

Recuperación de compuestos fenólicos de residuos olivícolas: selección de variables relevantes y optimización del proceso

Rodríguez, M.¹, Gil, R.², Rodríguez, L.², Vallejo, M.², Cornejo, V.¹, Gines, L.¹, Rodríguez Gutiérrez, G.³, Monetta, P.¹.

¹INTA EEA San Juan, 2 IBT-FI-UNSJ, 3 IG-CSIC rodriguez.manuel@inta.gob.ar

Introducción

Argentina es el principal productor y exportador de aceite de oliva de América del Sur, y el décimo a nivel mundial. Entre las provincias productoras se destacan, San Juan, Catamarca, La Rioja, Mendoza y Córdoba [1]. Si bien existen distintas metodologías en la extracción de aceite, en Argentina se realiza principalmente por métodos continuos de dos fases, obteniendo por un lado, una fase oleosa de donde se extrae el aceite, y por el otro un residuo semisólido constituido por restos de piel, carozo, pulpa y agua de vegetación de aceitunas, al que comúnmente se denomina alperujo. En San Juan, se generan anualmente entre 60.000 t y 80.000 t de alperujo. Este subproducto es mayoritariamente aplicado al suelo de forma no reglamentada [2]. En los últimos años se han realizado investigaciones locales relacionadas a esta práctica [3,4] que han permitido la redacción de una normativa de aplicación controlada de residuos olivícolas al suelo. Esta práctica representa una alternativa sencilla para disponer los residuos generados por las industrias, pero posee ciertas restricciones de uso y además dista de ser una opción que permita aprovechar integralmente todos los constituyentes del alperujo. El aceite de oliva virgen es conocido por sus excelentes cualidades nutraceuticas, muchas de las cuales se deben a la presencia de compuestos fenólicos bioactivos [5,6] conformados por un inmenso grupo de compuestos derivados en su mayoría de la oleuropeína, dentro de los cuales el hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol, HT) es el más abundante y estudiado, destacándose principalmente por su gran actividad como antioxidante natural. De estos compuestos, solo el 2 % pasan al aceite, quedando el 98% en el alperujo y normalmente desechados junto a él. Considerando que el mercado de antioxidantes naturales es una actividad en expansión a nivel mundial, se entiende que la recuperación de los compuestos fenólicos a partir del alperujo podría representar una opción económicamente viable en pos de valorizar este residuo. En la bibliografía se describen distintas metodologías de recuperación de compuestos fenólicos de alperujo, pero pocas de ellas son aplicables a

escala industrial [7]. La reciente implantación en las orujeras españolas de tratamientos térmicos marca un nuevo escenario para la recuperación de componentes de alto valor agregado, unido a la aplicación de bioprocesos para su uso integral. Actualmente se implementan dos tipos de tratamientos térmicos a nivel industrial, por un lado tratamientos al vapor, y por el otro termobatidos. Ambos sistemas facilitan la separación de fases a través del calentamiento del alperujo y permiten la recuperación de distintos componentes (líquido con alta concentración de compuestos fenólicos bioactivos; aceite y sólido desfenolizados con baja humedad) [8]. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue determinar condiciones experimentales, aplicables a escala industrial, tendientes a mejorar la aptitud del alperujo para la recuperación de compuestos fenólicos, posibilitando el aprovechamiento posterior de las distintas fracciones que se obtengan. Específicamente, se evaluó el efecto de tratamientos térmicos y posterior centrifugación del alperujo sobre el volumen de líquido recuperado y la correspondiente concentración de compuestos fenólicos.

Materiales y métodos

Lugar donde se realizaron los ensayos: Las actividades se desarrollaron principalmente en el laboratorio de aceites de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) San Juan del INTA, además algunos análisis se llevaron a cabo en el Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería, UNSJ.

Procedencia y características del alperujo utilizado: El alperujo utilizado provino de la planta de extracción de aceite de oliva de la EEA San Juan del INTA. Durante la primera etapa de selección de variables se utilizó alperujo variedad Arbequina, índice de madurez 3,5 y humedad 72% (fecha: 04/05/2017). En la segunda etapa se utilizó alperujo variedad Arbequina, índice de madurez 4 y humedad 65.7% (fecha 29/05/2017). En ambos casos un total de 10 kg fue homogenizado, alicuotado en muestras de 1 kg, rotulado y conservado a -20 °C hasta su utilización.

Aplicación de tratamientos térmicos y selección inicial de condiciones. Durante la primera etapa del ensayo se realizaron tratamientos térmicos combinando distintas condiciones de temperatura y tiempo, según se detalla en la tabla 1.

Tabla 1. Detalle de tratamientos térmicos aplicados.

Tratamiento	t (h)	T (°C)
L (control)	--	Amb
1L30	1	30°C
3L30	3	30°C
1L70	1	70°C
3L70	3	70°C
1L120	1	120°C
3L120	3	120°C

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado en tubos plásticos cerrados, con muestras de 40g de alperujo húmedo. Los dos tratamientos de 30 °C y 70 °C se realizaron en baño termostático mientras que el de 120 °C se realizó en autoclave. Una vez aplicados los tratamientos se realizó una separación de fases sólida y líquida por centrifugación a 3000 g durante 20 minutos. Se determinó el peso de las fracciones líquidas obtenidas en cada caso, la concentración de fenoles totales en dichas fracciones y se calculó el porcentaje de fenoles recuperables de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%FR = \frac{[Fenoles FL] * peso FL * 100\%}{[Fenoles AL] * peso M}$$

Donde:

%FR: porcentaje fenoles recuperables

[Fenoles FL]: concentración de fenoles en la fracción líquida (en ppm)

Peso FL: peso en gramos de la fracción líquida

[Fenoles AL]: concentración de fenoles en extracto metanólico (80:20 v/v) de alperujo (en ppm)

Peso M: peso de la muestra (alperujo húmedo) en gramos

Optimización de variables: La optimización de variables se realizó a través del diseño experimental de Box-Behnken, en la cual se tomaron como puntos centrales las variables seleccionadas en el ensayo anterior y se agregó la variable humedad, quedando el diseño definido por:

Temperatura de tratamiento: 50°C, 70°C y 90°C.

Tiempo de contacto: 0.5, 1.15 y 2 horas.

Humedad de alperujo: 70, 80 y 90 %

Los distintos niveles de humedad se obtuvieron

mediante el cálculo de la humedad inicial y la adición de agua destilada hasta alcanzar el nivel de estudio. Luego se tomaron muestras de cada alperujo, se pesó y se secó en estufa a 50°C durante 72 horas. Posteriormente se volvió a pesar y se realizaron los cálculos para corroborar que la humedad es la indicada.

Se realizaron quince ensayos (doce combinaciones y tres repeticiones en el centro del dominio de cada factor) utilizando todas las variables y sus distintos niveles. Finalmente, en los productos obtenidos de los ensayos se calculó la concentración de fenoles, y con ello se determinó la masa de fenoles recuperados a partir de la muestra inicial de alperujo (40 gramos). Estos resultados se compararon entre sí para determinar mejores respuestas.

Determinaciones analíticas. El contenido de fenoles totales se determinó mediante colorimetría con reactivo de Folin Cicolteau a 725 nm utilizando curva de calibración con ácido cafeico. El resultado fue expresado como ppm de ácido cafeico [9].

Análisis estadístico. El análisis estadístico de la primera etapa se realizó utilizando el software InfoStat versión 2,0. Para cada parámetro evaluado se ejecutó un análisis de varianza y comparación de medias por el método LSD Fisher ($p < 0,05$). La segunda etapa de ensayos se analizó utilizando el programa Design Expert 7.0.0. (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA).

Resultados y discusión

Selección de variables relevantes

Al analizar el efecto de los tratamientos aplicados sobre el porcentaje de fase líquida obtenida se observó que la mayor proporción de líquido respecto al total se obtuvo luego de someter al alperujo a 70°C durante 1 hora (1L70), diferenciándose significativamente de los demás tratamientos (**Tabla 2**). En los tratamientos realizados a 30°C o bien a temperatura ambiente, el porcentaje de líquido fue significativamente menor. Esto coincide con lo observado previamente por otros autores que sugieren que, al someter al alperujo a temperatura la fase líquida incrementa por solubilización de algunos de sus constituyentes [10]. En contraposición, se observó que a mayor tiempo de exposición (3L70) o bien mayor temperatura (1L120 y 3L120), el porcentaje de fase líquida fue menor, probablemente esta disminución se deba a evaporación de la fase líquida durante el tratamiento. Por otra parte, en cuanto a la concentración de fenoles totales en las distintas fracciones líquidas se observó que los

tratamientos realizados a 70°C y 120°C presentaron los valores superiores, sin presentar diferencias significativas entre ellos (**Tabla 2**).

Tabla 2. Porcentaje de fase líquida obtenida y concentración de fenoles en la fase líquida para cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas según LSD Fisher ($p < 0,05$)

Tratamiento	FL (%)	Fenoles (ppm AC)
L	33.85b	6748.75a
1L30	35.35c	7542.38b
3L30	36.30c	7031.50a
1L70	41.85e	8119.00c
3L70	38.88d	8170.63c
1L120	36.63c	7789.25bc
3L120	30.75a	7990.88c

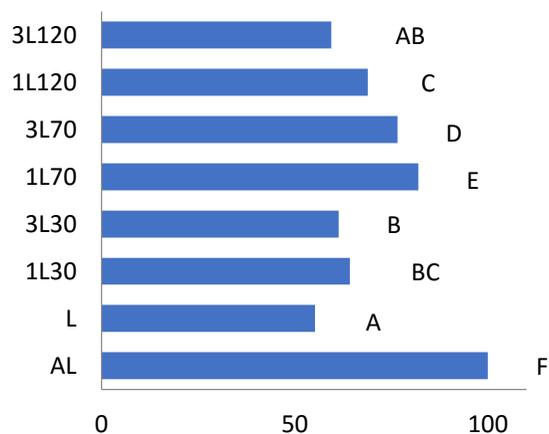


Figura 1. Fenoles recuperables en cada tratamiento. Las barras azules muestran el porcentaje de fenoles recuperables en cada tratamiento. El 100% corresponde al total de fenoles obtenido por extracción metanólica en alperujo (AL). Letras distintas indican diferencias significativas según LSD Fisher ($p < 0,05$).

Por último, la figura 1 muestra el porcentaje de fenoles recuperables en cada tratamiento. Se puede observar que el tratamiento 1L70 se diferenció significativamente del resto, presentando valores de fenoles recuperables superiores al 80% del total de fenoles (AL), el cual se obtuvo mediante una extracción de fenoles con solvente (Metanol-Agua 80:20 v/v) a temperatura ambiente. Es interesante destacar que el menor valor de recuperación fue observado en el tratamiento L, realizado a temperatura ambiente, lo cual confirma el efecto que tiene la temperatura en la liberación de fenoles. El análisis de estos resultados permitió establecer al tratamiento de 1 hora a 70°C como condición base para los ensayos de optimización mostrados a

continuación. Este resultado es interesante, sobre todo pensando en que la temperatura establecida es fácilmente aplicable a escala industrial.

Optimización de variables

Los ensayos de optimización de variables mostraron que las condiciones ideales para recuperar compuestos fenólicos variaron en función del contenido de humedad inicial del alperujo. Los gráficos de superficie de respuesta muestran que el valor máximo de recuperación de fenoles incrementa conforme se aumenta la humedad inicial del alperujo (**Figura 2, A-C**). Al 70% de humedad (AL70), se observó un máximo de recuperación de fenoles en el punto 65,7°C – 55,8 minutos en el cual se recuperaron 68,4 miligramos de fenoles por muestra de 40 gramos (5.7 mg/g de MS (materia seca)).

Al 80% de humedad el valor de recuperación de fenoles mostró un máximo a 67,3°C durante 45,3 minutos siendo el valor obtenido de 77,2 miligramos por muestra (9.65 mg/g de MS), un 13% superior que el obtenido en el nivel base de humedad (70%). Por último, cuando el contenido inicial de humedad del alperujo se ajustó a 90%, el nivel de recuperación de fenoles fue aún mayor, como se puede observar en la **figura 2C**, se obtuvo un máximo de 94,12 miligramos por muestra (23.53 mg/g de MS) de fenoles cuando el alperujo se trató a 70°C durante 75 minutos. El valor observado fue un 38% superior al obtenido cuando la humedad inicial del alperujo se fijó a 70% (condición representativa del alperujo generado por la planta de extracción de aceite de la EEA San Juan). Estos resultados sugieren que la adición de agua al alperujo, en forma previa a los tratamientos térmicos, puede resultar una opción interesante para mejorar el proceso de solubilización de compuestos fenólicos. Por supuesto, la adición de agua implica un gasto adicional que deberá ser justificado por el beneficio obtenido. Además, no se descarta la posibilidad de utilizar efluentes líquidos obtenidos en el proceso de extracción de aceite (en estudio).

Conclusiones

A través del análisis de selección de variables se identificó a la exposición del alperujo a 70°C durante 1 hora como condición base para los ensayos de optimización.

Mediante los ensayos de optimización se observó que la humedad inicial del alperujo es un factor clave que condiciona la solubilización de compuestos fenólicos. Se observó también que a mayor humedad inicial, se obtuvieron mayores

niveles de fenoles recuperables. Además, se observó que a medida que el valor de humedad inicial es mayor, las condiciones de temperatura y tiempo óptimos del tratamiento también deben ser incrementados.

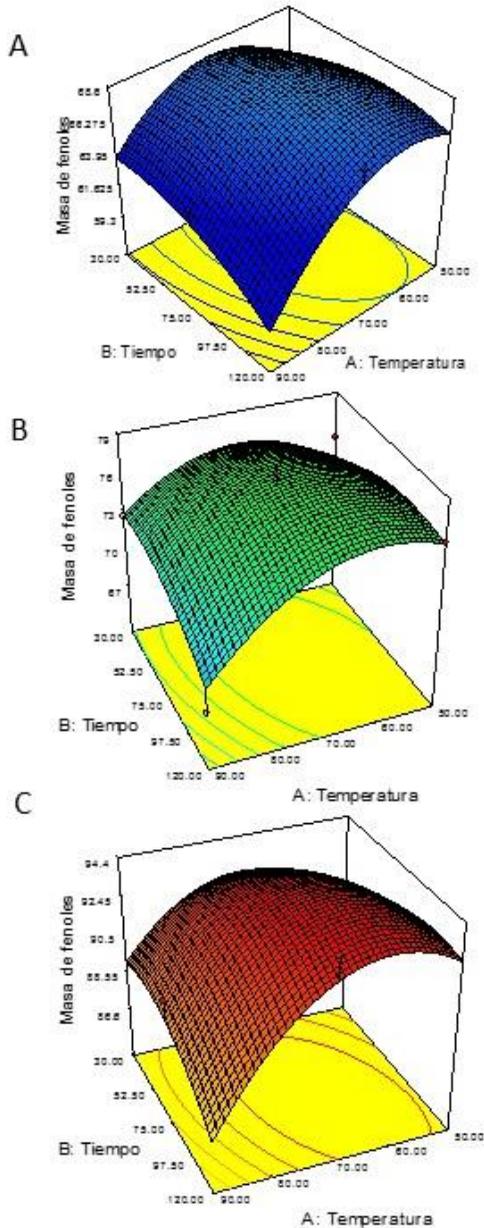


Figura 2. Gráficos de superficie de respuesta de recuperación de fenoles en función de tiempo y temperatura según la humedad inicial del alperujo. A) 70% de humedad B) 80% de humedad C) 90% de humedad.

En conjunto los resultados indican que mediante la aplicación de tratamientos térmicos y posterior centrifugación del alperujo es posible obtener un extracto líquido enriquecido en fenoles. Resulta

por demás interesante que las condiciones experimentales estudiadas y visualizadas como óptimas corresponden a niveles de temperatura y tiempo fácilmente aplicables a mayor escala y con maquinaria existente en la industria olivícola regular.

Este trabajo se encuentra en estado preliminar, por lo que aún deben realizarse estudios sobre tecnologías para extraer y purificar los compuestos fenólicos solubilizados en las fracciones líquidas obtenidas. Finalmente se deben evaluar alternativas para aprovechar el sólido resultante y estudiar el salto de escala que posibilite su aplicación a nivel industrial.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por los proyectos PNNAT 1128042 y por el MZASJ 125512 de INTA. Además, se destaca que el autor principal del trabajo posee una beca doctoral INTA-CONICET.

Referencias

- [1] Gómez del Campo, M., Morales-Sillero, A., Vita Serman, F., Rousseaux, M.C., and Searles, P.S. (2010). *El Olivar en los Valles áridos del Noroeste de Argentina (provincias de Catamarca, La Rioja y San Juan)*. *Olivae* 114, 22-45.
- [2] Monetta, P., Vallejo, M., Cornejo, V., and Gines, L. (2010). *Caracterización del alperujo generado en la Provincia de San Juan*. In: *Jornadas de Ciencia, Técnica y Creación*. Universidad Nacional de San Juan, vol. 1, San Juan, Argentina: UNSJ, 1-3.
- [3] Monetta, P., Bueno, L., Cornejo, V., González-Aubone, F., and Babelis, G. (2012). *Short-term dynamics of soil chemical parameters after application of alperujo in high-density drip-irrigated olive groves in Argentina*. *International Journal of Environmental Studies* 69, 578-588.
- [4] Monetta, P., Ibáñez, A., Fernández-Gnecco, G., Avila, A.D.V., Medina, E., Paroldi, E., Toro, M.E., and Vazquez, F. (2014a). *Preliminary Results of Soil Biological and Chemical Properties after Land Spreading Alperujo in Intensively-Managed Olive Orchards in San Juan, Argentina*. *Acta Horticulturae* 1057, 693-700
- [5] Owen, R.W., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., and Bartsch, H. (2003). *Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes*. *Food Chem Toxicol* 41, 703-717.
- [6] Owen, R.W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., and Bartsch, H. (2000). *Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene*. *Food Chem Toxicol* 38, 647-659.
- [7] Galanakis CM, Kotsiou K. *Recovery of bioactive compounds from olive mill waste* In: *Olive Mill Waste:*

Recent Advances for Sustainable Management.

[Internet]. ; 2017 p. 205-29.

[8] Serrano A, Feroso FG, Alonso-Fariñas B, Rodríguez-Gutierrez G, Fernández-Bolaños J, Borja R. *Phenols recovery after steam explosion of olive mill solid waste and its influence on a subsequent biomethanization process.* BioresourTechnol [Internet]. 2017;243:169-78.

[9] Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood D. R., Prenzler P. D., Robards, K., Stockmann, R. (2005). *Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 23, 823-837.

[10] Lama-Muñoz A, Rodríguez-Gutiérrez G, Rubio-Senent F, Gómez-Carretero A, Fernández-Bolaños J. *New hydrothermal treatment of alperujo enhances the content of bioactive minor components in crude pomace olive oil.* J Agric Food Chem [Internet]. 2011;59(4):1115-23.