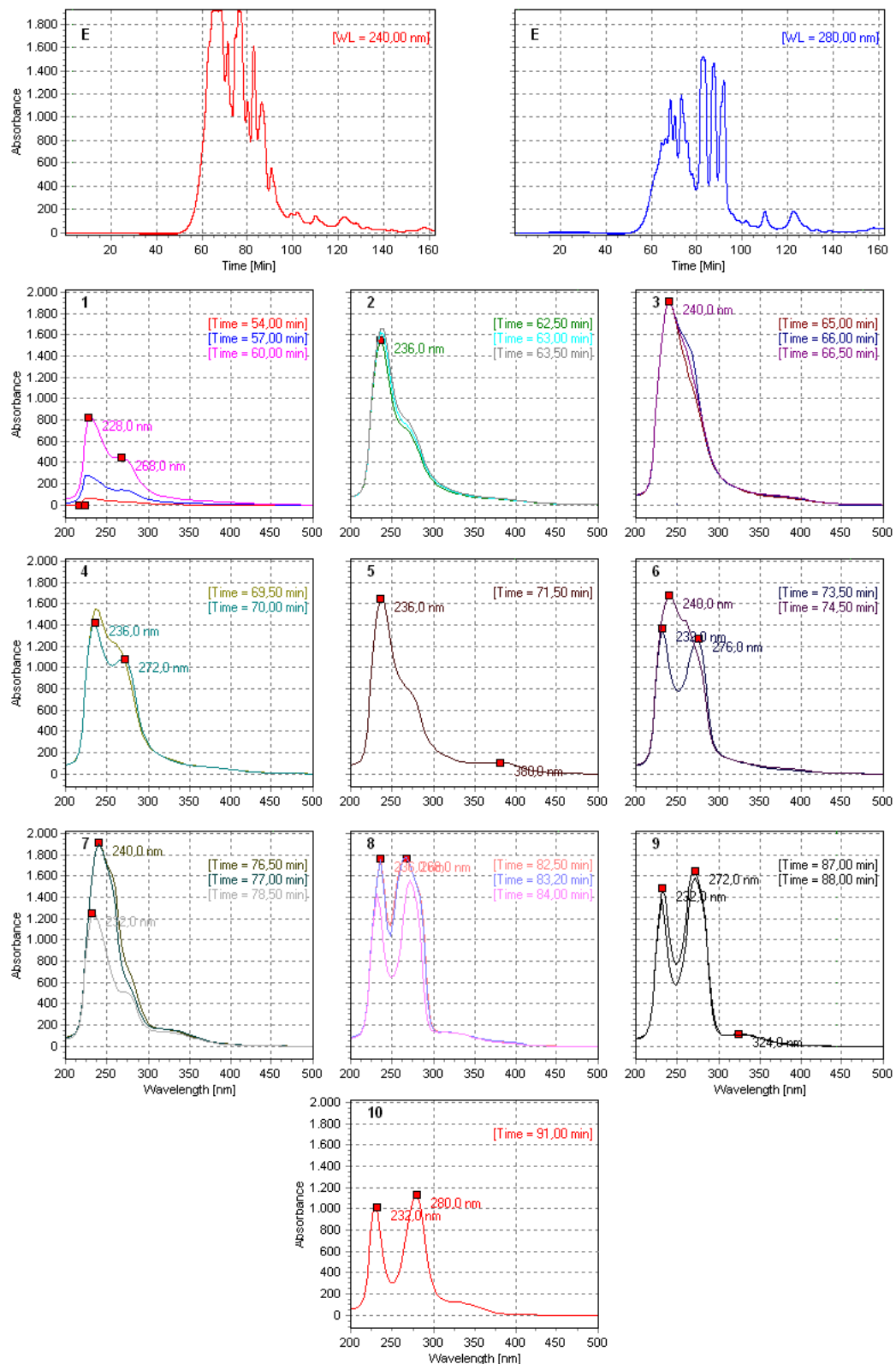


Figura 66d. Perfiles cromatográficos registrados a 240 y 280 nm de la fracción E (arriba) y espectros de absorción ultravioleta de cada una de las fracciones separadas (1-10) indicadas en la Figura 65.

Tabla 42. Contenido de azúcares neutros totales de las fracciones de ultrafiltración B, C, D y E, y composición de los oligómeros de las subfracciones separadas por cromatografía de exclusión molecular.

Fracción	Azúcares totales (mg/L) ^a											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
B	29	64	196	96	40	0	0	0	0	0	0	
C	4	30	237	253	181	52	30	12	0	0	0	
D	119	50	22	84	76	32	32	23	16	32	15	
E	33	86	150	108	96	97	51	208	157	54	0	
Fracción	Azúcares	Oligosacáridos (% molar) ^b										
B	Ramnosa	11,6	nd ^c	nd	nd	nd	- ^d	-	-	-	-	-
	Fucosa	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	-
	Arabinosa	16,8	8,3	3,6	nd	nd	-	-	-	-	-	-
	Xilosa	11,3	1,5	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	-
	Manosa	10,0	8,0	46,0	38,5	nd	-	-	-	-	-	-
	Galactosa	24,1	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	-
	Glucosa	26,2	82,2	50,3	61,5	100	-	-	-	-	-	-
C	Ramnosa	12,8	1,7	1,4	0,5	1,2	6,1	nd	26,5	-	-	-
	Fucosa	3,5	nd	nd	nd	nd	2,3	nd	14,7	-	-	-
	Arabinosa	15,8	15,2	8,7	7,9	13,5	17,4	24,6	20,5	-	-	-
	Xilosa	10,4	4,7	2,5	2,9	3,2	nd	nd	5,0	-	-	-
	Manosa	10,8	6,7	30,6	33,5	31,0	24,5	nd	nd	-	-	-
	Galactosa	19,0	2,1	1,2	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-
	Glucosa	27,8	69,6	55,6	55,1	51,1	49,7	75,4	33,3	-	-	-
D	Ramnosa	3,9	8,0	5,7	2,9	2,3	nd	nd	nd	27,0	2,2	nd
	Fucosa	nd	1,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12,0	nd	nd
	Arabinosa	13,9	12,2	9,5	4,4	nd	nd	nd	nd	9,9	3,7	nd
	Xilosa	20,9	21,2	17,9	3,2	nd	nd	nd	11,9	5,7	nd	nd
	Manosa	3,6	2,4	6,3	11,6	24,0	26,2	nd	nd	nd	nd	nd
	Galactosa	22,4	13,0	6,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Glucosa	35,2	41,6	54,0	77,9	73,7	73,8	100	88,1	45,5	94,0	100
E	Ramnosa	12,0	nd	nd	nd	9,4	3,1	1,9	nd	nd	nd	-
	Fucosa	6,6	nd	nd	nd	3,6	2,2	nd	nd	nd	nd	-
	Arabinosa	17,5	7,1	nd	3,9	5,9	2,9	2,5	0,7	nd	9,3	-
	Xilosa	18,4	6,7	3,5	2,8	4,3	14,4	10,2	nd	nd	7,0	-
	Manosa	8,0	11,7	28,5	33,9	12,5	2,5	1,9	nd	nd	1,7	-
	Galactosa	5,9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,8	-
	Glucosa	31,5	74,5	68,0	59,5	64,2	74,9	83,6	99,3	100	78,2	-

^a Determinación colorimétrica según el método de la antrona.

^b Cuantificación mediante cromatografía de gases como acetatos de alditol previa hidrólisis con TFA 2 N a 120 °C durante 2 horas.

^c nd, no detectado.

^d Análisis no realizado (ensayo negativo por el método de la antrona).

5.5.5.- Caracterización estructural de los oligosacáridos neutros mediante ESI-MS.

Los oligosacáridos aislados por cromatografía de filtración en gel fueron analizados mediante ESI-MS para determinar sus características estructurales. Un problema común con el análisis de carbohidratos mediante espectrometría de masas es que los iones en el espectro a veces no puede ser asignados inequívocamente, esto significa que más de una estructura puede ser normalmente atribuida a un espectro particular, impidiendo la identificación estructural solo con el espectro de masas. Con la información de los pesos moleculares en combinación con la composición en azúcares de las fracciones analizadas se proponen estructuras tentativas para los diferentes oligosacáridos. Las fracciones analizadas se dividen en tres grupos:

Grupo 1. Se incluyen las fracciones B1, C1, D1, D2, D3 y E1 que según los tiempos de retención de los oligosacáridos patrones tienen un grado de polimerización (DP) entre 10 y 5 (*Figura 65*) y cuyos espectros de absorción ultravioleta muestran un máximo a 228-236 nm de baja intensidad (*Figuras 66 a, b, c y d*).

Grupo 2. Se incluyen las fracciones B2, B3, B4, B5, C3, C4, C5, D4, D5, E2, E3 y E4 cuyos tiempos de retención en los cromatogramas de exclusión molecular son próximos a los de los oligosacáridos patrones con un DP 4-2 (*Figura 65*) y que tienen espectros de absorción muy similares entre ellas, con un máximo de absorción a 240 nm y un hombro más o menos intenso a 268-272 nm (*Figuras 66a, b, c y d*).

Grupo 3. Se incluyen las fracciones D6, D7 y E5 cuyos tiempos de retención según el perfil de elución en Superdex Peptide coinciden con el de monómero usado en la identificación del grado de polimerización o con el del disolvente (pico negativo) y las fracciones D8, D9, D10, D11, E6, E7, E8, E9 y E10 que eluyen después del disolvente, algunas muy significativas (E8 y E9), debido a cierta interacción con el gel (*Figura 65*). Sus espectros de absorción no son parecidos a los del grupo anterior, con un máximo de absorción próximo a 280 nm, si bien se mantiene otro máximo aproximadamente a 240 nm (*Figuras 66c y d*).

GRUPO 1

Los espectros de masas de las fracciones B1, C1, D1, D2, D3 y E1 muestran la presencia de oligosacáridos identificados como aductos de sodio $[M+Na]^+$, en el rango de masas entre m/z 500 y 1500. En la [Figura 67](#) se muestran los espectros de masas de las fracciones D1, D2 y D3.

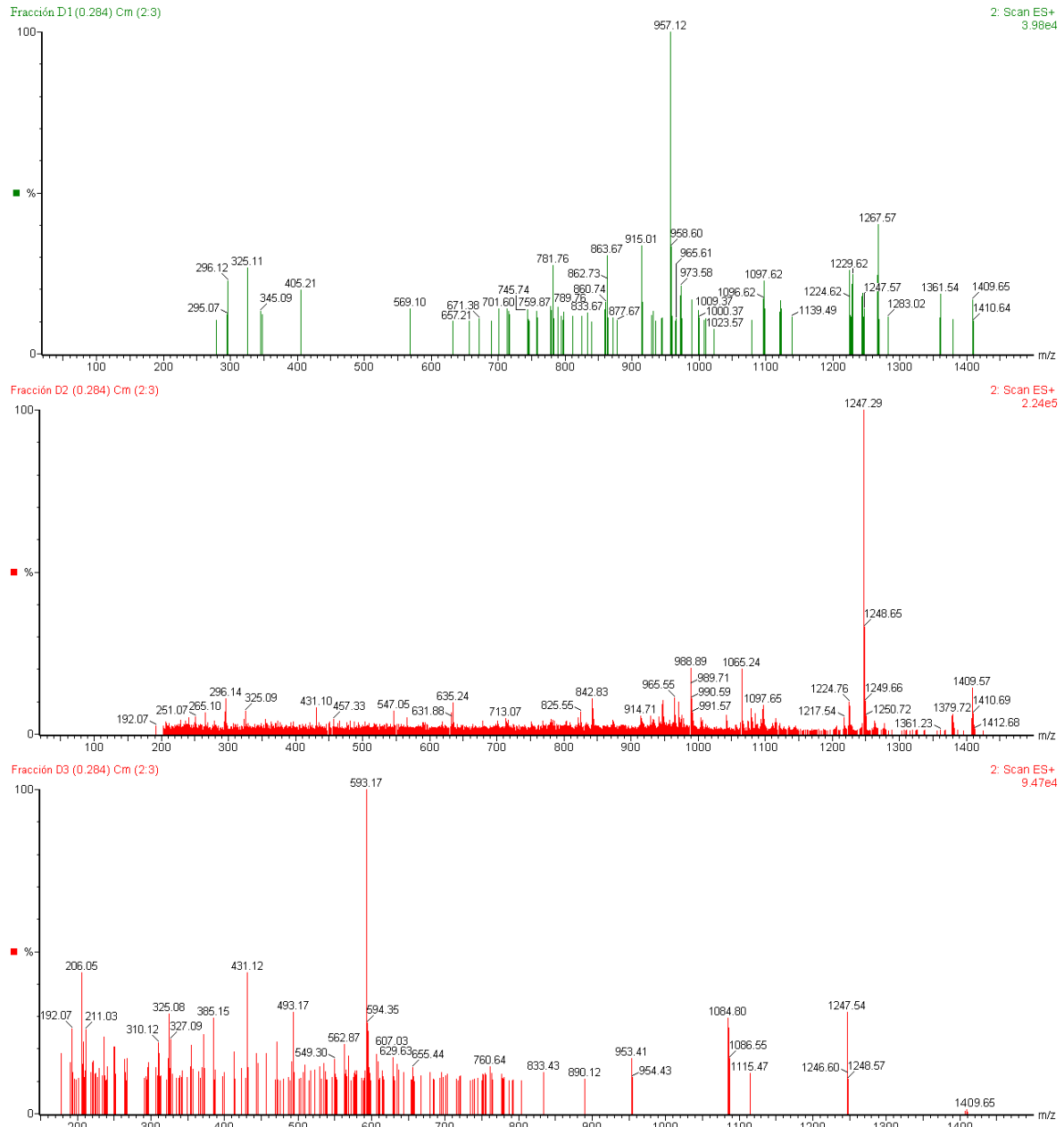


Figura 67. Espectros de masas obtenidos para las fracciones D1, D2 y D3 en modo ion positivo.

Los iones de la fracción C1 de relación masa-carga (m/z) 689, 851, 1013 y 1175 se diferencian en una masa de 162 Da, atribuida a las roturas de los enlaces glicosídicos de los

oligosacáridos ([Reis y col., 2004](#)). Esta diferencia de masa puede ser asignada a una unidad de hexosa, la cual permite atribuir los iones observados a oligosacáridos neutros compuestos de 4 a 7 unidades (Hexosa₄₋₇), respectivamente, de galactosa, glucosa o manosa, según la composición de azúcares.

El espectro de masas de la fracción D1 muestra una diversidad de masas, que permiten proponer varias estructuras para diferentes oligosacáridos. Se observan iones de relación m/z 569, 701, 833, 965, 1097, 1229 y 1361, que pueden corresponder a los aductos $[M+Na]^+$ de la rotura de xilooligosacáridos neutros (Xil₁₀) de aceituna obtenidos por hidrólisis ácida parcial ([Reis y col., 2004](#)). Estos iones muestran una diferencia de masa de 132 Da, que puede ser asignada a la pérdida sucesiva de una unidad de pentosa. Se observan también iones con más baja abundancia relativa de m/z 759 y 1023 con un incremento de 58 Da relativo a (Xil)₅ (m/z 701) y (Xil)₇ (m/z 965) que pueden atribuirse a aductos de sodio $[M-H_2O+Na]^+$ de xilooligosacáridos sustituidos con un residuo ácido -MeGlcA, con lo que se tendrían xilooligosacáridos de fórmula Xil₄MeGlcA y Xil₆MeGlcA ([Reis y col., 2003](#)). Además un ion predominante adyacente asociado a un “doble” aducto de sodio $[M-H+2Na]^+$ de m/z 781, y correspondiente a un incremento de 22 Da con respecto a Xil₄MeGlcA, es detectado, lo que podría confirmar la identificación de este tipo de xilooligosacáridos ([Figura 68](#)). El ion más abundante de m/z 957 también puede ser atribuido a $[M-H+2Na]^+$ correspondiente a un xilooligosacárido sustituido con un grupo 4-O-metilglucurónico, Xil₄GlcAMeGlcA. Los iones de m/z 657 y 789 que presentan un aumento de 88 Da relativo a Xil₄ (m/z 569) y Xil₅ (m/z 701) pueden ser asignados a xilooligosacáridos sustituidos con dos residuos de ácido glucurónico (GlcA), de fórmula Xil₂GlcA₂ y Xil₃GlcA₂. Otra serie de iones de m/z 745, 877 y 1009 correspondientes a las estructuras Xil₄₋₆GlcA también puede observarse.

En los espectros de masas de las fracciones D1, D2 y D3 se observa un ion principal de relación m/z 1247 que corresponde a un aducto de sodio, aunque también puede verse en el espectro de la fracción D1 y D2, con baja abundancia relativa, la contribución de un fragmento protonado $[M+H]^+$, de relación m/z 1225. Ambos iones pueden atribuirse a una estructura (Hexosa)₅(Pentosa)₃ según la composición de ésta última. El análisis de los espectros muestra también el ion cuasimolecular $[M+Na]^+$ de m/z 1409, que basándose en la composición de azúcares de la fracción D3, con una relación Glc:Xil:Gal:Ara 4:2:1:1, es decir, hexosas/pentosas 2:1, permite sugerir una estructura tentativa de fórmula (Hexosa)₆(Pentosa)₃ y que ha sido propuesta por [Vierhuis y col., 2001a, c](#) para oligosacáridos xiloglucanos de la pared celular de la aceituna. Se observan además iones de m/z 1085 y 953 correspondientes a la pérdida de unidades de hexosa y pentosa.

En el espectro ESI-MS de la fracción D3 y E1 los iones observados en modo positivo de relación m/z , 1247, 1115, 1085, 953 y 629 pueden corresponder a oligosacáridos xiloglucanos no acetilados de fórmula general (Hexosa)₆(Pentosa)₃ ([Vierhuis y col., 2001c](#)) debidos a la pérdida sucesiva de unidades de arabinosa, xilosa y glucosa ([Figura 69](#)). La composición glicosídica de los

oligosacáridos neutros de estas fracciones (ver *Tabla 42*), con arabinosa, glucosa y xilosa como azúcares más abundantes, así lo corrobora.

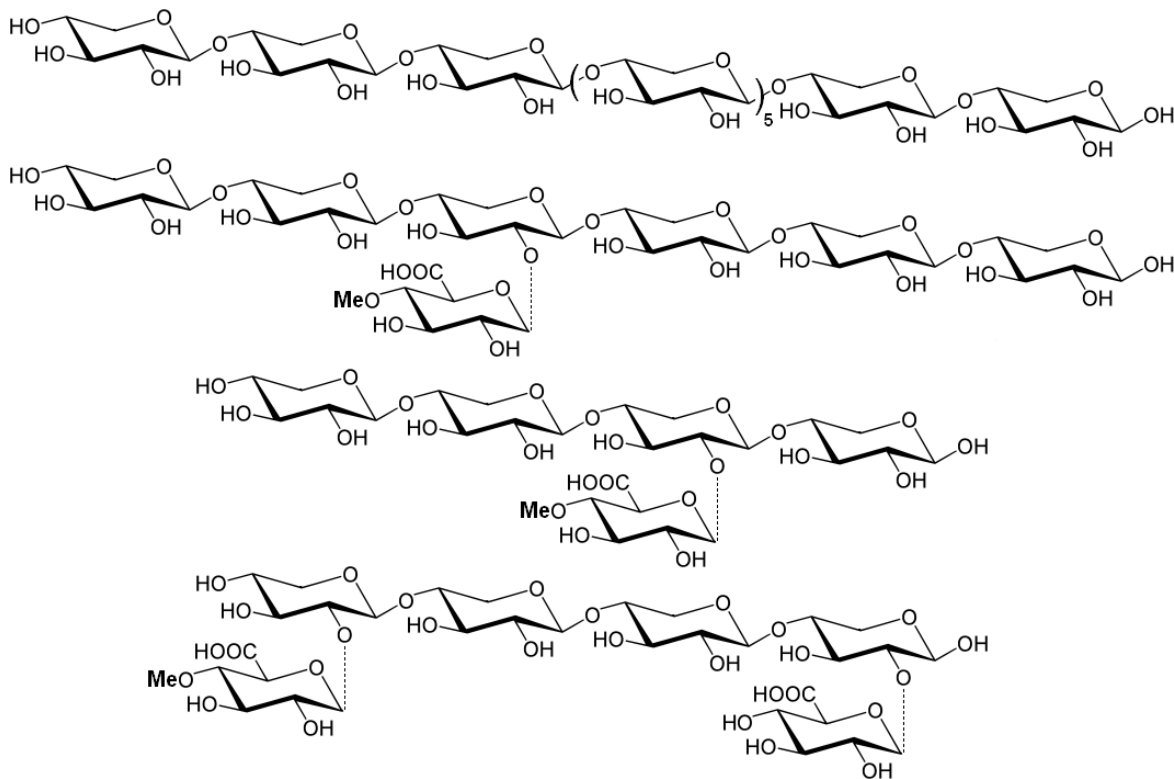


Figura 68. Estructuras de posibles xilooligosacáridos (Xil_{10} , $Xil_6MeGlcA$, $Xil_4MeGlcA$ y $Xil_4GlcAMeGlcA$) identificados en la fracción D1.

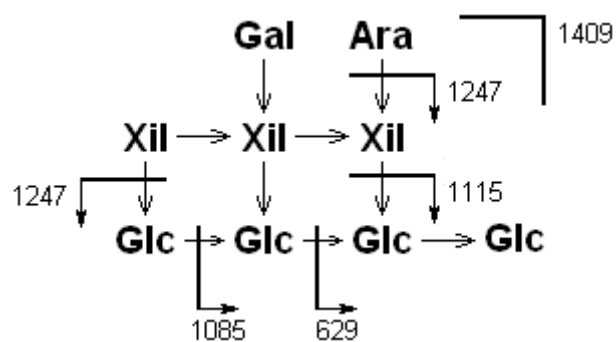


Figura 69. Esquema de fragmentación de la supuesta estructura de los oligosacáridos xiloglucanos identificados en la fracción E1.

GRUPO 2

En los espectros de masas en modo ion negativo obtenidos de las fracciones B2, B3, B4, B5, C3, C4, C5, D4, D5, E2, E3 y E4 se observa un mismo patrón de fragmentación, indicando la presencia de una estructura común en todas ellas. En la [Figura 70](#) se muestra el espectro de la fracción E2 que se toma como representativo de todas las demás. Se caracteriza por la presencia de un intenso ion, uno de los más abundantes, de relación m/z 407 (que tiene su correspondiente aducto de sodio $[M+Na]^+$ de m/z 431 en modo ion positivo), el cual se podría atribuir al ion pseudomolecular $[M-H]^-$, pero se desconoce de qué compuesto se trata. Este ion fragmento ha sido previamente descrito en la bibliografía ([Cardoso y col., 2005](#); [Menéndez, y col., 2008](#)) de *Olea europaea* pero su estructura no ha sido determinada. Este ion también se observa en todas las fracciones que eluyen de la columna de filtración en gel antes que el disolvente, incluidas algunas de las fracciones del grupo 1 (espectro de masas en modo ion positivo de la fracción D3, [Figura 67](#)).

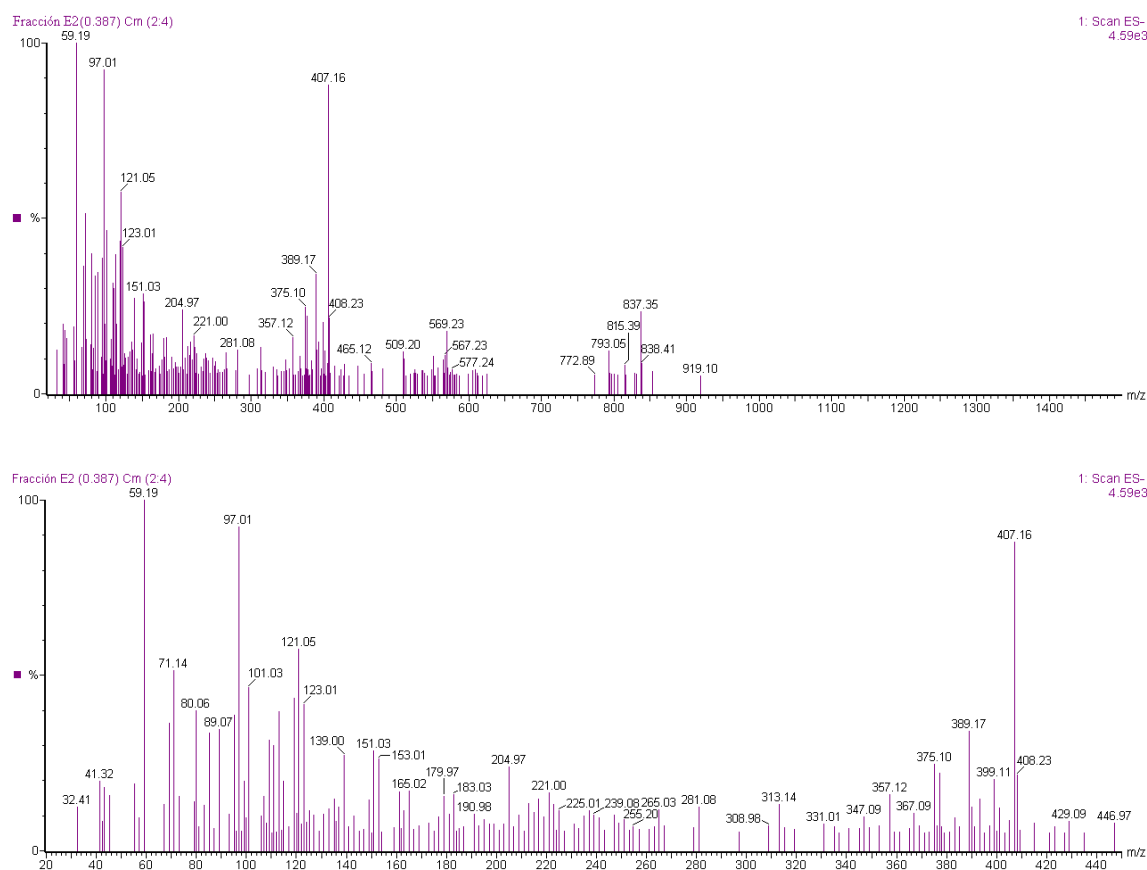


Figura 70. Espectros de masas obtenidos para la fracción E2: (arriba) en modo full scan; (abajo) ampliación en modo negativo en el intervalo de relación m/z 20-450 uma.

Dos compuestos secoiridoides de masa similar han sido aislados y sus estructuras identificadas sobre la base de datos espectrales a partir de *Olea europaea*: la aglicona de la

oleuropeína (378) y de la 10-hidroxioluropeína (394) (*Figura 71*) ([Angerosa y col., 1996](#); [Caruso y col., 2000](#)).

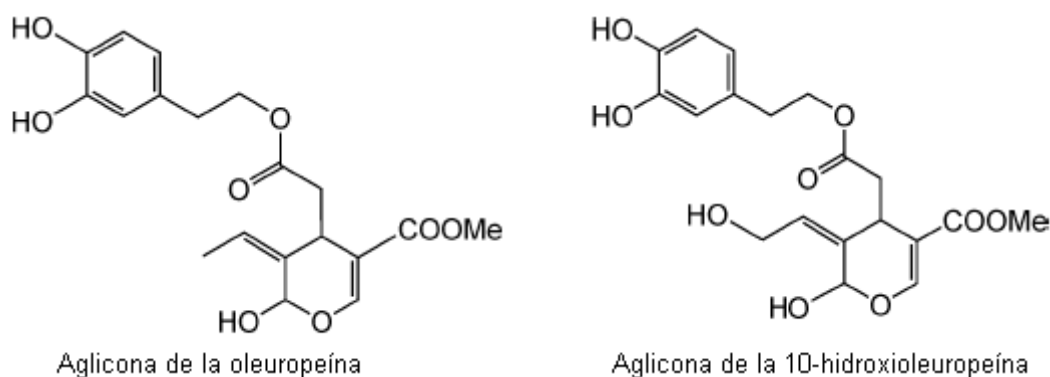


Figura 71. Estructuras químicas de secoiridoides de peso molecular similar al del compuesto detectado en los espectros de masas de las fracciones B2 a B5, C3 a C5, D4 y D5 y E2 a E4. Se caracterizan por una función olefínica exocíclica en posiciones 8,9 u 8,10.

El espectro generado por este compuesto desconocido en modo ion negativo proporciona dos iones fragmentos destacables de relación m/z 153 y 123, característicos de hidroxitirozol ([Savarese y col., 2007](#)). Esto sugiere que el compuesto podría estar constituido en parte por este compuesto fenólico. El ion de m/z 407 podría ser también un fragmento de un ion de relación m/z 569 detectado en el espectro de masas en el modo negativo. La fragmentación del ion m/z 569 produciría la correspondiente aglicona con m/z 407, por la pérdida neutral de una unidad de hexosa de 162 Da. Por lo tanto, los iones detectados en las fracciones podrían corresponder a un compuesto secoiridoide oleosídico. Sin embargo, esta fragmentación no se observa en todas las fracciones.

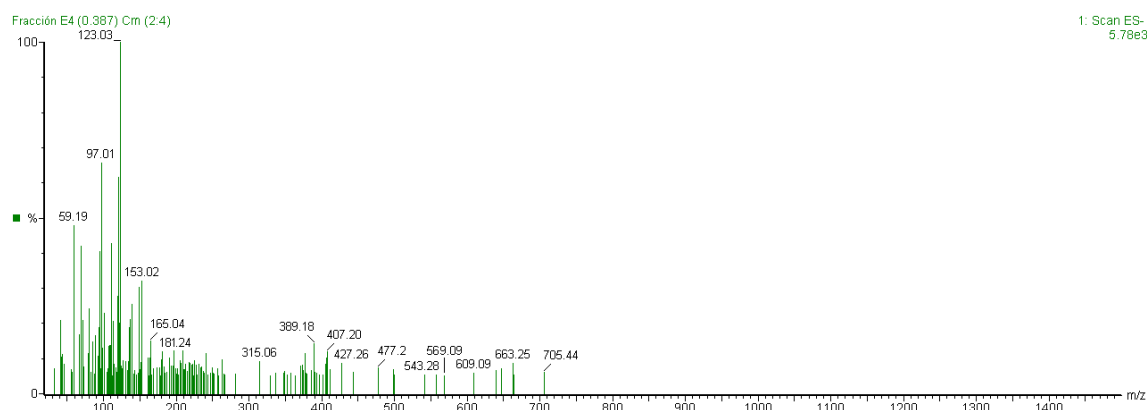


Figura 72. Espectro de masas obtenido para la fracción E4 en modo negativo.

Estas observaciones, además de la consideración de que todas las fracciones tienen un máximo de absorción a 240 nm y un hombro alrededor de 268-272 nm en el espectro ultravioleta según los análisis HPLC-DAD (ver cromatogramas y espectros de absorción ultravioleta de las fracciones obtenidas de la separación por cromatografía de filtración en gel, [Figuras 66a, b, c y d](#)), permite sugerir que el compuesto desconocido podría ser identificado como un compuesto oleosídico conjugado a un fenol. Esto está apoyado por el hecho de que los compuestos oleosídicos muestran una absorbancia característica a esta longitud de onda (240 nm) ([Cardoso y col., 2005](#)). Para todas las fracciones mencionadas, estas suposiciones no permiten la identificación inequívoca, pero pueden ser suficientes para sugerir que el pico observado de m/z 407 es consistente con las estructuras representadas en la [Figura 73](#). Se pueden proponer varias moléculas ya que debe existir alguna diferencia estructural que explique por qué eluyen en fracciones diferentes mediante cromatografía de adsorción (con agua y metanol) y de filtración en gel. Dicha diferencia estructural puede ser debida a la distinta posición que ocupe la unidad de hexosa como sustituyente (R1, R2, R3 o R4). La composición de azúcares de las fracciones de este grupo ricas en glucosa y manosa (ver [Tabla 42](#)) sugiere también la posibilidad de más de una unidad de azúcar, sin embargo en los espectros de masas no es posible asignar las fragmentaciones correspondientes. La estructura propuesta B o ácido oleuropeínico (R1 = Glc; R2, R3 y R4 = H) ha sido descrita por [Kikuchi y Yamauchi, 1985](#) en *Ligustrum japonicum*. La presencia de los iones de m/z 705 y 543 (por pérdida de hexosa) en algunas de las fracciones ([Figura 72](#)) permiten además proponer la estructura C. En cambio, la estructura D puede ser descartada pues la fracción fenólica 3,4-dihidroxifenil etil ácida no ha sido descrita en ningún compuesto de la familia *Oleaceae*.

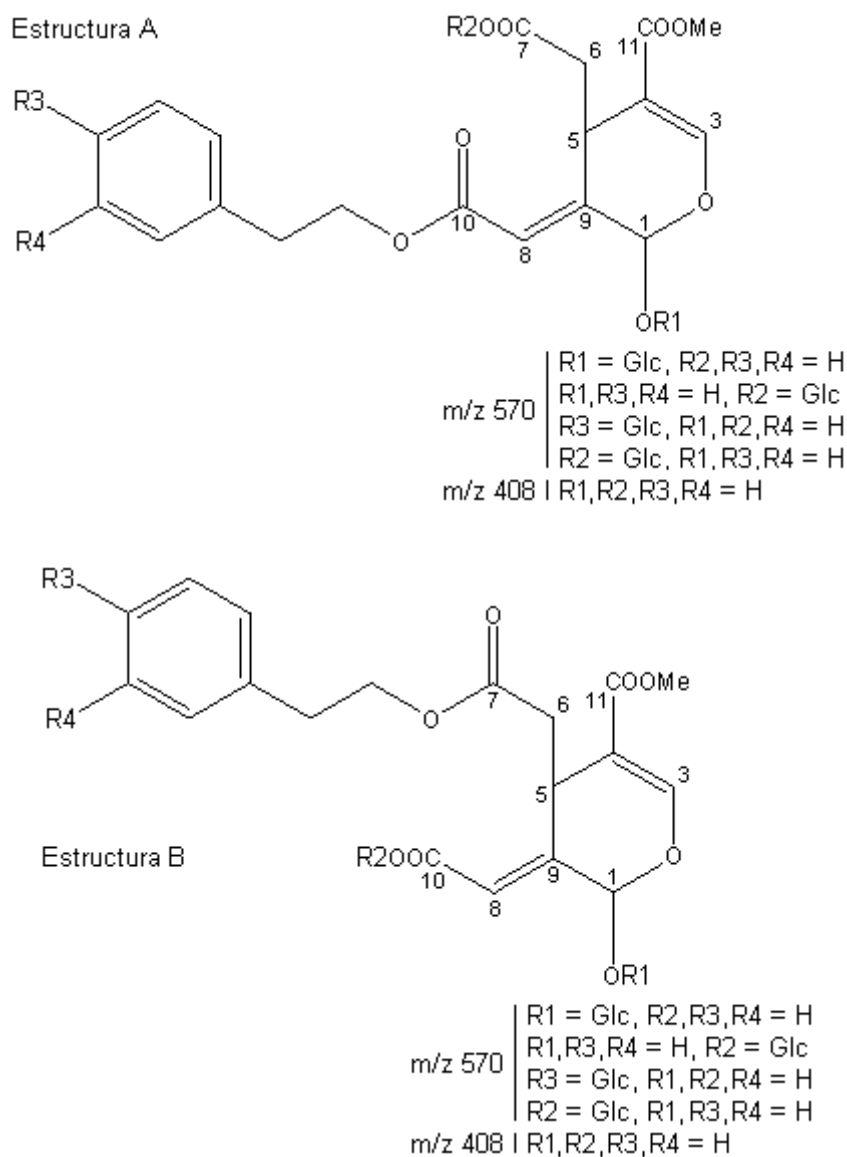
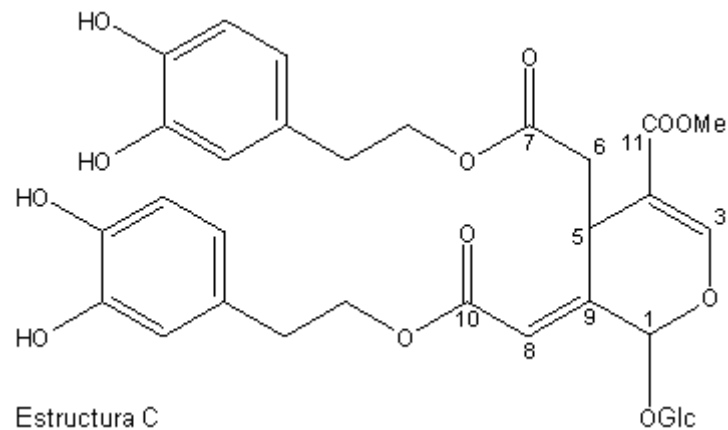


Figura 73. Estructuras propuestas del compuesto detectado en las fracciones B2-5, C3-5, D4-5 y E2-4. Se trata de una estructura secoiridoide oleosídica conjugada a un compuesto fenólico, el hidroxitirosol. Se representa también la numeración del esqueleto secoiridoide.



Estructura D

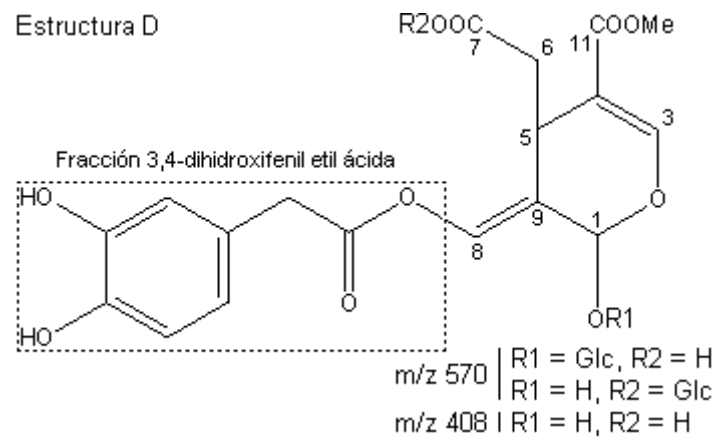


Figura 73. (Continuación) Estructuras propuestas del compuesto detectado en las fracciones B2-5, C3-5, D4-5 y E2-4. Se trata de una estructura secoiridoide oleosídica conjugada a un compuesto fenólico, el hidroxitirosol. Se representa también la numeración del esqueleto secoiridoide.

En el espectro en modo ion negativo también se identifica el posible ion $[2M-H]^-$ de m/z 815. Después de su aislamiento, el espectro MS/MS obtenido por fragmentación de este ion sigue el mismo patrón observado para el de m/z 407 confirmando que este último es el ion cuasimolecular $[M-H]^-$ (Figura 74). Además de él, como se observa también en el espectro de masas original, se detectan intensos iones de m/z 389, 375, 357 y 313, los cuales son consistentes con el esquema de fragmentación representado en la Figura 75.

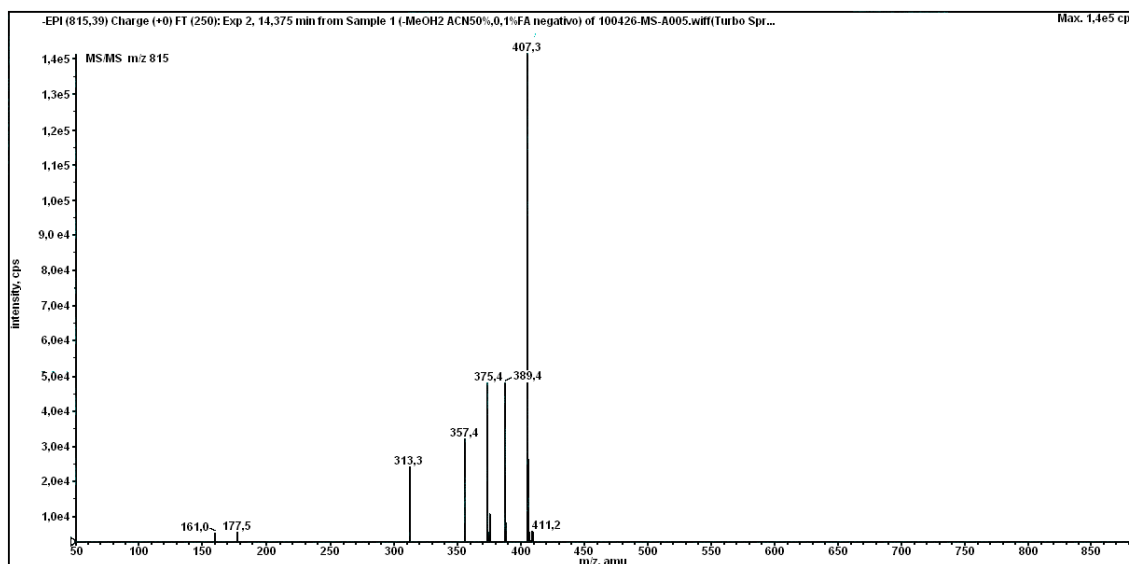


Figura 74. Espectro de fragmentación MS/MS del ion $[2M-H]^-$ de m/z 815.

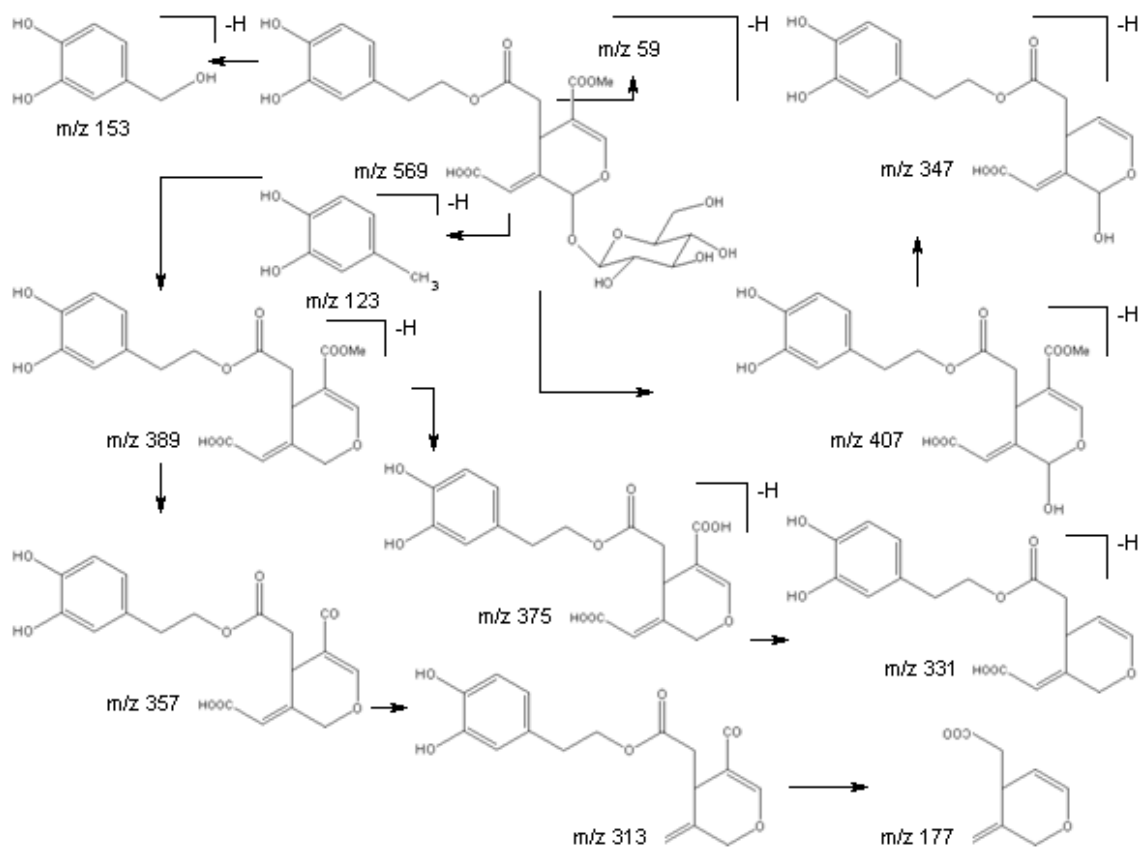


Figura 75. Esquema de fragmentación consistente con la estructura B.

La fracción secoiridoide de la estructura propuesta pudiera proceder de la ruta biosintética identificada como “1e” por [Jensen y col., 2002](#) (*Figura 76*) en *Fraxinus excelsior* y *Syringa josikea* y *vulgaris*, a partir de 7-*epi*-loganina, un intermedio clave en la biosíntesis de la mayoría de los oleósidos.

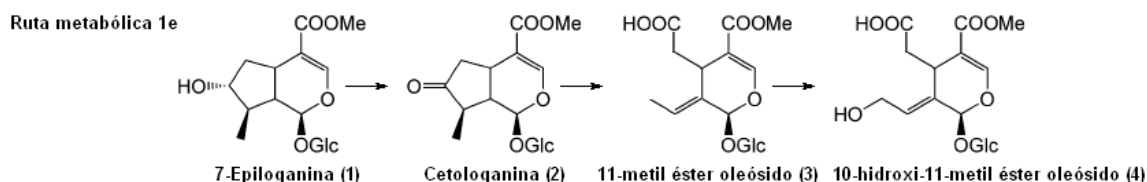


Figura 76. Ruta metabólica para la formación de oleósidos identificada como “1e” por [Jensen y col., 2002](#).

A partir del 10-hidroxi-11-metil éster oleósido (compuesto 4 de la *Figura 77*) se sugiere una posible ruta para la formación de la misma, por oxidación de la posición 10 (primero a aldehído y después a ácido) y posterior esterificación con hidroxitirosol, de manera similar a la ruta biosintética que proponen [Obied y col., 2008](#) para la formación de un importante compuesto secoiridoide conjugado presente en la aceituna, tal como la oleuropeína, que contiene la misma fracción fenólica esterificada.

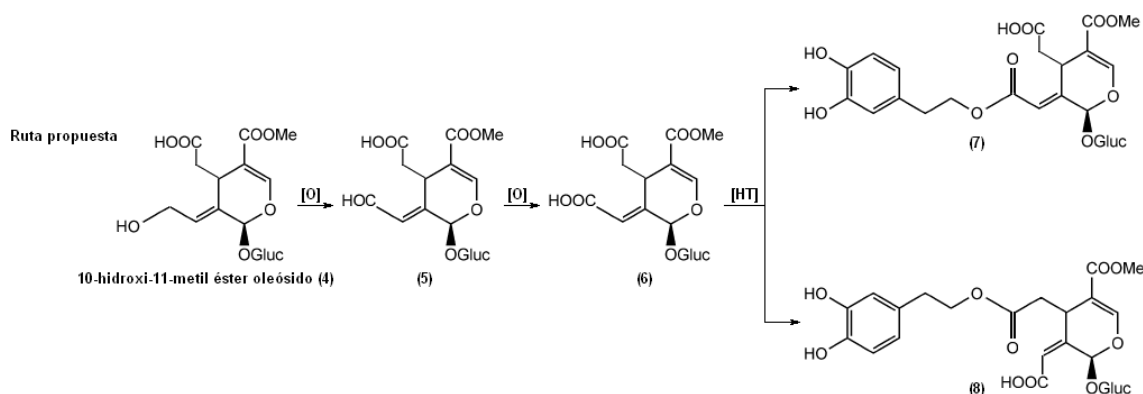


Figura 77. Ruta para la formación de las estructuras propuestas A (compuesto 7) y B (compuesto 8).

La fracción secoiridoide de las estructuras propuestas está ampliamente presente en la familia *Oleaceae*. A nivel molecular, los miembros de esta familia contienen una gran diversidad de derivados secoiridoideos. Los secoiridoideos son derivados de los iridoideos por apertura del anillo de ciclopentanopirano. La mayoría de los iridoideos en la familia *Oleaceae* son secoiridoideos y se encuentran entre los compuestos más frecuentes aislados a partir de las especies de esta familia. La oleuropeína y el ligustrósido, ésteres glucósidos de ácido elenólico e hidroxitirosol y tirosol, respectivamente (*Figura 78*) son los secoiridoideos más significativos en *Olea europaea*. Otros

compuestos secoiridoides encontrados en aceitunas son 10-hidroxioluropeína, oleurósido, desmetiloluropeína, jaspoliosido, nuzhenida y los derivados agliconas de oleuropeína y ligustrósido y sus formas desmetiladas ([Obied y col., 2008](#)).

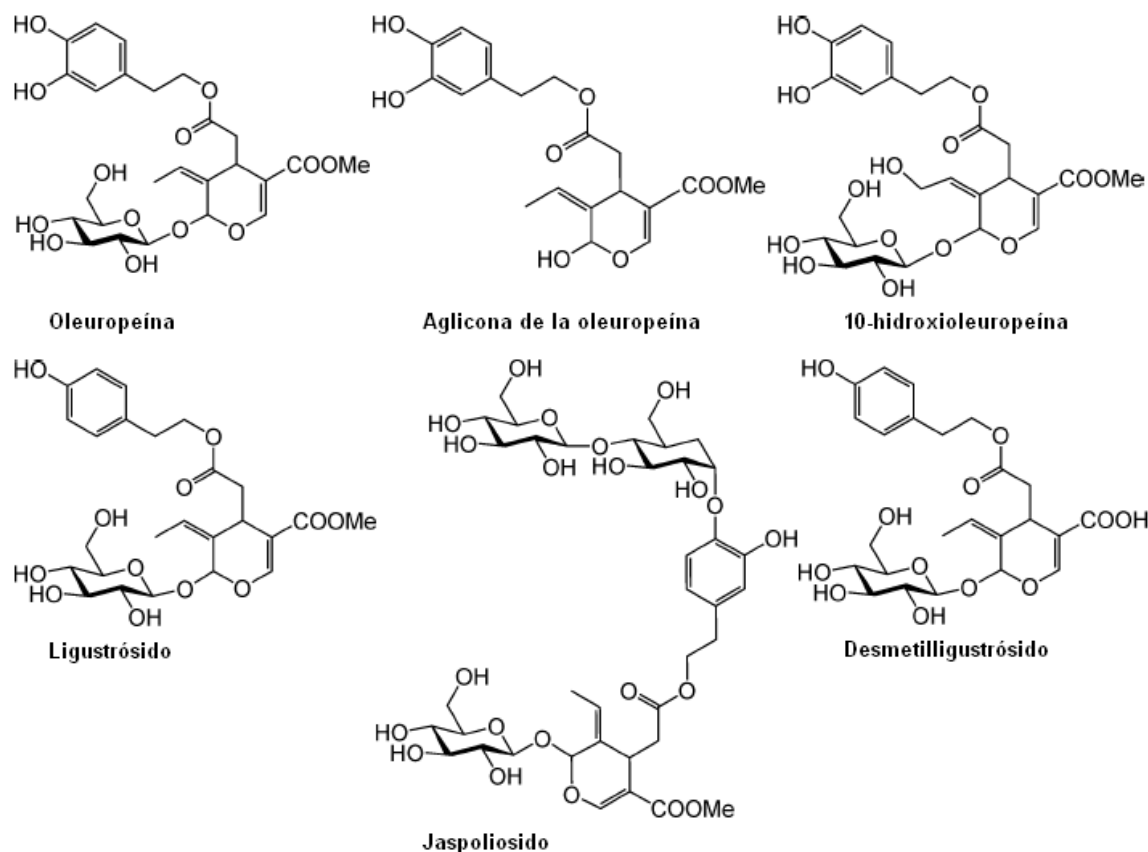


Figura 78. Estructuras químicas de algunos de los compuestos secoiridoides más importantes en *Olea europaea*.

Los secoiridoides no sólo son abundantes en *Oleaceae*, sino que también están naturalmente presentes en muchas otras familias de plantas. [Dinda y col., 2007](#) hacen una compilación de los nuevos iridoides y secoiridoides descritos en la bibliografía hasta el año 2005, los cuales son revisados con los datos físicos y espectrales disponibles (punto fusión, $[\alpha]_D$, UV, IR, RMN ^1H y ^{13}C y origen vegetal). Los secoiridoides conjugados a una fracción fenólica aparecen en familias de plantas tales como *Caprifoliaceae*, *Gentianaceae*, *Loganiaceae* y *Rubiaceae*.

La fracción E2 se analiza mediante espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C para caracterizar las propiedades estructurales del compuesto desconocido. Los análisis de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C ([Figura 79](#)) permiten asignar algunas de las señales a la estructura propuesta B del ácido oleuropeínico, aunque la asignación de las señales del espectro de RMN de ^1H no está completa y podrían corresponder a algunas de las otras estructuras propuestas. En la [Tabla 43](#) se reúnen los datos de los desplazamientos químicos (δ) de las principales señales asignadas. Una

fuerte señal entre 4,5 y 5 ppm se atribuye al disolvente. Las asignaciones de las señales están hechas usando el esquema de numeración mostrado. En los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de la estructura propuesta se pueden ver señales características del hidroxitirosol, del núcleo secoiridoide y de la glucosa. Algunos de los desplazamientos químicos son coincidentes con los datos de RMN de ^1H y ^{13}C que proporcionan [Kikuchi y Yamauchi, 1985](#) para la estructura del ácido oleuropeínico (*Figura 73*) en CDCl_3 . Para RMN de ^1H : 2,03, 2,04, 2,08 (12H, cada uno s, 4 CH_3COO), 2,28 (6H, s, 2 CH_3COO), 3,72 (3H, s, CH_3O), 6,83-7,15 (3H, protones aromáticos), 7,50 (1H, s, $\text{C}_3\text{-H}$) y ^{13}C : 93,2 (C-1), 152,8 (C-3), 108,2 (C-4), 31,2 (C-5), 39,4 (C-6), 118,9 (C-8), 147,7 (C-9), 166,6 (C-11), 97,5 (C-1''), 71,0 (C-2''), 72,7 (C-3''), 68,4 (C-4''), 72,5 (C-5''), 61,9 (C-6''), 51,7 (OCH_3), 64,8 (C-1'), 34,3 (C-2'), 137,0 (C-3'), 123,6 (C-4'), 142,3 (C-5'), 141,1 (C-6'), 124,0 (C-7'), 127,2 (C-8') que están de acuerdo con los valores recogidos en la *Tabla 43*.

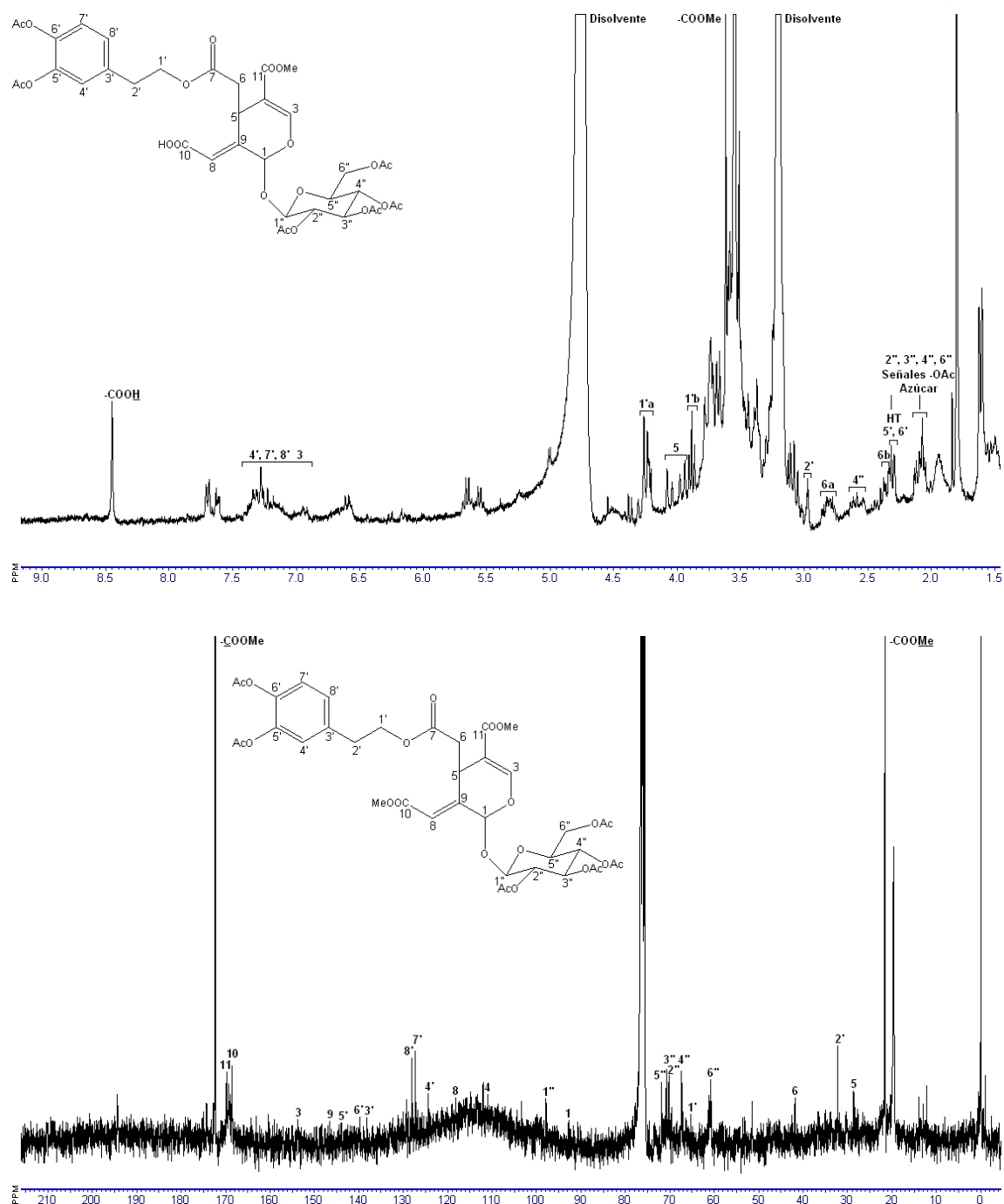


Figura 79. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (registrados a 300 y 75 MHz, respectivamente) obtenidos para la fracción E2.

Tabla 43. Datos de los desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C para la fracción E2.

Posición	Hidroxitirosol		Fracción secoiridoide			Glucosa		
	^1H	^{13}C		^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	
1'a	4,20 ^a (t) ^b	65,1 ^c	1	-	93,1	1''	-	98,7
1'b	3,98 (t)					2''		70,5
2'	2,95 (t)	33,2	3	7,38 (s)	153,8	3''	Señales -OAc	71,4
3'	-	137,4	4	-	111,0	4''	2,05 (cada una s)	66,6
4'	6,80-7,20 (nr)	124,2	5	4,08 (dd)	28,5	5''	-	74,5
5'	Señales -OAc	143,9	6a	2,81 (nr)	41,9	6''		61,2
6'	2,29 (s)	140,1	6b	2,40 (dd)				
7'	6,80-7,20 (nr)	127,0	7	-	174,1			
8'	6,80-7,20 (nr)	127,8	8	-	118,1			
			9	-	146,6			
			10	-	168,4			
			11	3,65 (s)	170,1			

^a Los desplazamientos químicos a 25 °C están en ppm relativos a TMS = 0 en CD₃OD.

^b El tipo de multiplicidad está dada entre paréntesis: dd, doble doblete; nr, no resuelta; s, singlete; t, triplete.

^c Los desplazamientos químicos a 25 °C son relativos a TMS = 0 en CDCl₃.

GRUPO 3

Las fracciones D6, D7, D8, D9, E5, E6 y E7 se caracterizan por un espectro con un intenso ion de relación m/z $[M+Na]^+$ 501. Los espectros generados en modo ion negativo proporcionan la molécula desprotonada $[M-H]$ y el correspondiente ion de m/z 477. El espectro también muestra un ion de relación m/z 315, correspondiente a una pérdida de 162 Da (pérdida de hexosa), el cual proporciona dos fragmentos principales uno a m/z 153 y el otro de m/z 123 (*Figura 80 y 81*). La secuencia de fragmentación $315 \rightarrow 153 \rightarrow 123$ es típica de glucósido de hidroxitirosol. Estas evidencias sugieren la hipótesis de que estos picos correspondan a un diglucósido de hidroxitirosol no descrito por el momento en la bibliografía. No obstante, no es posible establecer la posición de enlace entre el hidroxitirosol y las glucosas o las uniones glucosa-glucosa, bien en los grupos hidroxilos fenólicos, o bien en el hidroxilo alifático. En la *Figura 80* se muestra también una de las estructuras propuestas.

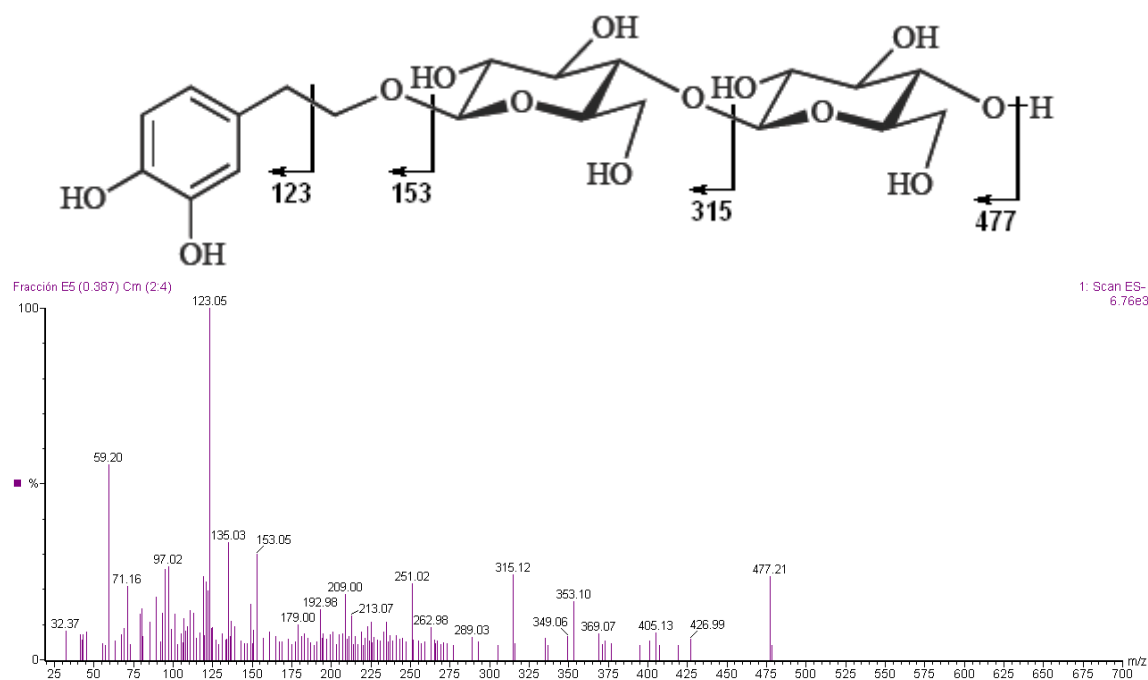


Figura 80. Espectro de masas obtenido para la fracción E5 en modo negativo.

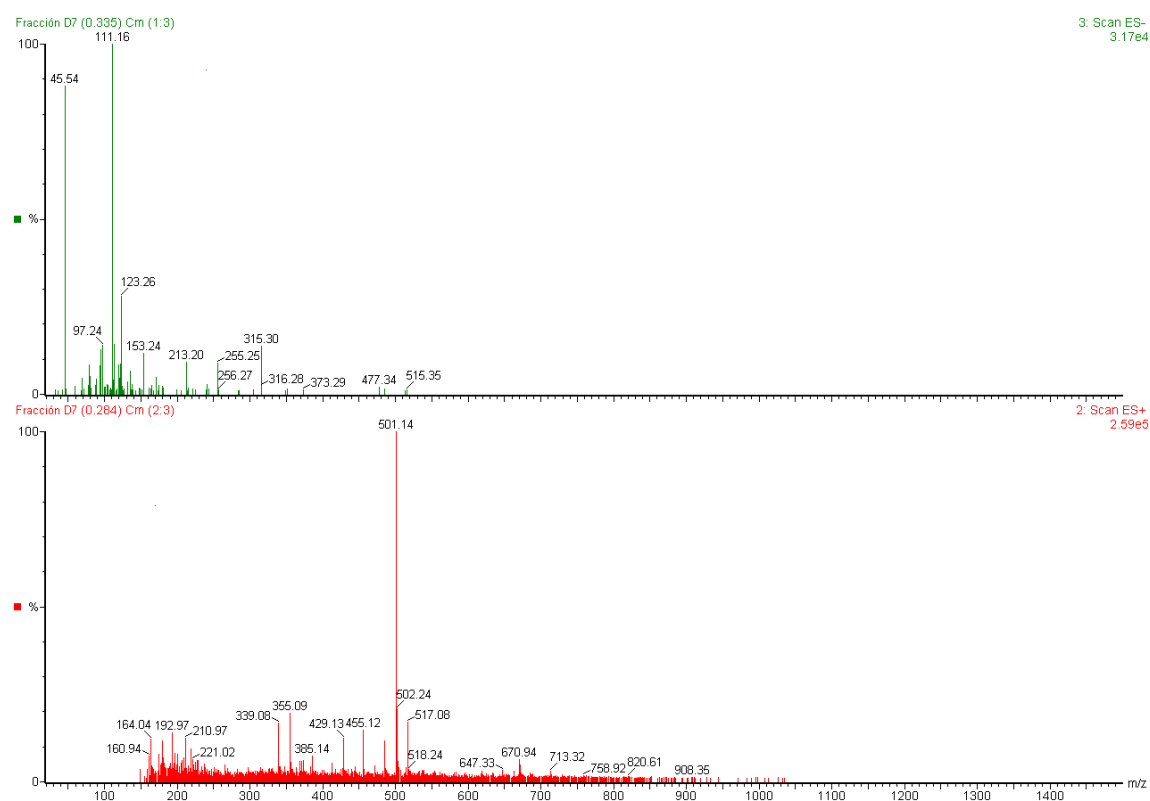


Figura 81. Espectros de masas obtenidos para la fracción D7: (arriba) en modo negativo; (abajo) en modo positivo.

En la fracción D10 se observan dos iones fragmentos característicos del verbascósido de relación m/z 461, de baja intensidad, y 161, aunque el pico molecular en modo ion negativo representado por el ion $[M-H]^-$ m/z 623 no aparece en el espectro (*Figura 82*). Basándose en el esquema de fragmentación (CID) de ion negativo propuesto por [Ryan y col., 1999](#), la pérdida de ácido cafeico produce el ion m/z 461 y un grupo ceténico como fragmento neutro, mientras que el pico de m/z 161 resulta de una transferencia de protón y la producción de un grupo ceténico aniónico (*Figura 83*). La pérdida de ácido cafeico y ramnosa de la estructura produce el ion de relación m/z 315 y éste, a su vez, m/z 153 y 123 característicos todos ellos del glucósido de hidroxitirosol.

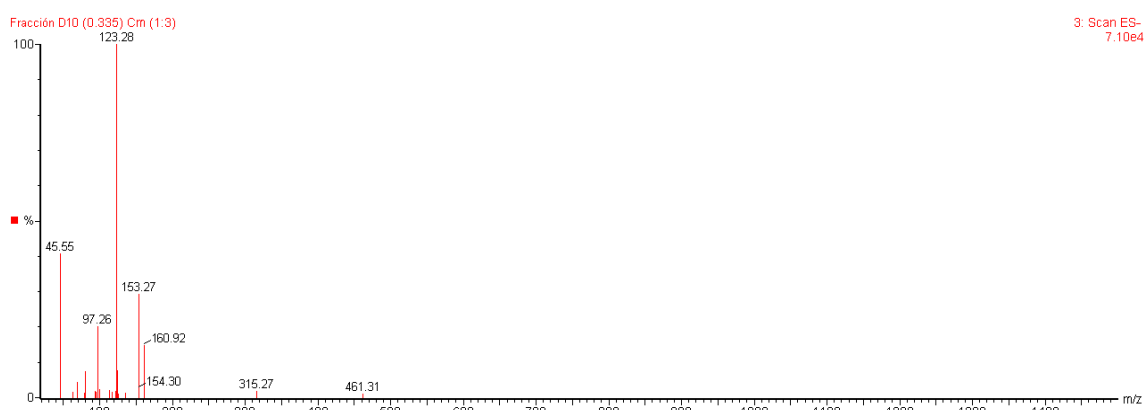


Figura 82. Estructura química propuesta y espectro de masas en modo ion negativo para la fracción D10.

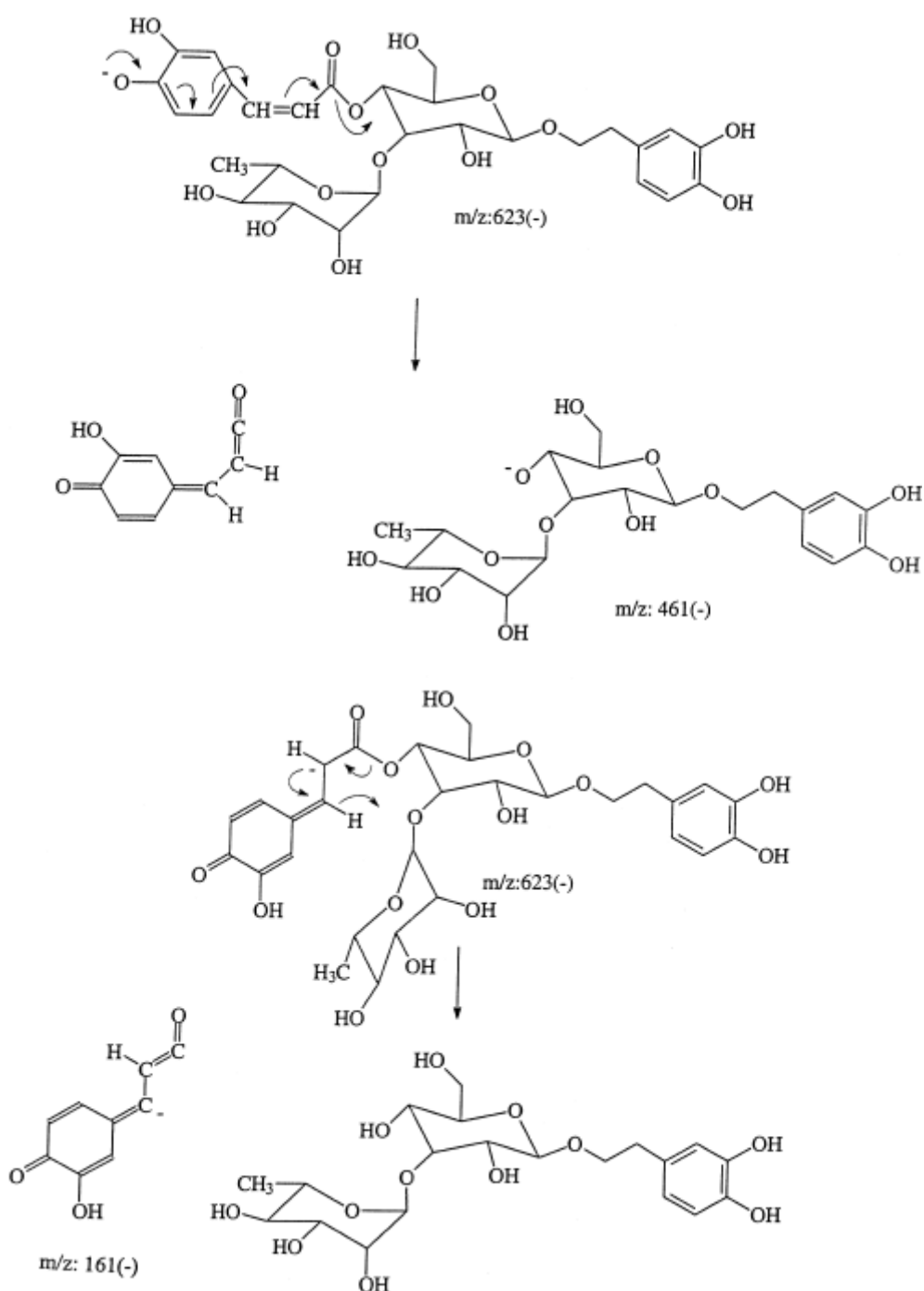


Figura 83. Esquema de fragmentación propuesto por [Ryan y col., 1999](#) en modo ion negativo para verbascósido en la fracción D10, donde se observa cómo se producen los iones de m/z 461 y 161.

El compuesto que eluye en la fracción E8, uno de los picos principales que se observa en el perfil de elución por cromatografía de exclusión molecular, muestra en modo ion negativo tres iones característicos de relación m/z 315, 153 y 123 correspondientes a glucósido de hidroxitirosol. Además de estos iones, en el espectro de masas en modo ion positivo es posible observar fragmentos aductos de sodio de relación m/z 339 y 501 correspondientes a la pérdida de una unidad de hexosa (la composición de azúcares de esta fracción es del 99,3 % de glucosa) a partir del aducto de sodio $[M+Na]^+$ de m/z 663. En la *Figura 84* se representa una estructura tentativa que se ajusta con las señales de RMN de 1H y ^{13}C del compuesto acetilado que se presentan en la *Figura 85* para y que se describe por primera vez.

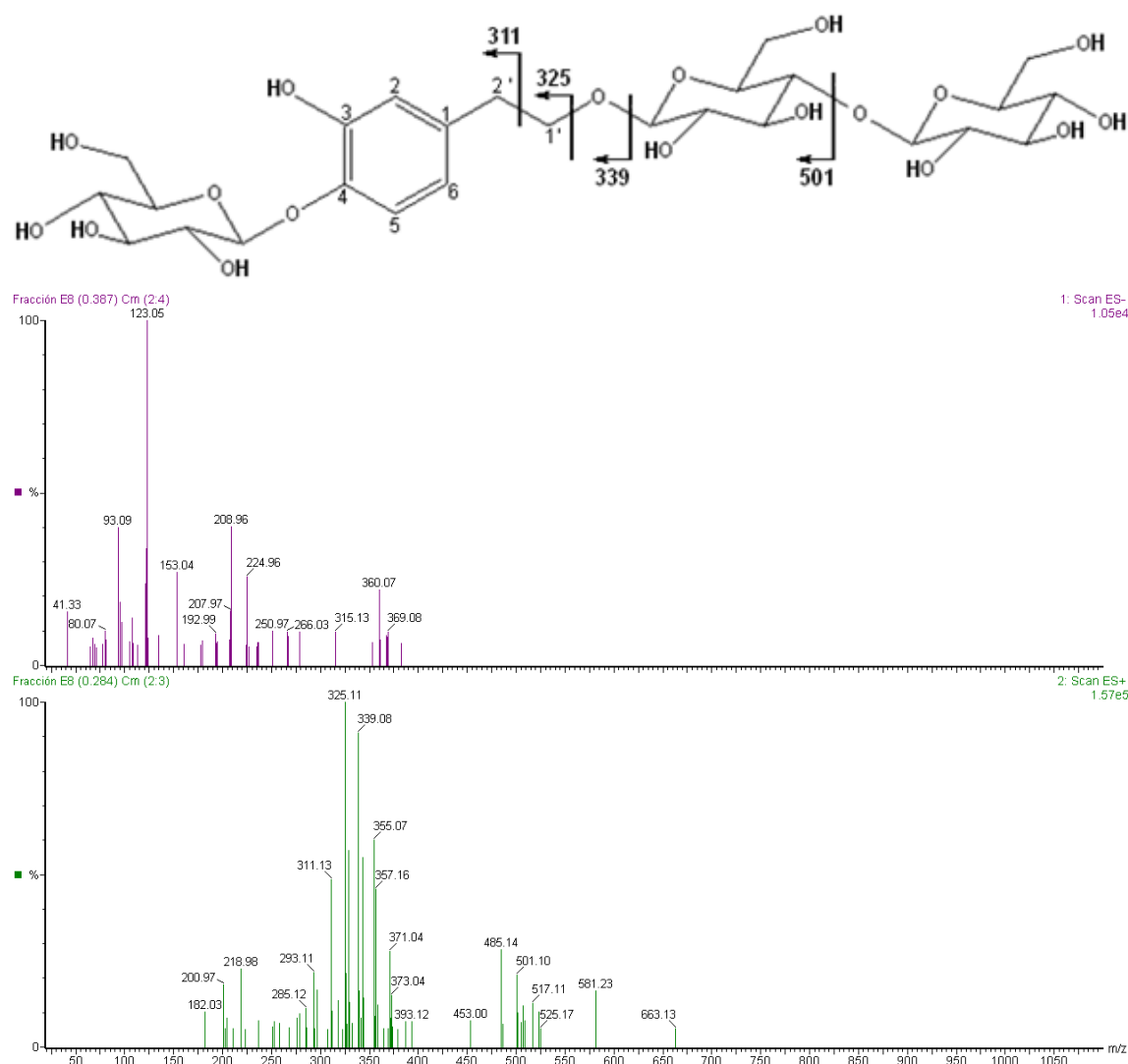


Figura 84. Espectros de masas en modo ion negativo (arriba) y positivo (abajo) obtenidos para la fracción E8. (Arriba) Estructura propuesta según el perfil de fragmentación observado (todos los iones representados son aductos de sodio).

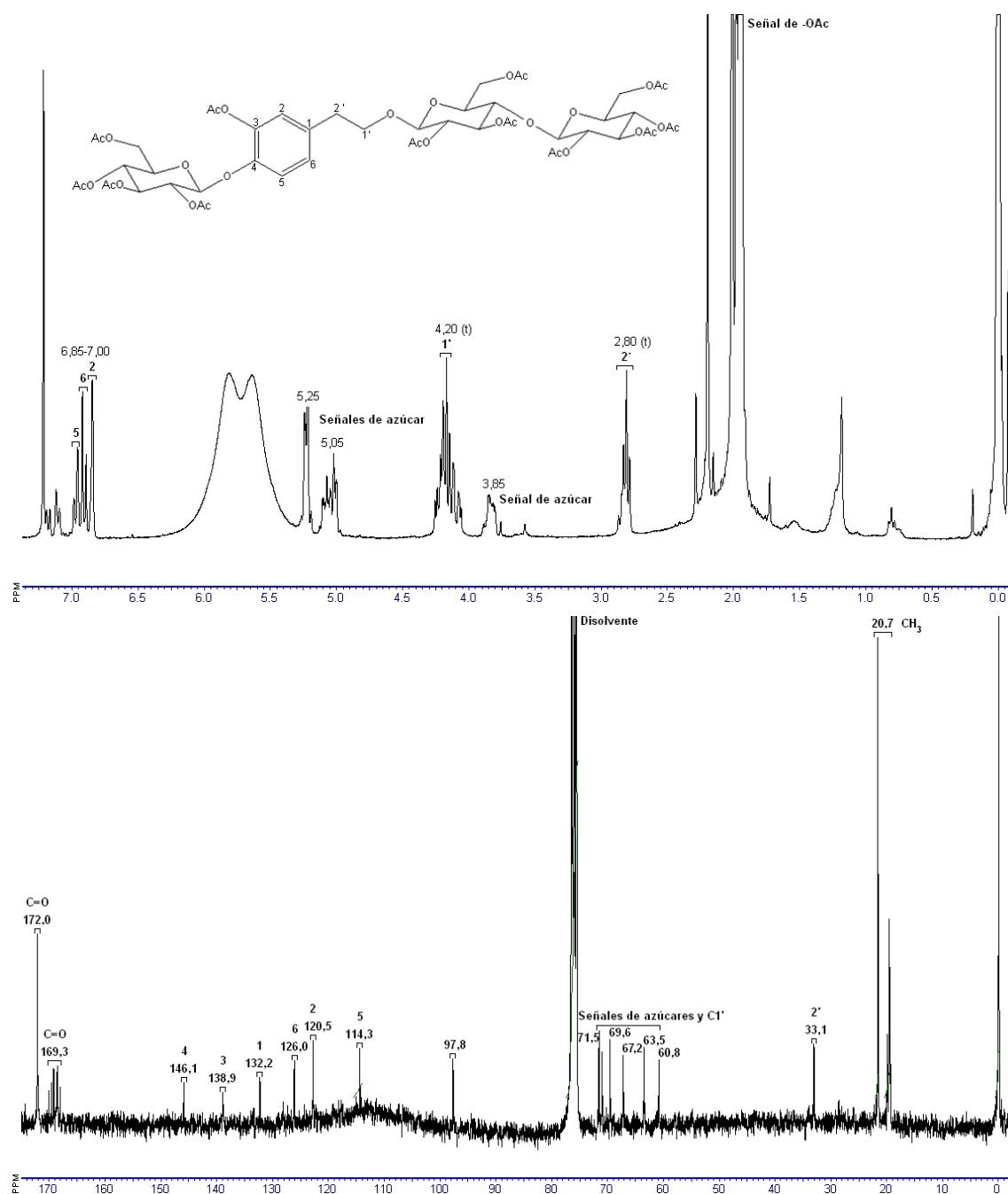


Figura 85. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (registrados a 300 y 75 MHz, respectivamente) obtenidos para la fracción E8 acetilada. Los desplazamientos químicos son relativos a TMS en CDCl_3 .

En los espectros de masas en los modos ion positivo y negativo de la fracción E9 (*Figura 86*) se observan los iones $[M+Na]^+$ de m/z 323 y $[M-H]^-$ de m/z 299, respectivamente, de glucósido de tirosol o salidroído. El ion $[M+Na]^+$ aparece como el más abundante en el espectro. El espectro de este glucósido fenólico en modo ion negativo proporciona también un fragmento característico de m/z 119. Los datos de desplazamientos químicos de RMN de 1H y ^{13}C que se muestran en la *Figura 87* del compuesto acetilado están de acuerdo con los datos que publican [Landtag y col., 2002](#) para este compuesto.

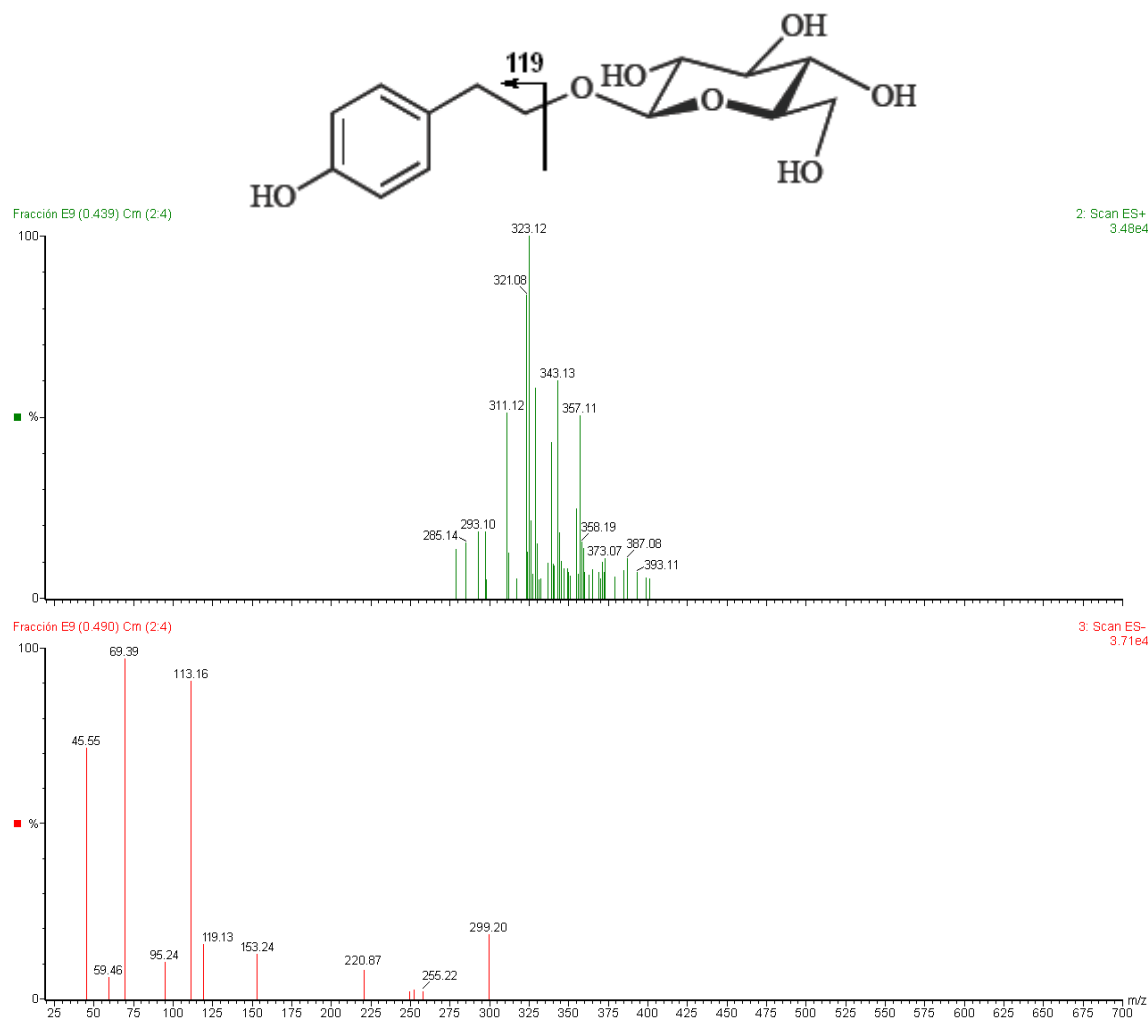


Figura 86. Espectros de masas en modo ion positivo (arriba) y negativo (abajo) obtenidos para la fracción E9.

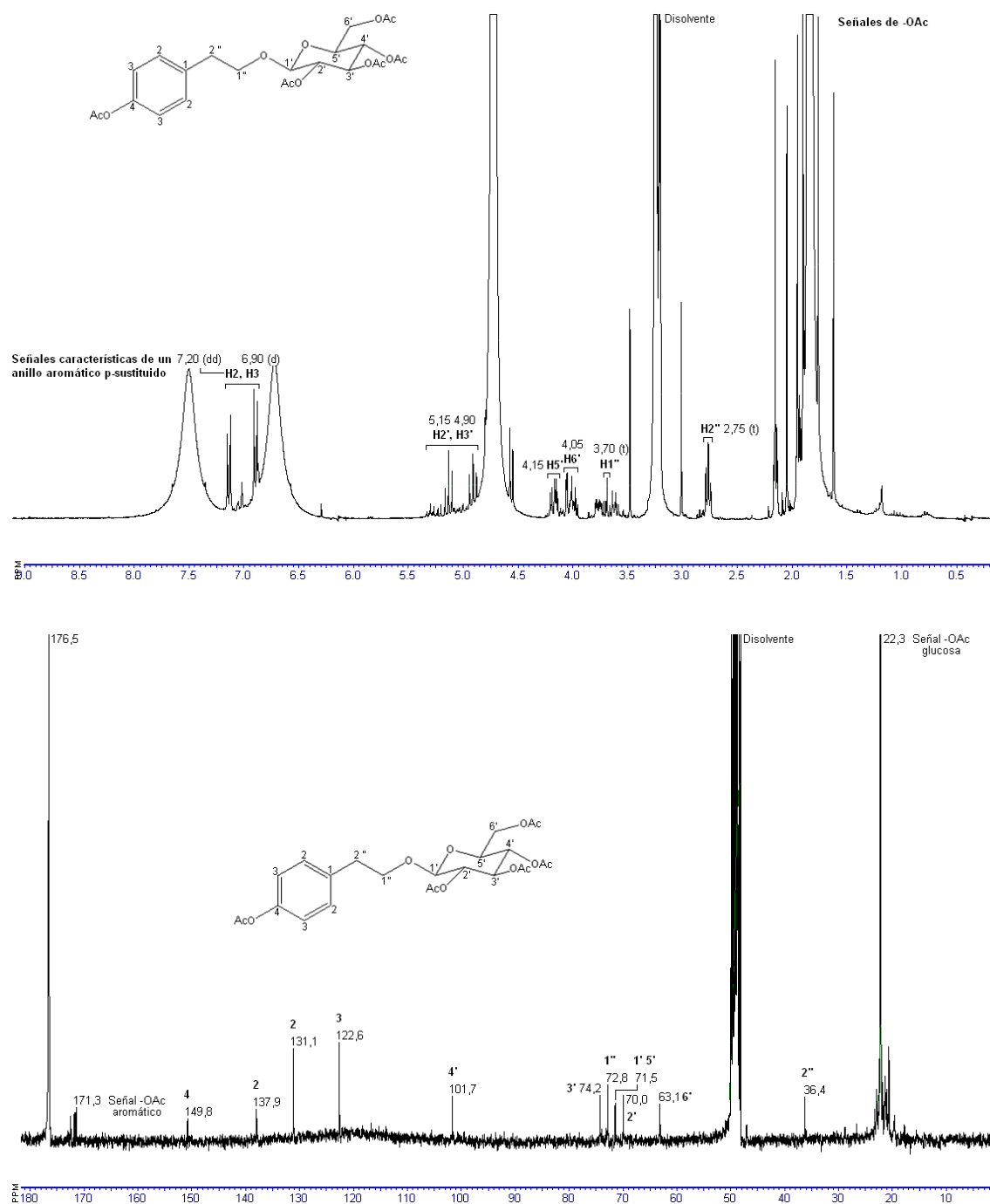


Figura 87. Espectros de RMN de ¹H y ¹³C (registrados a 300 y 75 MHz, respectivamente) para glucósido de tirosol detectado en la fracción E9 acetilada. Los desplazamientos químicos son relativos a TMS en CD₃OD.

El espectro modo ion negativo de las fracciones D11 y E10 (en la [Figura 88](#) se puede observar el espectro de masas de la fracción E10) muestra el perfil de fragmentación del glucósido de hidroxitirosol con el ion pseudomolecular $[M-H]^-$ de relación m/z 315 y sus principales fragmentos m/z 153 y 123, los cuales son debidos a la pérdida de glucosa y del grupo CH_2OH ([De la Torre-Carbot y col., 2005](#)) respectivamente, además de otros iones (m/z 111 y 95). Esto sugiere que podría ser identificado como tal este compuesto. Sin embargo, no hay datos disponibles para discernir el tipo de isómero, es decir, si la posición de sustitución del hidroxitirosol para la glucosa es en el hidroxilo alifático o en los hidroxilos fenólicos. Tres isómeros de glucósido de hidroxitirosol han sido descritos en la bibliografía ([Bianco y col., 1998](#); [Ryan y col., 2002b](#) y [Cardoso y col., 2005](#)): hidroxitirosol-4- β -glucósido, hidroxitirosol-3- β -glucósido e hidroxitirosol-1'- β -glucósido, si bien el 4- β ha sido encontrado como el más abundante en pulpa de aceituna, mientras que el 1'- β se ha identificado en pulpa y orujo.

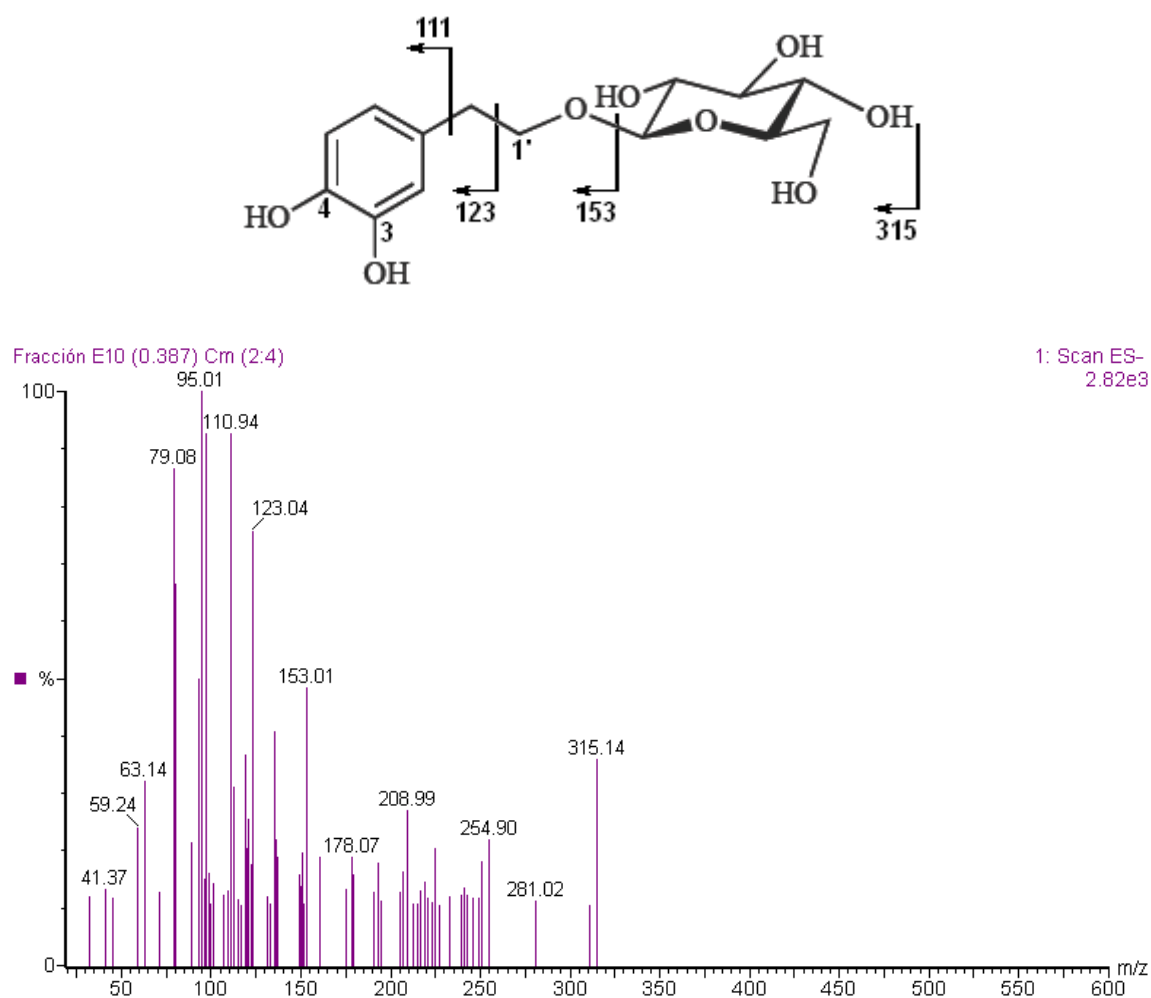


Figura 88. Estructura química del hidroxitirosol 1'- β -glucósido y espectro de masas en modo ion negativo de la fracción E10.

6.- CONCLUSIONES.

Primera. El nuevo reactor de tratamiento térmico permite el aprovechamiento del alperujo gracias a que facilita la separación en dos fases, sólida y líquida, y la liberación y solubilización de compuestos en esta última. La simplificación técnica respecto al sistema “steam explosion” y su nuevo diseño ha hecho posible, bajo patente, su puesta en marcha a nivel industrial.

Segunda. El estudio sobre el potente antioxidante natural DHFG ha llevado a su cuantificación mediante tratamientos térmicos a partir de alperujo y a determinar las condiciones óptimas para su recuperación. El DHFG ha sido cuantificado por primera vez como un compuesto fenólico importante en aceitunas de mesa procesadas naturalmente, convirtiéndolas en posible alimento funcional.

Tercera. El DHFG ha sido purificado por primera vez a nivel de planta piloto en grandes cantidades a partir de alperujo. El sistema diseñado y optimizado para su purificación se ha patentado y permite obtener de forma sencilla el compuesto con una pureza superior al 90 % en peso.

Cuarta. La actividad antioxidante del DHFG purificado es mayor que la del α -tocoferol y el BHT en ensayos *in vitro* de oxidación forzada de una matriz lipídica. El DHFG tiene una capacidad antioxidante *in vitro* más alta que el hidroxitirosol y una actividad similar al α -tocoferol en emulsión lipídica. El DHFG también ha mostrado su potencial como inhibidor de la agregación plaquetaria en ensayos *ex vivo*.

Quinta. El sistema de recuperación de compuestos volátiles del nuevo reactor de tratamiento térmico ha permitido la obtención y posterior identificación de los compuestos volátiles (alcoholes, aldehídos, ésteres) presentes en el alperujo u originados durante el tratamiento.

Sexta. El tratamiento térmico con vapor aumenta notablemente la concentración de los componentes minoritarios (alcoholes alifáticos y triterpénicos, escualeno, esteroides y tocoferoles) presentes en el aceite de orujo extraído, mejorando su valor nutricional y funcional y revalorizándolo.

Séptima. El tratamiento térmico con vapor produce la solubilización de los polisacáridos de la pared celular. Los métodos de hidrólisis que se han puesto a punto permiten la obtención de oligosacáridos neutros y ácidos con un DP entre 2 y 10 con posibles propiedades bioactivas. Se han aislado e identificado un grupo de compuestos basados en la unión de azúcares a un núcleo secoiridoide, identificado por primera vez en la aceituna, así como compuestos basados en la unión de los mismos (mono- y disacáridos) con compuestos fenólicos.

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la ayuda de muchas personas a las cuales quiero expresarles mi más sincera gratitud:

A los Drs. D. Juan Fernández-Bolaños Guzmán y D. Guillermo Rodríguez Gutiérrez por su dirección, ayuda, infinita paciencia y disposición en todo momento. Gracias por darme la oportunidad de formarme como investigador.

Al Dr. D. Fernando Romero Guzmán, como coordinador del Programa de Doctorado y a la Dra. Dña. Paloma Álvarez Mateos, del departamento de Ingeniería Química, por su labor y colaboración como tutora de este trabajo.

A todos los componentes del Grupo de Pared Celular, los Drs. D. Rafael Guillén, Dña. Ana Jiménez, Dña. Rocío Rodríguez y Dña. Sara Jaramillo por la ayuda y el apoyo mostrados a lo largo de la realización de este trabajo.

A mis compañeros de trabajo, los que fueron (José M. ^a Fuentes, Javier Tejero) y espero que vuelvan a ser, y los que son (Fátima Rubio, Sara Vázquez y Antonio Gómez). Gracias a Fátima Rubio por su trabajo en la recta final de esta tesis.

A las Dras. Dña. María Victoria Ruiz-Méndez y María del Carmen Pérez Camino por poner a mi disposición los medios y conocimientos para el análisis de componentes menores. A la Dra. Dña. Rosa Cert por su contribución en las medidas de actividad antioxidante. Al Dr. D. José Luis Espartero por su aportación en los estudios de RMN. Al Dr. D. David A. Gray mi tutor en el Departamento Food Science de la Universidad de Nottingham donde realicé el análisis de compuestos volátiles.

A la cooperativa Oleícola El Tejar por las facilidades prestadas en la toma de muestras.

Al Programa de Formación de Personal Investigador (FPI) y al proyecto AGL2005-00616 al que se adscribe la beca que ha financiado mi investigación.

A todos mis compañeros del Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa, por la colaboración y apoyo prestados siempre.

A mi familia y en especial a mis padres, con los que siempre puedo contar, porque ellos son los verdaderos artífices de que haya llegado hasta aquí, por su entrega, esfuerzo y sacrificio. Sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

Y muy especialmente a la persona que ha estado a mi lado compartiendo los buenos y malos momentos (MI NIÑA).

7.- BIBLIOGRAFÍA.

A

Abhuri, K. 2003. Adsorption of phenol and *p*-chlorophenol from their single and bisolute aqueous solutions on Amberlite XAD-16 resin. *Journal of Hazardous Materials*, **B105**, 143-156.

Akhtar, M., Blanchette, R. A., Myers, G., Kirk, T. K. An overview of biomechanical pulping research. En: *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*, pág. 309. Eds. Young, R. A., Akhtar, M., John Wiley: New York, 1998.

Alba, J., Hidalgo, F., Ruiz, M. A., Martínez, F., Moyano, M. J., Cert, A., Pérez, M. C., Ruiz, M. V. 1996. Características de los aceites de oliva de primera y segunda centrifugación. *Grasas y Aceites*, **47**, 163-181.

Alba, J. Elaboración del aceite de oliva virgen. En: *El cultivo del olivo*, págs. 678-679. Eds. Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L., Grupo Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, Madrid, 2008a.

Alba, J. Elaboración del aceite de oliva virgen. En: *El cultivo del olivo*, pág. 685. Eds. Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L., Grupo Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, Madrid, 2008b.

Alburquerque, J. A., González, J., García, D., Cegarra, J. 2007. Effects of a compost made from the solid by-product ("alperujo") of the two-phase centrifugation system for olive oil extraction and cotton gin waste on growth and nutrient content of ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Bioresource Technology*, **98**, 940-945.

Alcaide, E. M., Ruiz, D. Y., Moumen, A., García, I. M. 2003. Chemical composition and nitrogen availability for goats and sheep of some olive by-products. *Small Ruminant Research*, **49**, 329-336.

Allouche, N., Fki, I., Sayadi, S. 2004. Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 267-273.

Allouche, N., Sayadi, S. 2005. Synthesis of hydroxytyrosol, 2-hydroxyphenylacetic acid, and 3-hydroxyphenylacetic acid by differential conversion of tyrosol isomers using *Serratia marcescens* strain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 6525-6530.

Angerosa, F. 2002. Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**, 639-660.

Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., Montedoro, G. 2004. Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, **1054**, 17-31.

Antolín, G., Lara, A., Peran, J. R. 1997. Depuración y aprovechamiento integral de las aguas residuales de la industria del aceite de oliva (alpechín). *Información Tecnológica*, **8**, 95-102.

Antonopoulos, K., Valet, N., Spiratos, D., Siragakis, G. 2006. Olive oil and pomace olive oil processing. *Grasas y Aceites*, **57**, 56-67.

Aparicio, R., Morales, M. T., Alonso, V. 1997. Authentication of European virgin olive oils by their chemical compounds, sensory attributes, and consumers' attitudes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 1076-1083.

Apers, S., Huang, Y., Van Miert, S., Dommisse, R., Berghe, D. V., Pieters, L., Vlietinck, A. 2002. Characterisation of new oligoglycosidic compounds in two Chinese medicinal herbs. *Phytochemical Analysis*, **13**, 202-206.

Aragón, J. M., Palancar, M. C. Presente y futuro del alpeorujo, págs. 242-300. Ed. Complutense, S. A., Madrid, 2001.

Arroyo-López, F. N., Bautista-Gallego, J., Durán-Quintana, M. C., Rodríguez-Gómez, F., Romero-Barranco, C., Garrido-Fernández, A. 2008. Improvement of the storage process for cracked table olives. *Journal of Food Engineering*, **89**, 479-487.

Aruoma, O. I., Deiana, M., Jenner, A., Halliwell, B., Kaur, H., Banni, S., Corongiu, F. P., Dessí, M. A., Aeschbach, R. 1998. Effect of hydroxytyrosol found in extra virgin olive oil on oxidative DNA damage and on low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 5181-5187.

Aruoma, O. I. 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, **523-524**, 9-20.

Avellar, B. K., Glasser, W. G. 1998. Steam-assisted biomass fractionation. I. Process considerations and economic evaluation. *Biomass and Bioenergy*, **14**, 205-218.

B

Baddi, G. A., Cegarra, J., Merlina, G., Revel, J. C., Hafidi, M. 2009. Qualitative and quantitative evolution of polyphenolic compounds during composting of an olive-mill waste-wheat Straw mixture. *Journal of Hazardous Materials*, **165**, 1119-1123.

Bail, S., Stuebiger, G., Krist, S., Unterweger, H., Buchbauer, G. 2008. Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, **108**, 1122-1132.

Ballesteros, I., Oliva, J. M., Negro, M. J., Manzanares, P., Ballesteros, M. 2002. Ethanol production from olive oil extraction residue pretreated with hot water. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **98-100**, 717-732.

Bas, F. J., Colinet, M. J., Robles, S. Métodos de gestión en la eliminación de los orujos de aceitunas generados en la obtención del aceite de oliva. Jornadas de investigación y transferencia de tecnología al sector oleícola, Córdoba, 2002.

Battinelli, L., Daniele, C., Cristiani, M., Bisignano, G., Saija, A., Mazzanti, G. 2006. In vitro antifungal and anti-elastase activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. fruit. *Phytomedicine*, **13**, 558-563.

Baumeister, A., Vogelmann, S., Fischer, L. 2003. Concentration and purification of orotic acid directly from whey with an expanded bed adsorption system. *Journal of Chromatography A*, **1006**, 261-265.

Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., Del Rio, J. A. 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, **68**, 457-462.

Benincasa, C., De Nino, A., Lombardo, N., Perri, E., Sindona, G., Tagarelli, A. 2003. Assay of aroma active components of virgin olive oils from southern Italian regions by SPME-GC/Ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 733-741.

Beverungen, C., Rull Prous, S., Kempers, P., Buchwald-Werner, S. 2005. Process for obtaining hydroxytyrosol from olive leaves extracts. *European Patent Application*, EP 1 582 512 A1.

Bianchi, G., Pozzi, N. 1994. 3,4-Dihydroxyphenylglycol, a major C₆-C₂ phenolic in *Olea europaea* fruits. *Phytochemistry*, **35**, 1335-1337.

- Bianchi, G. 2003. Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **105**, 229-242.
- Bianco, A., Mazzei, R. A., Melchioni, C., Romeo, G., Scarpati, M. L., Soriero, A., Uccella, N. 1998. Microcomponents of olive oil-III. Glucosides of 2(3,4-dihydroxy-phenyl)ethanol. *Food Chemistry*, **63**, 461-464.
- Biedermann, M., Bongartz, A., Mariani, C., Grob, K. 2008. Fatty acid methyl and ethyl esters as well as wax esters for evaluating the quality of olive oils. *European Food Research and Technology*, **228**, 65-74.
- Bielecka, M., Biedrzycka, E., Majkowska, A., Juśkiewicz, J., Wróblewska, M. 2002. Effect of non-digestible oligosaccharides on gut microecosystem in rats. *Food Research International*, **35**, 139-144.
- Bisignano, G., Laganà, M. G., Trombetta, D., Arena, S., Nostro, A., Uccella, N., Mazzanti, G., Saija, A. 2001. In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. *FEMS Microbiology Letters*, **198**, 9-13.
- Bitler C. M., Viale, T. M., Damaj, B., Crea, R. 2005. Hydrolyzed olive vegetation water in mice has anti-inflammatory activity. *The Journal of Nutrition*, **135**, 1475-1479.
- Blake, J. D., Richards, G. N. 1968. Problems of lactonisation in the analysis of uronic acids. *Carbohydrate Research*, **8**, 275-281.
- Blekas, G., Vassilakis, C., Harizanis, C., Tsimidou, M., Boskou, D. G. 2002. Biophenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3688-3692.
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. 1974. An automated quantitative assay for uronic acids. *Biochemical Medicine*, **11**, 60-66.
- Bogani, P., Galli, C., Villa, M., Visioli, F. 2007. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis*, **190**, 181-186.
- Bonanome, A., Pagnan, A., Caruso, D., Toia, A., Xamin, A., Fedeli, E., Berra, B., Zamburlini, A., Ursini, F., Galli, G. 2000. Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **10**, 111-120.
- Bondioli, P. 2006. Refining by-products as a source of compounds of high-added value. *Grasas y Aceites*, **57**, 116-125.

Boskou, G., Salta, F. N., Chrysostomou, S., Mylona, A., Chiou, A., Andrikopoulos, N. K. 2006. Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry*, **94**, 558-564.

Brenes, M., García, A., García, P., Ríos, J. J., Garrido, A. 1999. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3535-3540.

Brenes, M., García, A., Ríos, J. J., García, P., Garrido, A. 2002. Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *International Journal of Food Science and Technology*, **37**, 615-625.

Brenes, M., de Castro, A. 2003. Obtención de sustancias antioxidantes a partir de soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa. *Oficina Española de Patentes y Marcas*, ES 2 186 467 A1.

Briante, R., Febbraio, F., Nucci, R. 2004. Antioxidant/Prooxidant effects of dietary non-flavonoid phenols on the Cu²⁺-induced oxidation of human low-density lipoprotein (LDL). *Chemistry and Biodiversity*, **1**, 1716-1729.

Budiyanto, A., Ahmed, N. U., Wu, A., Bito, T., Nikaido, O., Osawa, T., Ueda, M., Ichihashi, M. 2000. Protective effect of topically applied olive oil against photocarcinogenesis following UVB exposure of mice. *Carcinogenesis*, **21**, 2085-2090.

Burghoff, B., Goetheer, E. L. V., de Haan, A. B. 2008. Solvent impregnated resins for the removal of low concentration phenol from water. *Reactive & Functional Polymers*, **68**, 1314-1324.

C

Cano, E., Veiga, M., Jiménez C., Riguera, R. 1990. Pharmacological effects of three phenylpropanoid glycosides from *Mussatia*. *Planta Medica*, **56**, 24-26.

Capasso, R., Evidente, A., Avolio, S., Solla, F. 1999. A highly convenient synthesis of hydroxytyrosol and its recovery from agricultural waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 1745-1748.

Cardoso, S. M., Coimbra, M. A., Lopes da Silva, J. A. 2003. Calcium-mediated gelation of an olive pomace pectic extract. *Carbohydrate Polymers*, **52**, 125-133.

Cardoso, S. M., Guyot, S., Marnet, N., Lopes-da-Silva, J. A., Renard, C. M. G. C., Coimbra, M. A. 2005. Characterisation of phenolic extracts from olive pomace by electrospray mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**, 21-32.

Carpita, N. C., Gibeaut, D. M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, **3**, 1-30.

Caruso, D., Colombo, R., Patelli, R., Giavarini, F., Galli, F. 2000. Rapid evaluation of phenolic component profile and analysis of oleuropein aglycon in olive oil by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (APCI-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 1182-1185.

Castro, F. B., Hotten, P. M., Ørskov, E. R. 1994. Inhibition of rumen microbes by compounds formed in the steam treatment of wheat straw. *Bioresource Technology*, **50**, 25-30.

Cegarra, J., Amor, J. B., González, J., Bernal, M. P., Roig, A. 2000. Characteristics of a new solid olive-mill by-product ("alperujo") and its suitability for composting. *Proceedings of the International Composting Symposium*, **1**, 124-140.

Celma, A. R., Rodríguez, F. M., Abdulla, A. A. 2002. Tratamiento energético de alperujos. *Energía: Ingeniería energética y medioambiental*, **162**, 95-100.

Chai, W., Lawson, A. M., Piskarev, V. 2002. Branching pattern and sequence analysis of underivatized oligosaccharides by combined MS/MS of singly and doubly charged molecular ions in negative-ion electrospray mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **13**, 670-679.

Coimbra, M. A., Waldron, K. W., Selvendran, R. R. 1994. Isolation and characterisation of cell wall polymers from olive pulp (*Olea europaea* L.). *Carbohydrate Research*, **252**, 245-262.

Covas, M. I., de la Torre, K., Farré-Albaladejo, M., Kaikkonen, J., Fitó, M., López-Sabater, C., Pujadas-Bastardes, M. A., Joglar, J., Weinbrenner, T., Lamuela-Raventós, R. M., de la Torre, R. 2006. Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, **40**, 608-616.

Covas, M. I. 2007. Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacological Research*, **55**, 175-186.

Crea, R. 2002. Method of obtaining a hydroxytyrosol-rich composition from vegetation water. *United States Patent*, US 6,416,808 B1.

Crea, R. Hydroxytyrosol-rich composition from olive vegetation water and method of use thereof. *United States Patent*, US 2003/0108651 A1.

Crea, R., Caglioti, L. 2005. Water-soluble extract from olives. *United States Patent*, US 6,936,287 B1.

Crea, R. 2008. Method of obtaining a hydroxytyrosol-rich composition from vegetation water. *United States Patent*, US 2008/0090000 A1.

Crook, E. H., McDonnell, R. P., McNulty, J. T. 1975. Removal and recovery of phenols from industrial waste effluents with Amberlite polymeric adsorbents. *Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development*, **14**, 113-118.

Cuomo, J., Rabovskiy, A. B. 2002. Antioxidant compositions extracted from a wastewater from olive oil production. *United States Patent* US 6,361,803 B1.

D

Dale, B. E., Moreira, M. J. 1982. A freeze-explosion technique for increasing cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, supplement **12**, 31-43.

D'Angelo, S., Ingrosso, D., Migliardi, V., Sorrentino, A., Donnarumma, G., Baroni, A., Masella, L., Tufano, M. A., Zappia, M., Galletti, P. 2005. Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radical Biology & Medicine*, **38**, 908-919.

Deiana, M., Rosa, A., Corona, G., Atzeri, A., Incani, A., Visioli, F., Melis, M. P., Dessì, M. A. 2007. Protective effect of olive oil minor polar components against oxidative damage in rats treated with ferric-nitritotriacetate. *Food and Chemical Toxicology*, **45**, 2434-2440.

De la Cruz Cortés, J. P., González Correa, J. A., Sánchez de la Cuesta y Alarcón, F. 2006. Use of hydroxytyrosol in the prevention and treatment of cerebral ischemic stroke. WO 2006/114467 A1.

De la Puerta, R., Ruiz Gutiérrez, V., Hout, J. R. S. 1999. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochemical Pharmacology*, **57**, 445-449.

De la Puerta, R., Márquez-Martín, A., Fernández-Arche, A., Ruiz-Gutiérrez, V. 2009. Influence of dietary fat on oxidative stress and inflammation in murine macrophages. *Nutrition*, **25**, 548-554.

De la Torre-Carbot, K., Jáuregui, O., Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., López-Sabater, M. C. 2005. Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 4331-4340.

DellaGreca, M., Previtera, L., Temussi, F., Zarrelli, A. 2004. Low-molecular-weight components of olive oil mill waste-waters. *Phytochemical Analysis*, **15**, 184-188.

Deosarkar, S. P., Pangarkar, V. G. 2004. Adsorptive separation and recovery of organics from PHBA and SA plants effluents. *Separation and Purification Technology*, **38**, 241-254.

Deschamps, F. C., Ramos, L. P., Fontana, J. D. 1996. Pretreatment of sugar cane bagasse for enhanced ruminal digestion. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **57-8**, 171-182.

Díaz, A. M., Abad, M. J., Fernández, L., Silván, A. M., De Santos, J., Bermejo, P. 2004. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scorodonia*: In vitro anti-inflammatory activity. *Life Sciences*, **74**, 2515-2526.

Di Donna, L., Mazzotti, F., Napoli, A., Salerno, R., Sajjad, A., Sindona, G. 2007. Secondary metabolism of olive secoiridoids. New microcomponents detected in drupes by electrospray ionization and high-resolution tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **21**, 273-278.

Dinda, B., Debnath, S., Harigaya, Y. 2007. Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. A Review, Part 2. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **55**, 689-728.

Dische, Z. Color reactions of carbohydrates. En: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, págs. 477-512. Eds. Whistler, R. L., Wolfrom, M. L., Academic Press, New York, 1962.

Domon, B., Costello, C. E. 1988. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J*, **5**, 397-409.

Duff, S. J. B., Murray, W. D. 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, **55**, 1-33.

E

Englyst, H. N., Cummings, J. H. 1984. Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*, **109**, 937-942.

Eriksson, K. E., Grunewald, A., Nilsson, T., Vallander, L. 1980. A scanning electron-microscopy study of the growth and attack on wood by 3 white-rot fungi and their cellulase-less mutants. *Holzforschung*, **34**, 207-213.

Espín, J. C., Soler-Rivas, C., Cantos, E., Tomás-Barberán, F. A., Wichers, H. J. 2001. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 1187-1193.

Evagelia, T., Harris, N. L., Konstantinos, B. P. Olive mill wastewater treatment. En: Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry, págs. 133-154. Eds. Oreopoulou, V., Russ, W., Springer, New York, 2006.

E

Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Montedoro, G. F., Morozzi, G. 2002. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *European Journal of Cancer Prevention*, **11**, 351-358.

Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Selvaggini, R., Montedoro, G. F., Di Saverio, C., Morozzi, G. 2006. Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *The Journal of Nutrition*, **136**, 614-619.

Felizón, B., Fernández-Bolaños, J., Heredia, A., Guillén, R. 2000. Steam-explosion pretreatment of olive cake. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **77**, 15-22.

Fernández-Arche, A., Márquez-Martín, A., de la Puerta Vázquez, R., Perona, J. S., Terencio, C., Pérez-Camino, C., Ruiz-Gutiérrez, V. 2009. Long-chain fatty alcohols from pomace olive oil modulate the release of proinflammatory mediators. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **20**, 155-162.

Fernández-Bolaños, J., Felizón, B., Heredia, A., Guillén, R., Jiménez, A. 1999. Characterization of the lignin obtained by alkaline delignification and of the cellulose residue from steam-exploded olive stones. *Bioresource Technology*, **68**, 121-132.

Fernández-Bolaños, J., Felizón, B., Heredia, A., Rodríguez, R., Guillén, R., Jiménez, A. 2001. Steam-explosion of olive stones: hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresource Technology*, **79**, 53-61.

Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillén, R., Jiménez, A. 2002a. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "alperujo". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 6804-6811.

Fernández-Bolaños Guzmán, J., Heredia Moreno, A., Rodríguez Gutiérrez, G., Rodríguez Arcos, R., Jiménez Araujo, A., Guillén Bejarano, R. 2002b. Mejoras introducidas en la patente principal nº 200002422 relativa a un procedimiento de obtención de hidroxitirosol purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo. ES 2 177 457 A1.

Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Gómez, E., Guillén, R., Jiménez, A., Heredia, A., Rodríguez, R. 2004. Total recovery of the waste of two-phase olive oil processing: Isolation of added-value compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 5849-5855.

Fernández-Bolaños Guzmán, J., Guillén Bejarano, R., Jiménez Araujo, A., Rodríguez Arcos, R., Rodríguez Gutiérrez, G., Lama Muñoz, A. 2010. Procedimiento de purificación de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) a partir de productos vegetales. ES 2 341 526 A1.

Fitó, M., Cladellas, M., de la Torre, R., Martí, J., Muñoz, D., Schröder, H., Alcántara, M., Pujadas-Bastardes, M., Marrugat, J., López-Sabater, M. C., Bruguera, J., Covas, M. I and the members of the SOLOS Investigators. 2008. Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, **62**, 570-574.

Fki, I., Allouche, N., Sayadi, S. 2005. The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*, **93**, 197-204.

Flamini, G., Cioni, P. L., Morelli, I. 2003. Volatiles from leaves, fruits, and virgin oil from *Olea europaea* Cv. Olivastra Seggianese from Italy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 1382-1386.

Furcht, P. W., Silla, H. 1990. Comparison of simultaneous wet milling and enzymatic hydrolysis of cellulose in ball and attrition mill reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **35**, 630-645.

G

Gámez, O. R., Díaz, M. S. 2008. Poligalacturonasas de levaduras: un producto biotecnológico de grandes potencialidades. *Tecnología Química*, **28**, 80-90.

Ganan, M., Collins, M., Rastall, R., Hotchkiss, A. T., Chau, H. K., Carrascosa, A. V., Martínez-Rodríguez, A. J. 2010. Inhibition by pectic oligosaccharides of the invasion of undifferentiated and differentiated Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Food Microbiology*, **137**, 181-185.

Gao, J. J., Igalashi, K., Nukina, M. 1999. Radical scavenging activity of phenylpropanoid glycosides in *Caryopteris incana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **63**, 983-988.

García, H. F., Martín, J. F., Rodríguez, J. J. 1984. Posibilidades de aprovechamiento de la lignina en la industria química. *Ingeniería Química*, **10**, 249-254.

García, A., Brenes, M., Dobarganes, M. C., Romero, C., Ruiz-Méndez, M. V. 2008. Enrichment of pomace olive oil in triterpenic acids during storage of "Alpeorajo" olive paste. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **110**, 1136-1141.

García Berenguer, A. Multiplicación del olivo. En: Olivicultura y elaiotecnia, pág. 56. Eds. Piedra, A. P., de la Colina, J. C., Martín, M. L. S., Universidad de Castilla-La Mancha, Cuenca, 1995.

Garna, H., Mabon, N., Wathelet, B., Paquot, M. 2004. New method for a two-step hydrolysis and chromatographic analysis of pectin neutral sugar chains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 4652-4659.

Garna, H., Mabon, N., Nott, K., Wathelet, B., Paquot, M. 2006. Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. *Food Chemistry*, **96**, 477-484.

Garrido Fernández, A., Fernández Díez, M. J., Adams, M. R. Table olives, production and processing, pág. 20. Ed. Chapman and Hall, Londres, 1997.

Garrote, G., Cruz, J. M., Domínguez, H., Parajó, J. C. 2003. Valorisation of waste fractions from autohydrolysis of selected lignocellulosic materials. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **78**, 392-398.

Garrote, G., Falqué, E., Domínguez, H., Parajó, J. C. 2007. Autohydrolysis of agricultural residues: Study of reaction byproducts. *Bioresource Technology*, **98**, 1951-1957.

Gerber, M. Olive oil and cancer. *Epidemiology of diet and cancer*, págs. 263-275. Eds. Hill, M. J., Giacosa, A., Caygill, C. P. G., Chichester, 1994.

Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, **125**, 1401-1412.

Ghosh, P., Singh, A. 1993. Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass. *Advances in Applied Microbiology*, **39**, 295-333.

Gomes, T., Caponio, F. 1997. Evaluation of the state of oxidation of crude olive-pomace oils. Influence of olive-pomace drying and oil extraction with solvent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 1381-1384.

Gomes, T., Caponio, F. 1998. Evaluation of the state of oxidation of olive-pomace oils. Influence of the refining process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 1137-1142.

Gómez-Coronado, D. J. M., Ibañez, E., Rupérez, F. J., Barbas, C. 2004. Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin. *Journal of Chromatography A*, **1054**, 227-233.

Gomis, D. B., Tamayo, D. M., Alonso, J. M. 2001. Determination of monosaccharides in cider by reversed-phase liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **436**, 173-180.

González-Muñoz, M. J., Luque, S., Álvarez, J. R., Coca, J. 2003. Recovery of phenol from aqueous solutions using hollow fibre contactors. *Journal of Membrane Science*, **213**, 181-193.

Goya, L., Mateos, R., Bravo, L. 2007. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells - Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *European Journal of Nutrition*, **46**, 70-78.

Grethlein, H. E., Converse, A. O. 1991. Common aspects of acid prehydrolysis and steam explosion for pretreating wood. *Bioresource. Technology*, **36**, 77-82.

Guillén, N., Acín, S., Navarro, M. A., Perona, J. S., Arbonés-Mainar, J. M., Arnal, C., Sarría, A. J., Surra, J. C., Carnicer, R., Orman, I., Segovia, J. C., Ruiz-Gutiérrez, V., Osada, J. 2008. Squalene in a sex-dependent manner modulates atherosclerotic lesion which correlates with hepatic fat content in apoE-knockout male mice. *Atherosclerosis*, **197**, 72-83.

Gutiérrez, F., Varona, I., Albi, M. A. 2000. Relation of acidity and sensory quality with sterol content of olive oil from stored fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 1106-1110.

Gutiérrez, V. R., Juan, M. E., Cert, A., Planas, J. M. 2000. Determination of hydroxytyrosol in plasma by HPLC. *Analytical Chemistry*, **72**, 4458-4461.

Gutiérrez, V. R., de la Puerta, R., Catalá, A. 2001. The effect of tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein on the non-enzymatic lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **217**, 35-41.

H

Harput, Ü. Ş., Çaliş, İ., Saracoğlu, İ., Dönmez, A. A., Nagatsu, A. 2006. Secondary metabolites from *Phlomis syriaca* and their antioxidant activities. *Turkish Journal of Chemistry*, **30**, 383-390.

Harvey, D. J. 2000. Collision-induced fragmentation of underivatized *N*-linked carbohydrates ionized by electrospray. *Journal of Mass Spectrometry*, **35**, 1178-1190.

Hendriks, A. T. W. M., Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, **100**, 10-18.

Hensley, K., Benaksas, E. J., Bolli, R., Comp, P., Grammas, P., Hamdheydari, L., Mou, S., Pye, Q. N., Stoddard, M. F., Wallis, G., Williamson, K. S., West, M., Wechter, W. J., Floyd, R. A. 2004. New perspectives on vitamin E: γ -tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radical Biology & Medicine*, **36**, 1-15.

Higashi, N., Omori, F., Monobe, T., Komiya, J., Kunieda, S., Emura, M., Nishizawa, Y., Ishizuka, T., Ariyoshi, T. 2004. Tobacco odor deodorizing perfume composition, tobacco odor deodorant, cigarette low in sidestream smoke odor, and tobacco package. US 2004/0221858 A1.

Hirano, M., Yoshimura, M., Yamada, K., Ikenishi, T. 2005. Tooth paste composition. JP 2005187360.

Hsu, C. K., Liao, J. W., Chung, Y. C., Hsieh, C. P., Chan, Y. C. 2004. Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats. *The Journal of Nutrition*, **134**, 1523-1528.

Hubicki, Z., Jakowicz, A., Łodyga, A. 1999. Application of the ion-exchange method to remove metallic ions from waters and sewages. *Studies in Surface Science and Catalysis*, **120**, Part 2, 497-531.

Huisman, M. M. H., Schols, H. A., Voragen, A. G. J. 1996. Changes in cell wall polysaccharides from ripening olive fruits. *Carbohydrate Polymers*, **31**, 123-133.

I

Ibarra, A., Sniderman, N. 2005. Obtaining olive polyphenol concentrate from a by-product of olive oil extraction using membrane separation techniques. *UK Patent Application*, GB 2 415 136 A.

Innocenti, M., la Marca, G., Malvagia, S., Giaccherini, C., Vincieri, F. F., Mulinacci, N. 2006. Electrospray ionisation tandem mass spectrometric investigation of phenylpropanoids and secoiridoids from solid olive residue. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **20**, 2013-2022.

Inoue, M., Sakuma, Z., Ogihara, Y., Saracoglu, I. 1998. Induction of apoptotic cell death in HL-60 cells by acteoside, a phenylpropanoid glycoside. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **21**, 81-83.

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Regulation n° 2432. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 7th Edition, 1st Supplement. Pergamon Press, Oxford, 1992.

Izumi, Y., Azumi, N., Kido, Y., Nakabo, Y. 2004. Oral preparations for atopic dermatitis containing acidic xylo-oligosaccharides. JP 2004210666.

J

Jakobsons, J., Hortling, B., Erins, P., Sundquist, J. 1995. Characterization of alkali-soluble fraction of steam exploded birch wood. *Holzforschung*, **49**, 51-59.

Jensen, S. R., Franzyk, H., Wallander, E. 2002. Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry*, **60**, 213-231.

Jiménez, A., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J., Heredia, A. 1994. Cell-wall composition of olives. *Journal of Food Science*, **59**, 1192-1196.

Jiménez, A., Rodríguez, R., Fernández-Caro, I., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J., Heredia, A. 2001a. Olive fruit cell wall: Degradation of cellulosic and hemicellulosic polysaccharides during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 2008-2013.

Jiménez, A., Rodríguez, R., Fernández-Caro, I., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J., Heredia, A. 2001b. Olive fruit cell wall: Degradation of pectic polysaccharides during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 409-415.

Jiménez-Escrig, A., Santos-Hidalgo, A. B., Saura-Calixto, F. 2006. Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 3462-3471.

Johannisbauer, W., Bonakdar, M., Richard-Elsner, C. 2003. Procedimiento para el aislamiento de antioxidantes. ES 2 231 635 T3.

Ju, J., Picinich, S. C., Yang, Z., Zhao, Y., Suh, N., Kong, Ah-Ng, Yang, C. S. 2010. Cancer-preventive activities of tocopherols and tocotrienols. *Carcinogenesis*, **31**, 533-542.

K

Kaar, W. E., Gutiérrez, C.V., Kinoshita, C. M. 1998. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, **14**, 277-287.

Kabel, M. A., Carneiro, F., Garrote, G., Avgerinos, E., Koukios, E., Parajó, J. C., Gírio, F. M., Schols, H. A., Voragen, A. G. J. 2002. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, **50**, 47-56.

Kafkas, E., Cabaroğlu, T., Selli, S., Bozdoğan, A., Kürkçüoğlu, M., Paydaş, S., Başer, K. H. C. 2006. Identification of volatile aroma compounds of strawberry wine using solid-phase microextraction techniques coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Flavour and Fragrance Journal*, **21**, 68-71.

Kaufhold, J., Hammon, H. M., Blum, J. W. 2000. Fructo-oligosaccharide supplementation: effects on metabolic, endocrine and haematological traits in veal calves. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, **47**, 17-29.

Kikuchi, M., Yamauchi, Y. 1985. Studies on the constituents of *Ligustrum* species. XI. On secoiridoids of the fruits of *Ligustrum japonicum* THUNB. and *L. lucidum* AIT. *Yakugaku Zasshi*, **105**, 142-147.

Kim, H. J., Woo, E. R., Shin, C. G., Hwang, D. J., Park, H., Lee, Y. S. 2001. HIV-1 integrase inhibitory phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotomum*. *Archives of Pharmacal Research*, **24**, 286-291.

Kim, J., Seo, S., Lee, S., Shin, S., Park, I. 2008. Nematicidal activity of plant essential oils and components from Coriander (*Coriandrum sativum*), Oriental Sweetgum (*Liquidambar orientalis*), and Valerian (*Valeriana wallichii*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 7316-7320.

Kiritsakis, A. K. 1998. Flavor components of olive oil-A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **75**, 673-681.

Koo, K. A., Kim, S. H., Oh, T. H., Kim, Y. C. 2006. Acteoside and its aglycones protect primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced excitotoxicity. *Life Sciences*, **79**, 709-716.

Košíková, B., Ebringerová, A., Kacuraková, M. 1995. Effect of steaming on the solubility and structural changes of wood lignin-polysaccharide complex. *Cellulose Chemistry and Technology*, **29**, 683-690.

Ku, Y., Jansen, O., Oles, C. J., Lazar, E. Z., Rader, J. I. 2003. Precipitation of inulins and oligoglucoses by ethanol and other solvents. *Food Chemistry*, **81**, 125-132.

Kubo, A., Lunde, C. S., Kubo, I. 1995. Antimicrobial activity of the olive oil flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 1629-1633.

Kubo, I., Kinst-Hori, I. 1999. Tyrosinase inhibitory activity of the olive oil flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 4574-4578.

Kurosumi, A., Sasaki, C., Kumada, K., Kobayashi, F., Mtui, G., Nakamura, Y. 2007. Novel extraction method of antioxidant compounds from *Sasa palmata* (Bean) Nakai using steam explosion. *Process Biochemistry*, **42**, 1449-1453.

L

Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M. E., Gardini, F. 2004. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science & Technology*, **15**, 201-208.

Landtag, J., Baumert, A., Degenkolb, T., Schmidt, J., Wray, V., Scheel, D., Strack, D., Rosahl, S. 2002. Accumulation of tirosol glucoside in transgenic potato plants expressing a parsley tyrosine decarboxylase. *Phytochemistry*, **60**, 683-689.

Lanzón, A., Albi, T., Cert, A., Gracián, J. The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **71**, 285-291.

Larsen, A. G., Knøchel, S. 1997. Antimicrobial activity of food-related *Penicillium sp.* against pathogenic bacteria in laboratory media and a cheese model system. *Journal of Applied Microbiology*, **83**, 111-119.

Le Goff, A., Renard, C. M. G. C., Bonnin, E., Thibault, J-F. 2001. Extraction, purification and chemical characterization of xylogalacturonans from peal hulls. *Carbohydrate Polymers*, **45**, 325-334.

Lee-Huang, S., Huang, P. L., Zhang, D., Lee, J. W., Bao, J., Sun, Y., Chang, Y. T., Zhang, J., Huang, P. L. 2007a. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. Integrase inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **354**, 872-878.

Lee-Huang, S., Huang, P. L., Zhang, D., Lee, J. W., Bao, J., Sun, Y., Chang, Y-T. Zhang, J., Huang, P. L. 2007b. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part II. Integrase inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **354**, 879-884.

Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J-C., Lorquin, J., Delattre, M., Simon, J-L., Asther, M., Labat, M. 2001. Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, **75**, 501-507.

Li, J., Henriksson, G., Gellerstedt, G. 2007. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresource Technology*, **98**, 3061-3068.

Li, L., Tsao, R., Yang, R., Liu, C., Young, J. C., Zhu, H. 2008. Isolation and purification of phenylethanoid glycosides from *Cistanche deserticola* by high-speed counter-current chromatography. *Food Chemistry*, **108**, 702-710.

Limioli, R., Consonni, R., Ranalli, A., Bianchi, G., Zetta, L. 1996. ¹H NMR study of phenolics in the vegetation water of three cultivars of *Olea europaea*: Similarities and differences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 2040-2048.

Linares, A., Caba, J. M., Ligeró, F., de la Rubia, T., Martínez, J. 2003. Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using *Phanerochaete flavid-alba*. *Chemosphere*, **51**, 887-891.

Lipnizki, F., Olsson, J., Trägårdh, G. 2002. Scale-up of pervaporation for the recovery of natural aroma compounds in the food industry. Part 1: simulation and performance. *Journal of Food Engineering*, **54**, 183-195.

López, S., Pacheco, Y. M., Bermúdez, B., Abia, R., Muriana, F. J. G. 2004. Olive oil and cancer. *Grasas y Aceites*, **55**, 33-41.

López Gallego, F., Rodríguez, P. L., Espejo, M., Sanz, E., Cortés, P. 2003. Efecto de la utilización del alpeorajo en el pienso de cebo de corderos merinos, sobre la calificación Corderex. XXVIII Jornadas Científicas y VII Internacionales de la SEOC, Badajoz, 110-113.

López-Miranda, J. 2010. Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, **20**, 284-294.

Luna, G., Morales, M. T., Aparicio, R. 2006. Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chemistry*, **98**, 243-252.

M

Madejón, E., Galli, E., Tomati, U. 1998. Composting of wastes produced by low water consuming olive mill technology. *Agrochimica*, **42**, 135-146.

Manach, C., Mazur, A., Scalbert, A. 2005. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, **16**, 77-84.

Mangan, J. L. 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition Research Reviews*, **1**, 209-231.

Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Molledo, O., Leone, A., Zappia, V. 1997. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *The Journal of Nutrition*, **127**, 286-292.

Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Montedoro, G., Zappia, V. 1999. Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **10**, 159-165.

Manna, C., Galletti, P., Maisto, G., Cucciolla, V., D'Angelo, S., Zappia, V. 2000. Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **470**, 341-344.

Mardones, P., Rigotti, A. 2004. Cellular mechanisms of vitamin E uptake: relevance in α -tocopherol metabolism and potential implications for disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **15**, 252-260.

Márquez-Martín, A., De la Puerta, R., Fernández-Arche, A., Ruiz-Gutiérrez, V., Yaqoob, P. 2006. Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil human mononuclear cells. *Cytokine*, **36**, 211-217.

Márquez-Ruiz, G., Jorge, N., Martín-Polvillo, M., Dobarganes, M. C. 1996. Rapid, quantitative determination of polar compounds in fats and oils by solid-phase extraction and size-exclusion chromatography using monostearin as internal standard. *Journal of Chromatography A*, **749**, 55-60.

Marsilio, V., Seghetti, L., Iannucci, E., Russi, F., Lanza, B., Felicioni, M. 2005. Use of a lactic acid bacteria starter culture during green olive (*Olea europaea* L cv Ascolana tenera) processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**, 1084-1090.

Marsilio, V., d'Andria, R., Lanza, B., Russi, F., Iannucci, E., Lavini, A., Morelli, G. 2006. Effect of irrigation and lactic acid bacteria inoculants on the phenolic fraction, fermentation and sensory characteristics of olive (*Olea europaea* L. cv. Ascolana tenera) fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86**, 1005-1013.

Martin, R., Carvalho, J., Ibeas, E., Hernández, M., Ruiz-Gutiérrez, V., Nieto, M. L. 2007. Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation. *Cancer Research*, **67**, 3741-3751.

Martín, R., Ibeas, E., Carvalho-Tavares, J., Hernández, M., Ruiz-Gutiérrez, V., Nieto, M. L. 2009. Natural triterpenic diols promote apoptosis in astrocytoma cells through ROS-mediated mitochondrial depolarization and JNK activation. *PLoS ONE*, **4**, e5975.

Mateos, R., Espartero, J. L., Trujillo, M., Ríos, J. J., León-Camacho, M., Alcadia, F., Cert, A. 2001. Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 2185-2192.

McMillan, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. En: Enzymatic conversion of biomass for fuels production, págs. 292-324. Eds. Himmel, M. E., Baker, J. O., Overend, R. P., American Chemical Society, Washington, D.C., 1994.

Medina, E., de Castro, A., Romero, C., Brenes, M. 2006. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: Correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 4954-4961.

Menéndez, J. A., Vázquez-Martín, A., García-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferreros, C., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. 2008. Anti-HER2 (*erbB-2*) oncogene effects of phenolic compounds directly isolated from commercial Extra-Virgin Olive Oil (EVOO). *BMC Cancer*, **8**:377.

Middleton, E. Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, **52**, 673-751.

Miró-Casas, E., Covas, M. I., Fitó, M., Farré-Albadalejo, M., Marrugat, J., de la Torre, R. 2003. Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, **57**, 186-190.

Mitsuda, H., Yuasumoto, K., Iwami, K. 1996. Antioxidation action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*, **19**, 210-214.

Moerman, F. T., van Leeuwen, M. B., Delcour, J. A. 2004. Enrichment of higher molecular weight fractions in inulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 3780-3783.

Moniruzzaman, M. 1996. Effect of steam explosion on the physicochemical properties and enzymatic saccharification of rice straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **59**, 283-297.

Moon, J-K., Shibamoto, T. 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 1655-1666.

Moral, P. S., Méndez, M. V. R. 2006. Production of pomace olive oil. *Grasas y Aceites*, **57**, 47-55.

Morales, M. T., Tsimidou, M. The role of volatile compounds and polyphenols in olive oil sensory quality. En: Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties, pág. 398. Eds. Harwood, J., Aparicio, R., Aspen Publication, Gaithersburg, MA, USA, 2000.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, **96**, 673-686.

Moure, A., Gullón, P., Domínguez, H., Parajó, J. C. 2006. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry*, **41**, 1913-1923.

Mulinacci, N., Innocenti, M., La Marca, G., Mercalli, E., Giaccherini, C., Romani, A., Erica, S., Vincieri, F. F. 2005. Solid olive residues: insight into their phenolic composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 8963-8969.

Mulroney, B., Peel, B., Traeger, J. C. 1999. Theoretical study of deprotonated glucopyranosyl disaccharide fragmentation. *Journal of Mass Spectrometry*, **34**, 856-871.

Mussatto, S. I., Mancilha, I. M. 2007. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, **68**, 587-597.

N

Niaounakis, M., Halvadakis, C. P. Biological Processes. En: Olive processing waste management, pág. 184. Ed. Elsevier, Oxford, 2006.

Nishibe, S. 2002. The plant origins of herbal medicines and their quality evaluation. *Yakugaku Zasshi*, **122**, 363-379.

O

Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K., Stockmann, R. 2005a. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 823-837.

Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, Jr., D. R., Prenzler, P. D., Robards, K. 2005b. Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 9911-9920.

Obied, H. K., Bedgood Jr., D. R., Prenzler, P. D., Robards, K. 2007a. Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **603**, 176-189.

Obied, H. K., Bedgood Jr., D. R., Prenzler, P. D., Robards, K. 2007b. Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*, **45**, 1238-1248.

Obied, H. K., Prenzler, P. D., Ryan, D., Servili, M., Taticchi, A., Esposito, S., Robards, K. 2008. Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Natural Product Reports*, **25**, 1167-1179.

Ohno, T., Inoue, M., Ogihara Y., Saracoglu, I. 2002. Antimetastatic activity of acteoside, a phenylethanoid glycoside. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **25**, 666-668.

Olano-Martín, E., Mountzouris, K. C., Gibson, G. R., Rastall, R. A. 2001. Continuous production of pectic-oligosaccharides in an enzyme membrane reactor. *Journal of Food Science*, **66**, 966-971.

Olano-Martín, E., Gibson, G. R., Rastall, R. A. 2002. Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, **93**, 505-511.

Olano-Martín, E., Rimbach, G. H., Gibson G. R., Rastall, R. A. 2003. Pectin and pectic-oligosaccharides induce apoptosis in *in vitro* human colonic adenocarcinoma cells. *Anticancer Research*, **23**, 341-346.

Oliveras-López, M. J., Innocenti, M., Giaccherini, C., Ieri, F., Romani, A., Mulinacci, N. 2007. Study of the phenolic composition of Spanish and Italian monocultivar extra virgin olive oils: Distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. *Talanta*, **73**, 726-732.

O'Neill, M. A., Albersheim, P., Darvill, A. G. The pectic polysaccharides of primary cell walls. En: *Methods in plant biochemistry*, vol. 2: carbohydrates, págs. 415-441. Ed. Dey, P. M., Academic press, Londres, 1990.

Ortega-García, J., Gámez-Meza, N., Noriega-Rodríguez, J. A., Dennis-Quiñonez, O., García-Galindo, H. S., Angulo-Guerrero, J. O., Medina-Juárez, L. A. 2006. Refining of high oleic safflower oil: Effect on the sterols and tocopherols content. *European Food Research and Technology*, **223**, 775-779.

Ostlund, R. E. 2002. Phytosterols in human nutrition. *Annual Review of Nutrition*, **22**, 533-549.

Otero, M., Zabkova, M., Rodrigues, A. E. 2005. Comparative study of the adsorption of phenol and salicylic acid from aqueous solution onto nonionic polymeric resins. *Separation and Purification Technology*, **45**, 86-95.

Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, **36**, 1235-1247.

Owen, R. W., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. 2003. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology*, **41**, 703-717.

P

Parker, D. 1991. NMR Determination of enantiomeric purity. *Chemical Reviews*, **91**, 1441-1457.

Pereira, J. A., Pereira, A. P. G., Ferreira, I. C. F. R., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A. 2006. Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 8425-8431.

Pereira-Caro, G., Madrona, A., Bravo, L., Espartero, J. L., Alcudia, F., Cert, A., Mateos, R. 2009. Antioxidant activity evaluation of alkyl hydroxytyrosyl ethers, a new class of hydroxytyrosol derivatives. *Food Chemistry*, **115**, 86-91.

Pérez, J., De la Rubia, T., Moreno, J., Martínez, J. 1992. Phenolic content and antibacterial activity of olive oil waste waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **11**, 489-495.

Pérez, J. A., Hernández, J. M., Trujillo, J. M., López, H. Studies in Natural Products Chemistry Vol. 32 Bioactive Natural Products (Part L). Iridoids and secoiridoids from *Oleaceae*, págs. 303-364. Atta-ur-Rahman Ed. Amsterdam, 2005.

Pérez-Camino, M. C., Cert, A. 1999. Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 1558-1562.

Pérez-Jiménez, F. 2005. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *European Journal of Clinical Investigation*, **35**, 421-424.

Pérez-Jiménez, F., Ruano, J., Pérez-Martínez, P., López-Segura, F., López-Miranda, J. 2007. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Molecular Nutrition and Food Research*, **51**, 1199-1208.

Perona, J. S., Arcemis, C., Ruiz-Gutiérrez, V., Catalá, A. 2005. Effect of dietary high-oleic-acid oils that are rich in antioxidants on microsomal lipid peroxidation in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 730-735.

Pinelo, M., Jonsson, G., Meyer, A. S. 2009. Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: Molecular and operational features affecting performance. *Separation and Purification Technology*, **70**, 1-11.

Plat, J., Mensink, R. P. 2001. Effects of plants sterols and stanols on lipid metabolism and cardiovascular risk. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **11**, 31-40.

Playne, M. J. 1984. Increased digestibility of bagasse by pretreatment with alkalis and steam explosion. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**, 426-433.

Pool-Zobel, B., van Loo, J., Rowland, I., Roberfroid, M. B. 2002. Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. *British Journal of Nutrition*, **87**, 273-281.

Prenzler, P. D., Bedgood, D. R., Bishop, A. G., Robards, K. 2002. Volatile profile of olive oils. *Advances in Horticultural Science*, **16**, 246-252.

Q

Quéméner, B., Désiré, C., Debrauwer, L., Rathahao, E. 2003. Structural characterization by both positive and negative electrospray ion trap mass spectrometry of oligogalacturonates

purified by high-performance anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, **984**, 185-194.

R

Rajal, V. B., Cuevas, C. M., Ellenrieder, G. R. 1999. Purificación y algunas propiedades de pectinesterasa de *fusarium oxysporum* fri 0160.3. *Información Tecnológica*, **10**, 173-178.

Ralet, M-C., Lerouge, P., Quéméner, B. 2009. Mass spectrometry for pectin structure analysis. *Carbohydrate Research*, **344**, 1798-1807.

Ramassamy, C. 2006. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology*, **545**, 51-64.

Ramos, L. P., Breuil, C., Kushner, D. J., Saddler, J. N. 1992. Steam pretreatment conditions for effective enzymatic-hydrolysis and recovery yields of eucalyptus-viminalis wood chips. *Holzforschung*, **46**, 149-154.

Ramos, L. P., Saddler, J. N. 1994. Bioconversion of wood residues - Mechanisms involved in pretreating and hydrolyzing lignocellulosic materials. *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, **566**, 325-241.

Ramos, L. P. 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quimica Nova*, **26**, 863-871.

Ramos-Cormenzana, A., Juárez-Jiménez, B., García-Pareja, M. P. 1996. Antimicrobial activity of olive mill waste-waters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **38**, 283-290.

Ranalli, A., Pollastri, L., Contento, S., Di Loreto, G., Iannucci, E., Lucera, L., Russi, F. 2002. Sterol and alcohol components of seed, pulp and whole olive fruit oils. Their use to characterise olive fruit variety by multivariate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**, 854-859.

Rao, C. V., Newmark, H. L., Reddy, B. S. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. 1998. *Carcinogenesis*, **19**, 287-290.

Real Decreto 436/2004, de 12 de marzo. Metodología para la actualización y sistematización del régimen jurídico y económico de la actividad de producción de energía eléctrica en régimen especial. BOE, 27/03/2004.

Reglamento (CEE) nº 2568/91 de la Comisión de 11 de julio de 1991 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre su métodos de análisis. DO L 248 de 5.9.1991, p. 1.

Reiners, J., Grosch, W. 1998. Odorants of virgin olive oils with different flavor profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 2754-2763.

Reis, A., Domingues, M. R. M., Ferrer-Correia, A. J., Coimbra, M. A. 2003. Structural characterisation by MALDI-MS of olive xylo-oligosaccharides obtained by partial acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, **53**, 101-107.

Reis, A., Coimbra, M. A., Domingues, P., Ferrer-Correia, A. J., Domingues, M. R. M. 2004. Fragmentation pattern of underivatized xylo-oligosaccharides and their alditol derivatives by electrospray tandem mass spectrometry. *Carbohydrate Polymers*, **55**, 401-409.

Reis, M. T. A., de Freitas, O. M. F., Ferreira, L. M., Carvalho, J. M. R. 2006. Extraction of 2-(4-hydroxyphenyl)ethanol from aqueous solution by emulsion liquid membranes. *Journal of Membrane Science*, **269**, 161-170.

Reiter, E., Jiang, Q., Christen, S. 2007. Anti-inflammatory properties of α - and γ -tocopherol. *Molecular Aspects of Medicine*, **28**, 668-691.

Ribeiro Jr., C. P., Lage, P. L. C., Borges, C. P. 2004. A combined gas-stripping vapour permeation process for aroma recovery. *Journal of Membrane Science*, **238**, 9-19.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**, 933-956.

Rincón, B., Borja, R., Martín, M. A., Martín, A. 2010. Kinetic study of the methanogenic step of a two-stage anaerobic digestion process treating olive mill solid residue. *Chemical Engineering Journal*, **160**, 215-219.

Rivers, D. B., Emert, G. H. 1987. Lignocellulose pretreatment: a comparison of wet and dry ball attrition. *Biotechnology Letters*, **9**, 365-368.

Roche, M., Dufour, C., Mora, N., Dangles, O. 2005. Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **3**, 423-430.

Rodis, P. S., Karathanos, V. T., Mantzavinou, A. 2002. Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 596-601.

Rodríguez G., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J. 2007a. Effect of steam treatment of alperujo on the composition, enzymatic saccharification, and in vitro digestibility of alperujo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 136-142.

Rodríguez, G., Rodríguez, R., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., Jiménez, A. 2007b. Antioxidant activity of effluents during the purification of hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl glycol from olive oil waste. *European Food Research and Technology*, **224**, 733-741.

Rodríguez, G., Lama, A., Trujillo, M., Espartero, J.L., Fernández-Bolaños, J. 2009. Isolation of a powerful antioxidant from *Olea europaea* fruit-mill waste: 3,4-Dihydroxyphenylglycol. *LWT – Food Science and Technology*, **42**, 483-490.

Rodríguez-Rodríguez, R., Perona, J. S., Herrera, M. D., Ruiz-Gutiérrez, V. 2006. Triterpenic compounds from “Orujo” olive oil elicit vasorelaxation in aorta from spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 2096-2102.

Rodríguez-Rodríguez, R., Herrera, M. D., de Sotomayor, M. A., Ruiz-Gutierrez, V. 2007. Pomace olive oil improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats by increasing endothelial nitric oxide synthase expression. *American Journal of Hypertension*, **20**, 728-734.

Romero, C., Brenes, M., García, P., Garrido, A. 2002a. Hydroxytyrosol 4- β -D-glucoside, and important phenolic compound in olive fruits and derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3835-3839.

Romero, C., García, P., Brenes, M., García, A., Garrido, A. 2002b. Phenolic compounds in natural black Spanish olive varieties. *European Food Research and Technology*, **215**, 489-496.

Romero, C., Brenes, M., Yousfi, K., García, P., García, A., Garrido, A. 2004a. Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 479-484.

Romero, C., Brenes, M., García, P., García, A., Garrido, A. 2004b. Polyphenol changes during fermentation of naturally black olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 1973-1979.

Rozzi, A., Malpei, F. 1996. Treatment and disposal of olive mill effluents. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 135-144.

Ruiz Gutiérrez, V., Sánchez Perona, J., de la Osada García, J. 2005. Utilización de aceite de orujo de centrifugación refinado como retardador de la aterosclerosis. ES 2 239 908 B1.

Ruiz-Méndez, M. V., López-López, A., Garrido-Fernández, A. 2008. Characterization and chemometric study of crude and refined oils from table olive by-products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **110**, 537-546.

Ryan, D., Robards, K. 1998. Phenolic compounds in olives. *The Analyst*, **123**, 31-44.

Ryan, D., Robards, K., Prenzler, P., Jardine, D., Herlt, T., Antolovich, M. 1999. Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from *Olea europaea*. *Journal of Chromatography A*, **855**, 529-537.

Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Lavee, S. 2002a. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, **92**, 147-176.

Ryan, D., Antolovich, M., Herlt, T., Prenzler, P. D., Lavee, S., Robards, K. 2002b. Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 6716-6724.

S

Saddler, J. N., Brownell, H. H., Clermont, L. P., Levitin, N. 1982. Enzymatic hydrolysis of cellulose and various pretreated wood fractions. *Biotechnology and Bioengineering*, **24**, 1389-1402.

Sako, T., Matsumoto, K., Tanaka, R. 1999. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*, **9**, 69-80.

Salvador, L. D., Sukanuma, T., Kitahara, K., Tanoue, H., Ichiki, M. 2000. Monosaccharide composition of sweetpotato fiber and cell wall polysaccharides from sweetpotato, cassava and potato analysed by the high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 3448-3454.

Sampedro, I., Aranda, E., Díaz, R., García-Sánchez, M., Ocampo, J. A., García-Romera, I. 2008. Saprobe fungi decreased the sensitivity to the toxic effect of dry olive mill residue on arbuscular mycorrhizal plants. *Chemosphere*, **70**, 1383-1389.

Sanz, M. L., Polemis, N., Morales, V., Corzo, N., Drakoularakou, A., Gibson, G. R., Rastall, R. A. 2005. In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 2914-2921.

Sato, H., Genet, C., Strehle, A., Thomas, C., Lobstein, A., Wagner, A., Mioskowski, C., Auwerx, J., Saladin, R. 2007. Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **362**, 793-798.

Savarese, M., De Marco, E., Sacchi, R. 2007. Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, **105**, 761-770.

Saviozzi, A., Leviminzi, R., Riffaldi, R., Lupetti, A. 1991. Effects of waste-water from olive processing on agricultural soil. *Agrochimica*, **35**, 135-148.

Sawada, T., Nakamura, Y., Kobayashi, F. 1995. Effects of fungal pretreatment and steam explosion pretreatment on enzymatic saccharification of plant biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, **48**, 719-724.

Sawada, T., Nakamura, Y. 2001. Low energy steam explosion treatment of plant biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **76**, 139-146.

Schaffer, S., Podstawa, M., Visioli, F., Bogani, P., Müller, W. E., Eckert, G. P. 2007. Hydroxytyrosol-rich olive mill wastewater extract protects brain cells in vitro and ex vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 5043-5049.

Schneider, I., Bucar, F. 2005. Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 1: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase/cyclooxygenase. *Phytotherapy Research*, **19**, 81-102.

Schwald, W., Breuil, C., Brownell, H. H., Chan, M., Saddler, J. N. 1989. Assessment of pretreatment conditions to obtain fast complete hydrolysis on high substrate concentrations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **20-1**, 29-44.

Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Macchioni, A., Montedoro, G. 1999. Phenolic compounds of olive fruit: one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of

nüzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 12-18.

Servili, M., Taticchi, A., Esposito, S., Urbani, S., Selvaggini, R., Montedoro, G. 2007. Effect of olive stoning on the volatile and phenolic composition of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 7028-7035.

Setti, L., Pifferi, P., Bordado, J. 2003. Plant for the treatment of waste waters. WO 03/004419 A1.

Sewalt, V. J. H., Glasser, W. G., Fontenot, J. P. 1992. Fiber composition and in vitro digestibility of steam-exploded peanut hulls. *Animal Science Research Report, Virginia Agricultural Experiment Station*, **10**, 111-112.

Sharma, S. K., Kalra, K. L., Grewal, H. S. 2002. Enzymatic saccharification of pretreated sunflower stalks. *Biomass and Bioenergy*, **23**, 237-243.

Silva, S., Gomes, L., Leitão, F., Bronze, M., Coelho, A. V., Boas, L. V. 2010. Secoiridoids in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Grasas y Aceites*, **61**, 157-164.

Singh, D. K., Li, L., Porter, T. D. 2006. Policosanol inhibits cholesterol synthesis in hepatoma cells by activation of AMP-kinase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **318**, 1020-1026.

Sinitsyn, A. P., Gusakov, A. V. Vlasenko, E. Y. 1991. Effect of structural and physicochemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic-hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **30**, 43-59.

Smit, B. A., Engels, W. J. M., Bruinsma, J., van Hylckama Vlieg, J. E. T., Wouters, J. T. M., Smit, G. 2004. Development of a high throughput screening method to test flavour-forming capabilities of anaerobic micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, **97**, 306-313.

Smith, T. J., Yang, G. Y., Seril, D. N., Liao, J., Kim, S. 1998. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis*, **19**, 703-706.

Solinas, M., Angerosa, F., Marsilio, V. 1988. Research of some flavour components of virgin olive oils in relation to olive varieties. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **65**, 361-368.

Soni, M. G., Burdock, G. A., Christian, M. S., Bitler, C. M., Crea, R. 2006. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food and Chemical Toxicology*, **44**, 903-915.

Sun, Y., Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, **83**, 1-11.

Suzuki, T., Tomita-Yokotani, K., Tsubura, H., Yoshida, S., Kusakabe, I., Yamada, K., Miki, Y., Hasegawa, K. 2002. Plant growth-promoting oligosaccharides produced from tomato waste. *Bioresource Technology*, **81**, 91-96.

Sweeting, L. M., Crans, D. C., Whitesides, G. M. 1987. Determination of enantiomeric purity of polar substrates with chiral lanthanide NMR shift reagents in polar solvents. *Journal of Organic Chemistry*, **52**, 2273-2276.

Swennen, K., Courtin, C. M., Van der Bruggen, B., Vandecasteele, C., Delcour, J. A. 2005. Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxylooligosaccharides with different structures. *Carbohydrate Polymers*, **62**, 283-292.

I

Takenaka, Y., Tanahashi, T., Shintaku, M., Sakai, T., Nagakura, N., Parida. 2000. Secoiridoid glucosides from *Fraxinus Americana*. *Phytochemistry*, **55**, 275-284.

Tanahashi, T., Takenaka, Y., Okazaki, N., Koge, M., Nagakura, N., Nishi, T. 2009. Secoiridoid glucosides and unusual recyclized secoiridoid aglycones from *Ligustrum vulgare*. *Phytochemistry*, **70**, 2072-2077.

Taylor, J. C., Rapport, L., Lockwood, G. B. 2003. Octacosanol in human health. *Nutrition*, **19**, 192-195.

Temime, S. B., Campeol, E., Cioni, P. L., Daoud, D., Zarrouk, M. 2006. Volatile compounds from Chétoui olive oil and variations induced by growing area. *Food Chemistry*, **99**, 315-325.

Tozuka, H., Ota, M., Kofujita, H., Takahashi, K. 2005. Synthesis of dihydroxyphenacyl glycosides for biological and medicinal study: β -oxoacteoside from *Paulownia tomentosa*. *Journal of Wood Science*, **51**, 48-59.

Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C., Trichopoulos, D. 2003. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *The New England Journal of Medicine*, **348**, 2599-2608.

Trichopoulou, A., Dilis, V. 2007. Olive oil and longevity. *Molecular Nutrition and Food Research*, **51**, 1275-1278.

Trujillo, M., Mateos, R., Collantes de Teran, L., Espartero, J. L., Cert, R., Jover, M., Alcudia, F., Bautista, J., Cert, A., Parrado, J. 2006. Lipophilic hydroxytyrosyl esters. Antioxidant activity in lipid matrices and biological systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 3779-3785.

Tuck, K. L., Hayball, P. J. 2002. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, 636-644.

Tura, D., Robards, K. 2002. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *Journal of Chromatography A*, **975**, 71-93.

Tura, D., Prenzler, P. D., Bedgood Jr., D. R., Antolovich, M., Robards, K. 2004. Varietal and processing effects on the volatile profile of Australian olive oils. *Food Chemistry*, **84**, 341-349.

V

Vakhrushev, S. Y., Zamfir, A., Peter-Katalinić. 2004. $^{0,2}A_n$ cross-ring cleavage as a general diagnostic tool for glycan assignment in glycoconjugate mixtures. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **15**, 1863-1868.

Vázquez, M. J., Garrote, G., Alonso, J. L., Domínguez, H., Parajó, J. C. 2005. Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: evaluation of operational strategies. *Bioresource Technology*, **96**, 889-896.

Vegas, R., Alonso, J. L., Domínguez, H., Parajó, J. C. 2004. Processing of rice husk autohydrolysis liquors for obtaining food ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 7311-7317.

Velasco, J., Dobarganes, C. 2002. Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**, 661-676.

Veneri, M. G., Del Rio, G. 2004. Systematic study of long-term stability of 3,4-dihydroxyphenylglycol in plasma for subsequent determination with liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, **802**, 247-255.

Villanova, L., Villanova, L., Fasiello, G., Merendino, A. 2006. Process for the recovery of tyrosol and hydroxytyrosol from oil mill wastewaters and catalytic oxidation method in order to convert tyrosol in hydroxytyrosol. *United States Patent Application Publication*, US 2006/0070953 A1.

Vierhuis, E., Schols, H. A., Beldman, G., Voragen, A. G. J. 2000. Isolation and characterisation of cell wall material from olive fruit (*Olea europaea* cv koroneiki) at different ripening stages. *Carbohydrate Polymers*, **43**, 11-21.

Vierhuis, E., Servili, M., Baldioli, M., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., Montedoro, G. 2001a. Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds and polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 1218-1223.

Vierhuis, E., Schols, H. A., Beldman, G., Voragen, A. G. J. 2001b. Structural characterisation of xyloglucan and xylans present in olive fruit (*Olea europaea* cv koroneiki). *Carbohydrate Polymers*, **44**, 51-62.

Vierhuis, E., York, W. S., Kumar Kolli, V. S., Vincken, Jean-Paul, Schols, H. A., Van Alebeek, Gert-Jan W. M., Voragen, A. G. J. 2001c. Structural analyses of two arabinose containing oligosaccharides derived from olive fruit xyloglucan: XXSG and XLSG. *Carbohydrate Research*, **332**, 285-297.

Vierhuis, E. Structural characteristics of polysaccharides present in olive fruit. Pectin in olive fruit. En: Structural characteristics of polysaccharides from olive fruit cell walls in relation to ripening and processing, pág. 109. Wageningen, 2002.

Vierhuis, E., Korver, M., Schols, H. A., Voragen, A. G. J. 2003. Structural characteristics of pectic polysaccharides from olive fruit (*Olea europaea* cv moraiolo) in relation to processing for oil extraction. *Carbohydrate Polymers*, **51**, 135-148.

Vignon, M. R., Garcia-Jaldon, C., Dupeyre, D. 1995. Steam explosion of woody hemp chènevotte. *International Journal of Biological Macromolecules*, **17**, 395-404.

Vincken, J. P., York, W. S., Beldman, G., Voragen, A. G. J. 1997. Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG: update on cell walls. *Plant Physiology*, **114**, 9-13.

Vincken, J. P., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J., Visser, R. G. F. 2003. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*, **132**, 1781-1789.

Visioli, F., Galli, C. 1998. Olive oil phenols and their potential effects on human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 4292-4296.

Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Mattei, A., Patelli, R., Galli, G., Caruso, D. 2000. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Letters*, **468**, 159-160.

Visioli, F., Poli, A., Galli, C. 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, **22**, 65-75.

Visioli, F., Bogani, P., Grande, S., Galli, C. 2004. Olive oil and oxidative stress. *Grasas y Aceites*, **55**, 66-75.

Visioli, F., Caruso, D., Grande, S., Bosisio, R., Villa, M., Galli, G., Sirtori, C., Galli, C. 2005. Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *European Journal of Nutrition*, **44**, 121-127.

Vlasenko, E. Yu., Ding, H., Labavitch, J. M., Shoemaker, S. P. 1997. Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. *Bioresource Technology*, **59**, 109-119.

Vlyssides, A. G., Loizides, M., Karlis, P. K. 2004. Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *Journal of Cleaner Production*, **12**, 603-611.

Vos, A. P., Haarman, M., van Ginkel, J. W. H., Knol, J., Garssen, J., Stahl, B., Boehm, G., M'Rabet, L. 2007. Dietary supplementation of neutral and acidic oligosaccharides enhances Th1-dependent vaccination responses in mice. *Pediatric Allergy and Immunology*, **18**, 304-312.

Voragen, A. G. J., Pilnik, W., Thibault, J. F., Axelos, M. A. V., Renard, C. M. G. C. Pectins. En: *Food polysaccharides and their applications*, págs. 287-339. Ed. A. M. Stephen, Dekker, New York, 1995.

Voragen, A. G. J., Beldman, G., Schols, H. A. Chemistry and enzymology of pectins. En: *Advanced dietary fibre technology*, págs. 379-398. Ed. B. V. McCleary & L. Prosky, Blackwell Science, Oxford, 2001.

W

Waldebäck, M., Señoráns, F. J., Fridström, A., Markides, K. E. Pressurized fluid extraction of squalene from olive biomass. En: *Modern Extraction Techniques*, págs. 96-106. Ed. Oxford University Press, Washington, 2006.

Wayman, M., Parekh, S. R. 1988. SO₂ prehydrolysis for high yield ethanol production from biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **17**, 33-43.

Whitcombe, A. J., O'Neill, M. A., Steffan, W., Albersheim, P., Darvill, A. G. 1995. Structural characterization of the pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan-II. *Carbohydrate Research*, **271**, 15-29.

Willats, W. G. T., Knox, J. P., Mikkelsen, J. D. 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, **17**, 97-104.

Wood, T. M., Saddler, J. N. 1988. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. *Methods in Enzymology*, **160**, 3-11.

Wright, R. S. 1998. Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. *Chemical Engineering Progress*, **84**, 62-74.

X

Xiong, Q., Hase, K., Tezuka, Y., Tani, T., Namba, T., Kadota, S. 1998. Hepatoprotective activity of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Planta Medica*, **64**, 120-125.

Y

Yang, F. G., Fang, Z., Xu, Y., Yao, C. C., Yu, S. Y., Zhu, Q. X. 2003. Separation of xylooligosaccharides from enzymatic hydrolytes using membrane reactor. *Journal of Central South University of Technology*, **10**, 122-125.

Yáñez-Ruiz, D. R., Molina-Alcaide, E. 2007. A comparative study of the effect of two-stage olive cake added to alfalfa on digestion and nitrogen losses in sheep and goats. *Animal*, **1**, 227-232.

Yuan, Q. P., Zhang, H., Qian, Z. M., Yang, X. J. 2004. Pilot-plant production of xylo-oligosaccharides from corncob by steaming, enzymatic hydrolysis and nanofiltration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **79**, 1073-1079.

Yoshida, H., Kondo, I., Kajimoto, G. 1992. Participation of free fatty acids in the oxidation of purified soybean oil during microwave heating. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **69**, 1136-1140.

Younes, H., Demigné, C., Rémésy, C. 1996. Acidic fermentation in the caecum increases absorption of calcium and magnesium in the large intestine of the rat. *British Journal of Nutrition*, **75**, 301-314.

Z

Zeev Wiesman. Non-conventional olive oil industries: products and biotechnologies. En: Desert olive oil cultivation. Advanced biotechnologies, págs. 303-327. Ed. Academic Press, Oxford, 2009a.

Zeev Wiesman. Olive-mill wastes: treatment and product biotechnologies. En: Desert olive oil cultivation. Advanced biotechnologies, págs. 243-255. Ed. Academic Press, Oxford, 2009b.

Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Zhang, X., Li, H., Gao, M. 2006. The effect of microwave irradiation on enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresource Technology*, **97**, 1964-1968.