



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Departamento de Ingeniería Química,
Ambiental y de los Materiales

TESIS DOCTORAL

•

**VALORIZACIÓN DEL ORUJILLO PARA
OBTENCIÓN DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS Y AZÚCARES**

**PRESENTADA POR:
IRENE GÓMEZ CRUZ**

**DIRIGIDA POR:
Dra. INMACULADA ROMERO PULIDO
Dra. MARÍA DEL MAR CONTRERAS GÁMEZ**

JAÉN, 17 DE MARZO DE 2022



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA,
AMBIENTAL Y DE LOS MATERIALES**

TESIS DOCTORAL

VALORIZACIÓN DEL ORUJILLO PARA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y AZÚCARES

Irene Gómez Cruz, doctoranda del Programa de Doctorado en Energías Renovables presenta esta Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad de Jaén con Mención Internacional.

Jaén, marzo de 2022

Fdo.: Irene Gómez Cruz

Doctoranda en la Universidad de Jaén



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA,
AMBIENTAL Y DE LOS MATERIALES**

TESIS DOCTORAL

VALORIZACIÓN DEL ORUJILLO PARA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y AZÚCARES

Las doctoras Inmaculada Romero Pulido y María del Mar Contreras Gámez, tutora y directoras de la Tesis Doctoral realizada por Irene Gómez Cruz, autorizan su presentación a trámite, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa y así optar al grado de Doctor por la Universidad de Jaén con Mención Internacional.

Jaén, marzo de 2022

Fdo.: Dra. Inmaculada Romero Pulido
Profesora Titular de Universidad en la
Universidad de Jaén

Fdo.: Dra. María del Mar Contreras Gámez
Investigadora Postdoctoral (Ramón y Cajal)
Universidad de Jaén

AGRADECIMIENTOS

En estas primeras palabras quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que me han ayudado y apoyado durante la realización de esta Tesis Doctoral. Me cuesta mucho expresar estas cosas por escrito pero espero que quede reflejado a continuación.

En primer lugar a mis directoras de tesis, a la Dra. Inmaculada Romero Pulido y a la Dra. María del Mar Contreras Gámez, por su ayuda incansable, paciencia, comprensión y por todo el trabajo realizado durante estos años. Gracias por enseñarme tanto, les estoy muy agradecida.

A Cristóbal Cara Corpas, por ayudarme en mis comienzos en el trabajo de laboratorio, por sus buenos consejos y por escucharme siempre.

A los miembros del grupo de investigación Eulogio Castro, Encarnación Ruiz, Manuel Moya, Francisco Espínola, Antonia de Torres y Lola de la Casa, por vuestra ayuda.

A todas las personas que he conocido durante mi estancia en el Laboratorio Nacional de Energía y Geología de Lisboa. En especial, a la Dra. Luisa B. Roseiro, la Dra. Florbela Carvalheiro y el Dr. Luís C. Duarte, por hacerme sentir como en casa, por vuestra ayuda, amabilidad y enseñanzas.

A mis compañeros de laboratorio con los que he compartido tanto tiempo y buenos momentos. A Alfonso, Sonia, Antonio Muñoz, Antonio Lama, Valeria, Karol, Claudia, Rubén, Rocío, Diego, Juan Carlos, Carlos, Manuel, Laura, Yadira y a Carmen, mi compañera de batalla. Y especialmente a Juan Miguel y Minerva, por ayudarme siempre en todo y por vuestro apoyo que de forma tan desinteresa me habéis dado.

A mis padres, Antonia y Miguel, por tanto, por enseñarme desde pequeña el significado de las palabras esfuerzo, trabajo, dedicación y constancia y sobre todo por vuestro cariño. A mi hermana, mi ejemplo a seguir, la artista de mi casa, por ayudarme en todo y estar codo con codo siempre conmigo. Gracias por la portada de mi tesis, sabes que me encanta. Gracias a los tres por estar siempre a mi lado y apoyarme en todo lo que hago, que suerte teneros.

A mis amigas Rocío y Miriam, gracias por vuestra amistad durante tanto años, cariño, ánimo y comprensión siempre que me propongo hacer algo nuevo.

Al resto de mi familia y amigos, muchas gracias por acompañarme en este camino.

Agradecer a la Universidad de Jaén por las ayudas concedidas del Plan Propio de Apoyo a la Investigación con la Acción 4: Ayudas predoctorales para la formación del personal investigador y la Acción 5: Ayuda complementaria a la Acción 4 para estancias breves del Personal Investigador en Formación encaminadas a la obtención del título de Doctor con Mención Internacional. Gracias también al apoyo técnico del CICT de la Universidad de Jaén.

Finalmente, me gustaría agradecer al grupo de Investigación “Ingeniería Química y Ambiental” (TEP-233), por las ayudas para poder realizar cursos y asistir a congresos.

¡Gracias a todos!

A mis padres,
A mi hermana,
A mi Isabelilla,
A mi abuelo Luna.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	7
2. INTRODUCCIÓN	13
2.1. Bioeconomía circular	15
2.1.1. Concepto, programas y estrategias	15
2.1.2. La biomasa en la bioeconomía circular y transición energética	21
2.2. Biomosas generadas en el sector oleícola	27
2.2.1. El olivar y la producción de aceite de oliva	27
2.2.2. Residuos y subproductos del olivar y sus industrias asociadas	30
2.2.2.1. Poda de olivo	30
2.2.2.2. Hojas de olivo. Hojín	33
2.2.2.3. Orujo de aceituna	34
2.2.2.4. Orujillo.....	36
2.2.2.5. Hueso de aceituna	37
2.2.2.6. Aguas residuales	39
2.2.2.7. Pulpa residual.....	39
2.2.3. Composición de la biomasa del olivar	40
2.2.3.1. Celulosa	41
2.2.3.2. Hemicelulosa y pectinas	42
2.2.3.3. Lignina	45
2.2.3.4. Componentes no estructurales	47
2.2.3.4.1. Extractivos	47
2.2.3.4.2. Grasa	49
2.2.3.4.3. Proteínas	49
2.2.3.4.4. Cenizas.....	50

2.3. Compuestos bioactivos de la biomasa del olivar.....	51
2.3.1. Tipos de compuestos bioactivos e interés industrial	51
2.3.1.1. Derivados de azúcares	51
2.3.1.1.1. Polioles.....	51
2.3.1.1.2. Oligosacaridos.....	53
2.3.1.2. Compuestos fenólicos	54
2.3.1.3. Terpenos.....	63
2.3.2. Extracción de compuestos bioactivos.....	67
2.3.2.1. Técnicas de extracción convencionales.....	69
2.3.2.1.1. Maceración.....	69
2.3.2.1.2. Soxhlet.....	70
2.3.2.1.3. Hidrodestilación	70
2.3.2.2. Tecnologías novedosas de extracción o “green”	71
2.3.2.2.1. Extracción por ultrasonidos.....	71
2.3.2.2.2. Extracción por microondas	73
2.3.2.2.3. Electrotecnologías	75
2.3.2.2.4. Extracción con fluidos supercríticos	76
2.3.2.2.5. Extracción asistida por enzimas	77
2.3.2.2.6. Caída de presión instantánea controlada	78
2.3.2.2.7. Extracción con líquidos presurizados o extracción acelerada con solventes.....	78
2.3.2.2.8. Extracción por alta presión hidrostática	80
2.3.2.3. Ejemplos de aplicación en los residuos del sector oleícola.....	80
2.4. Purificación de compuestos bioactivos	83
2.4.1. Tecnología de membranas.....	83
2.4.2. Extracción líquido-líquido.....	86
2.4.3. Empleo de materiales adsorbentes y resinas	88

2.4.4. Aplicación en extractos de residuos del sector oleícola.....	90
2.5. Biorrefinería a partir de biomasa del olivar y de la industria oleícola.....	93
2.5.1. Pretratamiento	94
2.5.1.1. Pretratamientos físicos.....	95
2.5.1.2. Pretratamientos químicos.....	96
2.5.1.2.1. Pretratamientos ácidos	97
2.5.1.2.2. Pretratamientos alcalinos	98
2.5.1.2.3. Pretratamientos con organosolvente	98
2.5.1.2.4. Ozonólisis	99
2.5.1.2.5. Líquidos iónicos.....	99
2.5.1.3. Pretratamientos físico-químicos	100
2.5.1.3.1. Explosión por vapor.....	100
2.5.1.3.2. Agua caliente a presión.....	101
2.5.1.3.3. Explosión con amoníaco.....	102
2.5.1.3.4. Oxidación húmeda	103
2.5.1.3.5. Fluidos supercríticos.....	103
2.5.1.4. Pretratamientos biológicos.....	104
2.5.2. Hidrólisis enzimática	106
2.5.3. Fermentación. Aplicación para la obtención de bioetanol.....	107
2.5.3.1. Bioproceso consolidado.....	110
2.5.4. Pretratamientos y fermentación aplicados a las biomásas del olivo	112
2.6. Biomásas del olivar para un modelo de biorrefinería	115
2.6.1. Poda de olivo.....	116
2.6.2. Hueso de aceituna	119
2.6.3. Orujo de aceituna y orujillo	119
2.6.4. Aguas residuales de almazara	121
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	123

4. RESUMEN DE RESULTADOS.....	127
4.1. Caracterización química de la materia prima	136
4.2. Extracción de compuestos bioactivos: técnicas convencionales y no convencionales	140
4.2.2. Optimización de las condiciones de extracción	141
4.2.3. Extractos de orujillo	145
4.2.3.1. Rendimiento de extracción y contenido en compuestos fenólicos.....	145
4.2.3.2. Evaluación de la actividad antioxidante.....	149
4.2.3.3. Perfil fenólico de los extractos	150
4.2.3.4. Evaluación del contenido de manitol y glucosa en los extractos	153
4.2.4. Sólido de orujillo extraído	154
4.2.4.1. Composición química y elemental	154
4.2.4.2. Evaluación de la fracción sólida extraída mediante microscopía electrónica de barrido	157
4.2.4.3. Extracción de triterpenos del sólido de orujillo extraído	158
4.3. Deslignificación del orujillo extraído	161
4.3.1. Caracterización de licores de pretratamiento	162
4.3.2. Sólidos de pretratamiento	163
4.3.3. Hidrólisis enzimática de los sólidos pretratados	167
4.3.4. Obtención y caracterización de ligninas.....	168
4.3.4.1. Estrategia 1 de proceso.....	168
4.3.4.2. Estrategia 2 de proceso.....	170
4.3.4.3. Características químicas de las ligninas	171
4.4. Purificación.....	173
4.4.1. Tecnología de membranas	173
4.4.1.1. Procedimiento experimental.....	173
4.4.1.2. Recuperación de los compuestos de interés	175
4.4.2.1. Procedimiento experimental.....	177

4.4.2.2. Recuperación de compuestos fenólicos totales e hidroxitirosol	181
4.4.2.3. Evaluación de la actividad antioxidante	188
4.4.2.4. Evaluación de glucosa y manitol	189
4.4.2.5. Perfil de compuestos fenólicos de los extractos purificados	193
4.5. Propuesta de valorización del orujillo.....	195
5. CONCLUSIONES	199
CONCLUSIONS	203
6. BIBLIOGRAFÍA	207
ANEXOS	253
ARTÍCULO 1. Valorisation of exhausted olive pomace by an eco-friendly solvent extraction process of natural antioxidants	255
ARTÍCULO 2. Recovery of bioactive compounds from industrial exhausted olive pomace through ultrasound-assisted extraction.....	277
ARTÍCULO 3. Sequential extraction of hydroxytyrosol, mannitol and triterpenic acids using a green optimized procedure based on ultrasound.....	305
ARTÍCULO 4. Microwave-assisted water extraction of bioactive compounds and protein from exhausted olive pomace in a biorefinery context.....	329
ARTÍCULO 5. A biorefinery approach to obtain antioxidants, lignin and sugars from exhausted olive pomace.....	373
ARTÍCULO 6. Fractionation of exhausted olive pomace by ethanol organosolv process for bioactive compound	389
ARTÍCULO 7. Purification strategies of bioactive compounds from exhausted olive pomace, with a special focus on hydroxytyrosol and its separation from glucose and mannitol.....	409
OTRAS PUBLICACIONES.....	449

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de bioeconomía.	16
Figura 2. Objetivos de desarrollo sostenible.	18
Figura 3. Esquema de economía lineal y economía circular.	18
Figura 4. Objetivos de la Estrategia Española de Economía Circular para 2030	19
Figura 5. Marco estratégico e instrumental de la Estrategia de Bioeconomía Circular 2030.	20
Figura 6. Rutas de obtención de bioproductos y mercados de consumo en Andalucía..	21
Figura 7. Consumo mundial de combustibles fósiles.	22
Figura 8. Producción de energía primaria (% del total, basado en toneladas de equivalente de petróleo).	25
Figura 9. Distribución municipal de la superficie de olivar en Andalucía en función del porcentaje que representa respecto a la Superficie Agraria Útil	28
Figura 10. Esquema simplificado de producción de aceite de oliva y de orujo y los residuos/subproductos obtenidos.	29
Figura 11. Sistemas de separación de aceite de oliva de dos y tres fases: agua necesaria, cantidad de aceite y de residuos generados y sus principales características.	35
Figura 12. Diagrama simplificado de la extracción de aceite de orujo de oliva..	36
Figura 13. Disposición espacial de la celulosa, hemicelulosa y lignina en la pared celular de la biomasa lignocelulósica.	40
Figura 14. Componentes principales de la biomasa del olivar.	41
Figura 15. Estructura de la cadena molecular de celulosa..	42
Figura 16. Constitución de la celulosa..	42
Figura 17. Estructura química de la hemicelulosa..	43
Figura 18. Localización de la celulosa, hemicelulosa y pectina en la pared celular vegetal.	45
Figura 19. Unidades y monómeros básicos de la lignina.	46
Figura 20. Composición de los extractivos acuosos de los residuos y subproductos del olivar y del aceite de oliva.	48
Figura 21. Estructura química de los polioles.	52
Figura 22. Estructura química de los principales compuestos fenólicos presentes en los subproductos y residuos de la industria del olivar.	56
Figura 23. Estructura química de los principales tipos de flavonoides.	58

Figura 24. Estructura química del resveratrol.....	59
Figura 25. Estructura química de un galotanino y una procianidina.	59
Figura 26. Fórmula estructural del isopreno.....	64
Figura 27. Estructura química de compuestos triterpénicos que pueden estar presentes en el aceite y/o residuos del olivar y de la industria oleícola.	64
Figura 28. Equipo experimental de extracción Soxhlet.....	70
Figura 29. Fenómeno de cavitación en ultrasonidos.....	72
Figura 30. Equipo experimental de ultrasonidos: baño (a) y sonda (b).....	73
Figura 31. Diagrama esquemático de una configuración de recipiente abierto (a) y recipiente cerrado (b) para extracción asistida por microondas.	74
Figura 32. Equipo de campos eléctricos pulsados (a) y descargas eléctricas de alto voltaje (b).....	75
Figura 33. Diagrama esquemático del sistema de extracción con fluidos supercríticos.	76
Figura 34. Diagrama esquemático de un reactor de descompresión instantánea controlada.....	78
Figura 35. Punto crítico líquido-vapor del agua y del CO ₂ en un diagrama de fases presión-temperatura..	79
Figura 36. Componentes que intervienen en el proceso de separación por membranas.	84
Figura 37. Tipos de procesos de membranas para los que la fuerza impulsora es un gradiente de presión y tipo de compuestos que se pueden separar.....	86
Figura 38. Esquema de extracción líquido-líquido a escala laboratorio.....	87
Figura 39. Aplicación de la operación de adsorción para separación de biocompuestos: purificación de extracto acuoso de orujillo.....	89
Figura 40. Esquema del proceso de purificación de compuestos fenólicos de residuos/subproductos de la industria del olivar.....	90
Figura 41. Esquema de la acción del pretratamiento sobre materiales lignocelulósicos	94
Figura 42. Clasificación de los pretratamientos aplicados sobre materiales lignocelulósicos.	95
Figura 43. Esquema general de la obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica.	109
Figura 44. Esquema general de una biorrefinería lignocelulósica.....	116

Figura 45. Esquemas de biorrefinerías propuestas a partir de poda de olivo.....	118
Figura 46. Esquemas de biorrefinerías propuestas a partir de hueso de aceituna, orujo y aguas de almazara.....	122
Figura 47. Esquema simplificado del procedimiento experimental.....	133
Figura 48. Estrategia 1 de proceso: extracción acuosa del orujillo, en una etapa, seguida de pretratamientos de deslignificación, recuperación de lignina solubilizada e hidrólisis enzimática del sólido pretratado.....	134
Figura 49. Estrategia 2 de proceso: extracción acuosa del orujillo, en dos etapas, seguida de pretratamientos de deslignificación, recuperación de lignina solubilizada e hidrólisis enzimática del sólido pretratado.....	135
Figura 50. Procedimiento de caracterización del orujillo de acuerdo al protocolo NREL.	137
Figura 51. Composición química del orujillo, orujo, poda de olivo, hojín y hueso (adaptado de Manzanares et al., 2017; Manzanares et al., 2020; Negro et al., 2017; Padilla-Rascón et al., 2021; Rodríguez et al., 2007).	139
Figura 52. Esquema del procedimiento experimental y técnicas de caracterización..	145
Figura 53. Cromatograma (280 nm) (a) y electroferograma (200 nm) (b) del extracto acuoso obtenido a partir de la primera extracción acuosa de orujillo peletizado (85°C, 90 min, 10% sólidos).....	151
Figura 54. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de orujillo original peletizado (a) y molido (b), y del orujillo extraído por ultrasonidos tipo sonda de alta potencia (c) y (d) y microondas (e).	158
Figura 55. Contenido total en fenoles y actividad antioxidante de los licores de pretratamientos.	163
Figura 56. Digestibilidad enzimática de los sólidos pretratados, expresada como % de glucosa liberada con respecto al contenido de glucosa en estos sólidos, y rendimiento de hidrólisis enzimática, expresado como % de glucosa liberada con respecto al contenido de glucosa en el orujillo.	168
Figura 57. Proceso de purificación del extracto de orujillo mediante tecnología de membranas.	174
Figura 58. Métodos empleados para la purificación de compuestos fenólicos mediante extracción en fase sólida empleando diferentes materiales adsorbentes y resinas.....	180
Figura 59. Contenido de compuestos fenólicos totales (a) y hidroxitirosol (b) (mg/g extracto) en los extractos purificados con materiales adsorbentes y resinas.....	187

Figura 60. Actividad antioxidante FRAP (a) y ABTS (b) (mg/g extracto) en los extractos purificados obtenidos empleando materiales adsorbentes y resinas.	189
Figura 61. Resumen de la composición de los extractos purificados: contenido de fenoles totales (TPC), contenido de glucosa y manitol (barras) y contenido de hidroxitirosol (número encima de cada barra).....	193
Figura 62. Cromatogramas (280 nm) de extractos purificados mediante diferentes técnicas.....	194
Figura 63. Propuesta de biorrefinería a partir de orujillo.	197

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la biomasa en función de su composición.	26
Tabla 2. Composición de las biomásas del olivar (% , en peso seco).	31
Tabla 3. Contenido en azúcares hemicelulósicos de los subproductos y residuos de la industria del olivar.	44
Tabla 4. Contenido (% , peso seco) de extractivos acuosos y etanólicos en los subproductos y residuos de la industria del olivar.	48
Tabla 5. Obtención de manitol y oligosacáridos a partir de residuos del olivar y de la industria oleícola mediante diferentes métodos de extracción.	54
Tabla 6. Compuestos fenólicos identificados en residuos y subproductos del olivar y de la industria oleícola.	61
Tabla 7. Ensayos <i>in vivo</i> y clínicos del hidroxitirosol (HT).	63
Tabla 8. Obtención de triterpenos de residuos del olivar y de la industria oleícola mediante diferentes métodos de extracción sólido-líquido.	66
Tabla 9. Ventajas e inconvenientes de las técnicas convencionales y nuevas tecnologías de extracción (basada en Buckow et al., 2010; Croxatto et al., 2021; Lavilla y Bendicho, 2017; Yahya et al., 2018).	68
Tabla 10. Obtención de compuestos fenólicos de residuos del olivar y de la industria oleícola mediante diferentes tecnologías de extracción.	81
Tabla 11. Procesos de separación por membranas que existen dependiendo de la fuerza impulsora aplicada en el proceso (basada en Wang y Tang (2011)).	84
Tabla 12. Tecnologías de purificación de compuestos bioactivos de la biomasa del olivar.	92
Tabla 13. Principales ventajas y desventajas de los pretratamientos que se pueden aplicar a las biomásas lignocelulósicas (basada en Alvira et al., 2010; Bhatt y Shilpa, 2015).	105
Tabla 14. Principales ventajas y desventajas de las diferentes configuraciones de proceso que integran las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación (Binod et al., 2011; Bu et al., 2019; Zabed et al., 2016).	111
Tabla 15. Bioproductos obtenidos a partir de residuos/subproductos del olivar y de la industria oleícola mediante pretratamiento y fermentación.	113
Tabla 16. Composición química y análisis elemental (% , peso seco) del orujillo.	138
Tabla 17. Rendimiento de extracción, contenido total de compuestos fenólicos (TPC) y capacidad antioxidante a 55 °C durante 90 min y 15% de sólidos.	141

Tabla 18. Variables de operación empleadas en las diferentes técnicas de extracción y condiciones optimizadas.	142
Tabla 19. Rendimiento de extracción, contenido en compuestos fenólicos (TPC) e hidroxitirosol (HT) de los extractos de orujillo obtenidos con diferentes tecnologías.	148
Tabla 20. Capacidad antioxidante de los extractos de orujillo obtenidos en las diferentes extracciones.	150
Tabla 21. Compuestos fenólicos identificados por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en extractos de orujillo.....	152
Tabla 22. Cantidad de manitol y glucosa en los extractos de orujillo obtenidos en las diferentes extracciones aplicadas.....	154
Tabla 23. Composición química y análisis elemental (% peso seco) de los residuos de extracción (sólidos de orujillo extraídos).....	156
Tabla 24. Rendimiento de extracción y contenido de ácido maslínico y oleanólico en los extractos etanólicos de orujillo original y sólidos extraídos tras tratamiento por ultrasonidos y microondas.	159
Tabla 25. Composición química (% peso seco) de los sólidos obtenidos tras el pretratamiento.	166
Tabla 26. Composición química y elemental de las muestras de lignina obtenidas.....	169
Tabla 27. Contenido fenólico total (TPC) y actividad antioxidante de los productos de lignina.....	170
70	
Tabla 28. Concentración de compuestos fenólicos totales (TPC), hidroxitirosol (HT), capacidad antioxidante, glucosa y manitol, porcentaje de rechazo y recuperación obtenidos tras la ultrafiltración y nanofiltración.....	176
Tabla 29. Materiales adsorbentes y resinas de intercambio iónico empleadas para la purificación de compuestos fenólicos.....	179
Tabla 30. Recuperación de TPC tras la extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida del extracto de orujillo con materiales adsorbentes y resinas.	182
Tabla 31. Recuperación de hidroxitirosol tras la extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida del extracto de orujillo con materiales adsorbentes y resinas.	185
Tabla 32. Recuperación de glucosa tras la extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida del extracto de orujillo con materiales adsorbentes y resinas.	191
Tabla 33. Recuperación de manitol tras la extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida del extracto de orujillo con materiales adsorbentes y resinas.	192

ABREVIATURAS

AEMO: Asociación Española de Municipios del Olivo

AFEX: explosión con amoníaco

CMNUCC: Convención Marco de la Naciones Unidas sobre el Cambio Climático

CZE: electroforesis en zona capilar

DAD: detector de diodos array

EABC: Estrategia Andaluza de Bioeconomía Circular

ECA: Agencia de Crédito a la Exportación

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

FDA: “Food and Drug Administration”

FEDER: Fondo Europeo de Desarrollo Regional

FRAP: poder antioxidante reductor férrico

GAE: equivalentes de ácido gálico

GEIs: gases de efecto invernadero

HCFS: hidrólisis y co-fermentación secuenciales

HFS: hidrólisis y fermentación secuenciales

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HT: hidroxitirosol

IACGB: International Advisory Council on Global Bioeconomy

IEA: Agencia Internacional de la Energía

IRENA: Agencia Internacional de las Energías Renovables

LAI: lignina ácido insoluble

LAS: lignina ácido soluble

LNEG: Laboratorio Nacional de Energía y Geología

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

MITECO: Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico

Mn: número molecular medio

MS: espectrometría de masas

MSR: metodología de superficie de respuesta

Mw: peso molecular

N.D.: no detectado

NREL: Laboratorio Nacional de Energías Renovables

ODS: objetivos de desarrollo sostenible

ONU: Organización de las Naciones Unidas

PDR: programa de desarrollo rural

PI: índice polidispersidad

PNIEC: Plan Nacional Integrado de Energía y Clima en España

Pyr-GC-MS: pirólisis-cromatografía de gases/espectrometría de masas

RID: detector de índice de refracción

SAU: superficie agraria útil

SCFS: sacarificación y co-fermentación simultáneas

SEM: microscopía electrónica de barrido

SFS: sacarificación y fermentación simultáneas

TE: equivalentes de trolox

TPC: contenido total de compuestos fenólicos

1. RESUMEN

La presente Tesis Doctoral de título “Valorización del orujillo para obtención de compuestos bioactivos y azúcares” tiene como objetivo el aprovechamiento de este residuo agroindustrial generado en el sector del aceite de oliva contribuyendo así a su gestión con criterios de sostenibilidad. Este trabajo se enmarca en la línea de investigación del Programa de Doctorado en Energías Renovables de la Universidad de Jaén “Investigación en Recursos Biomásicos” y se ha desarrollado en el grupo de investigación “Ingeniería Química y Ambiental” (TEP-233), vinculado al Centro de Estudios Avanzados en Ciencias de la Tierra, Energía y Medio Ambiente (CEACTEMA), de la Universidad de Jaén. Además, varias de las actividades que componen esta investigación se han desarrollado en el marco del proyecto “Avances hacia una biorrefinería flexible en materias primas y productos en regiones con alta densidad de biomasa agroindustrial: Caso del olivar” (Ref. ENE2017-85819-C2-1-R).

El orujillo es un residuo lignocelulósico que se genera en las extractoras de orujo como resultado del proceso de secado y posterior extracción de aceite residual del orujo de aceituna. En España, cada año se generan grandes cantidades de este residuo y, en la actualidad, se emplea como combustible en las plantas donde se genera y en pequeñas calderas domésticas, aunque con un uso limitado debido a la emisión de gases contaminantes durante su combustión. El orujillo está compuesto principalmente de celulosa, hemicelulosa, lignina y un alto contenido en extractivos, por lo que constituye una materia prima de interés para extracción de compuestos bioactivos y producción de bioenergía. En la presente Tesis Doctoral se pretende valorizar este residuo mediante su fraccionamiento para la obtención de hidroxitirosol, manitol, ácidos triterpénicos, y azúcares. Para ello, se han evaluado diferentes técnicas de extracción de compuestos bioactivos (convencionales y no convencionales) así como deslignificación con organosolvente en el marco de una biorrefinería basada en esta materia prima residual, con el fin de establecer un proceso viable y respetuoso con el medio ambiente que a su vez genere valor en el sector del aceite de oliva.

En primer lugar, se caracterizó químicamente el orujillo. A continuación, se evaluó el efecto de diferentes disolventes (agua, agua acidificada con ácido acético, etanol y acetona) sobre orujillo peletizado, a 55°C. Los resultados obtenidos mostraron que el agua era un excelente solvente de extracción para el orujillo con resultados similares a los de los solventes orgánicos ensayados. Por ello, se estudió la extracción acuosa convencional del orujillo peletizado mediante un diseño de experimentos Box-Behnken, evaluando la

influencia de las principales variables de proceso, temperatura (25-85°C), tiempo de extracción (30-90 min) y carga de sólidos (5-25%, m/v). Mediante la metodología de superficie de respuesta, se determinaron como condiciones óptimas para dicha extracción acuosa: 85°C, 90 min, 10% sólidos.

Posteriormente, se estudiaron diferentes “tecnologías verdes” para la extracción de compuestos bioactivos mediante diseños de experimentos, evaluando, en cada caso, la influencia de las principales variables experimentales que fueron optimizadas por metodología de superficie de respuesta. En primer lugar, se realizó una extracción al orujillo molido en un baño de ultrasonidos según un diseño de experimentos Box-Behnken. Se evaluó el efecto de la concentración de acetona (20-80%, v/v), tiempo de extracción (10-60 min) y carga de sólidos (2-15%, m/v) y, se determinaron los valores óptimos para dichas variables: 40% acetona, 43 min y 8,6% carga de sólidos. Con el fin de acortar el tiempo de extracción y con base en las condiciones óptimas obtenidas por el diseño Box-Behnken, se realizó un diseño factorial de dos niveles empleando un equipo de ultrasonidos de tipo sonda de baja potencia (150 W). La carga de sólidos (8,6%, m/v) y el porcentaje de acetona (40%, v/v) se fijaron de acuerdo con las condiciones previamente optimizadas en el baño de ultrasonidos y se estudió la influencia del tiempo de extracción (2-12 min) y la amplitud (30-70%) sobre las variables de respuesta de interés. A continuación, se realizó una extracción del orujillo peletizado con ultrasonidos tipo sonda de alta potencia (550 W) empleando agua como disolvente. Se estudió el efecto de la amplitud (20-80%), tiempo de extracción (2-18 min) y carga de sólidos (2-15%, m/v) mediante un diseño de experimentos Box-Behnken y se optimizaron las condiciones de operación (100°C, 16 min, 12% sólidos). En un estudio posterior, se realizó una extracción del orujillo molido mediante la tecnología de microondas empleando agua como disolvente. Se estudió el efecto de la temperatura (40-100°C), tiempo de extracción (4-40 min) y carga de sólidos (3-15%, m/v) y, se determinaron como valores óptimos: 100°C, 16 min y 12% sólidos.

Los extractos obtenidos se caracterizaron mediante diferentes técnicas analíticas, determinando en cada caso, el rendimiento de extracción, la concentración y contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante. Los sólidos de orujillo extraído se caracterizaron mediante análisis químico y elemental y, en algunos casos, mediante microscopía electrónica de barrido.

Los mayores valores de compuestos fenólicos (expresados como equivalentes de ácido gálico), en torno a 45 mg/g orujillo, se obtuvieron con la extracción acuosa convencional y la extracción con ultrasonidos de tipo sonda de baja potencia empleando acetona como disolvente. El máximo contenido de hidroxitirosol se obtuvo en la extracción acuosa convencional (6,3 mg/g orujillo) y empleando ultrasonidos de sonda de alta potencia con agua (6,4 mg/g orujillo). En estas extracciones, también se obtuvieron concentraciones de manitol, entre 55,2 y 69,7 mg/g orujillo.

Con el fin de recuperar otros compuestos bioactivos del orujillo, los sólidos obtenidos tras la extracción con ultrasonidos, tipo sonda de alta potencia, y microondas con agua se sometieron a una maceración con etanol y se obtuvieron en torno a 9,0 mg ácido maslínico/g de orujillo y 3 mg ácido oleanólico/g de orujillo.

Para completar el proceso de valorización del orujillo, se ensayaron dos estrategias de proceso basadas en una extracción convencional de compuestos fenólicos, seguida de una etapa de deslignificación del orujillo extraído, y una posterior hidrólisis enzimática del orujillo deslignificado. En la primera estrategia se aplicó una extracción acuosa convencional, en las condiciones previamente optimizadas, seguida de una etapa de deslignificación sobre el sólido extraído resultante (tratamiento organosolvente con etanol al 50% y 60%, a distintas temperaturas). La segunda estrategia de proceso ensayada incluye una extracción en dos etapas, seguida de una etapa de deslignificación con etanol al 50% a distintas temperaturas. Como primera etapa, se mantuvo la extracción acuosa previamente optimizada. En la segunda etapa de extracción, se evaluó el empleo de agua o una disolución de acetona al 70%. En ambas estrategias, las ligninas solubilizadas en los tratamientos con organosolvente y las obtenidas tras la sacarificación enzimática del orujillo pretratado fueron caracterizadas mediante diversas técnicas analíticas. El pretratamiento con etanol al 50% (v/v) catalizado con ácido sulfúrico al 1% (v/v) a 130°C durante 60 min (Estrategia 1) consiguió una deslignificación del 23% y permitió obtener, mediante precipitación ácida, una lignina antioxidante, rica en unidades guaiacilo, con una pureza cercana al 90%. Por otra parte, la fracción sólida enriquecida en celulosa, con una digestibilidad del 76,5%, se hidrolizó enzimáticamente generando un hidrolizado rico en glucosa y un sólido rico en lignina (78% pureza), con propiedades antioxidantes.

Finalmente, el extracto acuoso de orujillo obtenido en la extracción convencional, en condiciones óptimas, se seleccionó para evaluar la purificación de compuestos bioactivos,

fundamentalmente hidroxitirosol. Para ello se ensayaron diferentes técnicas de separación con membranas (ultrafiltración y nanofiltración), extracción líquido-líquido y separación con materiales adsorbentes y resinas. La tecnología de membranas no fue satisfactoria para la purificación del hidroxitirosol debido a la dificultad para separarlo de compuestos de similar peso molecular, como la glucosa y el manitol. Sin embargo, la extracción líquido-líquido con acetato de etilo y la adsorción, en general, resultaron técnicas eficaces para la obtención de extractos purificados en compuestos fenólicos totales e hidroxitirosol. En particular, el material adsorbente Discovery DSC-8 rindió un extracto purificado en hidroxitirosol, con una concentración de 298,7 mg/g extracto a partir de un extracto inicial con 15,4 mg hidroxitirosol/g extracto.

ABSTRACT

This Doctoral Thesis entitled “Valorization of exhausted olive pomace for obtaining bioactive compounds and sugars” aims to use this agro-industrial waste generated in the olive oil sector, and contribute to its management with sustainability criteria. This work is part of the research line of the Doctorate Program in Renewable Energies of the Universidad de Jaén "Research on biomass resources". It has been carried out in the research group "Chemical and Environmental Engineering" (TEP-233), linked to the Center for Advanced Studies on Earth Sciences, Energy and Environment (CEACTEMA), of the Universidad de Jaén. This research has been carried out within the framework of the research project “Advances towards a flexible multi-feedstock, multi-product biorefinery in regions with high density of agro-industrial biomass: the olive case” (Ref. ENE2017-85819-C2-1-R) funded by the Ministry of Science and Innovation.

Exhausted olive pomace is a lignocellulosic waste generated in the olive pomace extracting industries as a result of the drying process and subsequent extraction of residual oil from olive pomace. In Spain, large quantities of exhausted olive pomace are generated each year. Nowadays, this waste is used as biofuel in the extracting plants and in small domestic boilers, which represents a limited use due to pollutant gas emissions during its combustion. EOP is mainly composed of cellulose, hemicellulose, lignin and a high content of extractives, making it an interesting raw material for the extraction of bioactive compounds and bioenergy production. In this Doctoral Thesis, the aim is to valorize this residue by fractioning it to obtain hydroxytyrosol, mannitol, triterpenic acids, and sugars. For this purpose, different extraction techniques (conventional and non-conventional) as well as an organosolvent delignification have been evaluated in the context of a biorefinery based on this waste biomass, in order to establish a viable and environmentally friendly process that can generate value in the olive oil sector.

Firstly, EOP was chemically characterized. Then, the effect of different solvents (water, water acidified with acetic acid, ethanol and acetone) on the pelletized biomass at 55°C was evaluated. The results obtained showed that water was an excellent extraction solvent for this biomass and similar or better results than those of the organic solvents were obtained. Therefore, conventional aqueous extraction of the pelletized biomass was studied according to a Box-Behnken experimental design and the influence of the main process variables, temperature (25-85°C), extraction time (30-90 min) and solids loading (5-25%, w/v) was evaluated. Extraction yield, concentration and content of phenolic compounds and antioxidant activity of the extracts were chosen as responses. Response

surface methodology allowed to determine the optimum conditions for the aqueous extraction of exhausted olive pomace: 85°C, 90 min, 10% solids.

Likewise, "green technologies" for the extraction of bioactive compounds from exhausted olive pomace were studied according to experimental designs. A bath-type ultrasound-assisted extraction of biomass was performed according to a Box-Behnken experimental design. The effect of acetone concentration (20-80%, v/v), extraction time (10-60 min) and solids loading (2-15%, w/v) was evaluated and the optimum values for these variables were determined: 40% acetone, 43 min and 8.6% solids. In order to shorten the extraction time and based on these optimum conditions, a probe-type ultrasound-assisted extraction at low power (150 W) was carried out according to a two-level factorial. Thus, the solids loading (8.6%, w/v) and the acetone concentration (40%, v/v) were set and the influence of the extraction time (2-12 min) and the amplitude (30-70%) on the response variables was studied. Then, the probe-type ultrasound-assisted extraction at high power (550 W) of the pelletized biomass using water as solvent was studied. In this case, the effect of amplitude (20-80%), extraction time (2-18 min) and solids loading (2-15%, w/v) was evaluated using a Box-Behnken experimental design, and the operating conditions were optimized (100°C, 16 min, 12% solids). In a subsequent study, the microwave-assisted extraction using water as solvent was tested for EOP. The effect of the temperature (40-100°C), extraction time (4-40 min) and solids loading (3-15%, w/v) was studied and the optimum values were determined to be 100°C, 16 min and 12% solids.

The resulting extracts were characterized using different analytical techniques. The resulting solid fractions were characterized by chemical and elemental analysis and, in some cases, by scanning electron microscopy. The highest values of phenolic compounds (expressed as gallic acid equivalents), around 45 mg/g biomass, were obtained with conventional aqueous extraction and low-power probe-type ultrasound-assisted extraction using acetone as solvent. The highest hydroxytyrosol content was obtained in the conventional aqueous extraction and probe-type ultrasound-assisted extraction at high-power with water, around 6.4 mg/g biomass. In these extractions, mannitol concentrations between 55.2 and 69.7 mg/g biomass were also obtained.

Additionally, to recover other bioactive compounds from exhausted olive pomace, the solids obtained after probe-type ultrasound-assisted extraction at high power, and microwave-assisted extraction using water as solvent in both cases were subjected to

maceration with ethanol and about 9.0 mg maslinic acid and 3 mg oleanolic acid/g EOP were obtained.

Two process strategies were tested for the exhausted olive pomace valorization. Both schemes were based on a conventional extraction of phenolic compounds, followed by a delignification step of the extracted biomass, and the enzymatic hydrolysis of the delignified biomass. Strategy 1 was composed by a conventional aqueous extraction, under previously optimized conditions, followed by a delignification step on the resulting extracted solid (organosolvent treatment with 50% and 60% ethanol, at different temperatures). Strategy 2 included a two-stage extraction (water or 70% acetone) followed by a delignification (50% ethanol at different temperatures). In both strategies, the lignins solubilized in the organosolvent treatments and those obtained after enzymatic saccharification were characterized. Strategy 1, including a treatment with 50% (w/v) ethanol catalyzed with 1% (w/v) sulfuric acid at 130°C for 60 min, was selected. It achieved a delignification of 23% and yielded, by acid precipitation, an antioxidant lignin, rich in guaiacyl units (purity close to 90%). On the other hand, the cellulose-rich solid fraction (76.5% enzymatic digestibility), was hydrolyzed and a glucose solution and a lignin-rich solid (78% purity), with antioxidant properties were generated.

Finally, the extract obtained in conventional aqueous extraction, under optimal conditions, was selected to evaluate the purification their bioactive compounds, mainly hydroxytyrosol. For this purpose, membrane separation techniques (ultrafiltration and nanofiltration), liquid-liquid extraction and separation with adsorbent materials and resins were tested. Membrane technology was not satisfactory for the purification of hydroxytyrosol due to the difficulty in separating it from compounds of similar molecular weight, such as glucose and mannitol. However, liquid-liquid extraction with ethyl acetate and adsorption in general were effective in obtaining purified extracts of phenolic compounds. In particular, the Discovery DSC-8 adsorbent material yielded an extract purified in hydroxytyrosol, with a concentration of 298.7 mg/g extract from the initial extract with 15.4 mg hydroxytyrosol/g extract.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Bioeconomía circular

2.1.1. Concepto, programas y estrategias

El Parlamento Europeo define la economía circular como un “sistema de aprovechamiento de recursos que implica la reutilización y el reciclaje de materiales existentes para crear un producto de valor añadido y así extender el ciclo de vida de ese material”.

Dependiendo de los recursos de cada lugar, la bioeconomía se define de diversas maneras, aunque las políticas empleadas engloban siempre la innovación, la sostenibilidad, el crecimiento y el empleo (Hodson de Jaramillo, 2018). En particular, el comunicado de la Cumbre Mundial de Bioeconomía de 2020 define la bioeconomía como “la producción, utilización, conservación y regeneración de recursos biológicos, incluidos el conocimiento relacionado con la ciencia, la tecnología y la innovación, para proporcionar soluciones sostenibles (información, productos, procesos y servicios) dentro y entre todos los sectores económicos y permitir una transformación a una economía sostenible”. La Figura 1 esquematiza el concepto de bioeconomía basado en diferentes biomasas renovables, incluyendo la biomasa derivada de los sectores primarios y secundarios que permitan obtener bioproductos con utilidad en diversos sectores en un marco de sostenibilidad y competitividad.

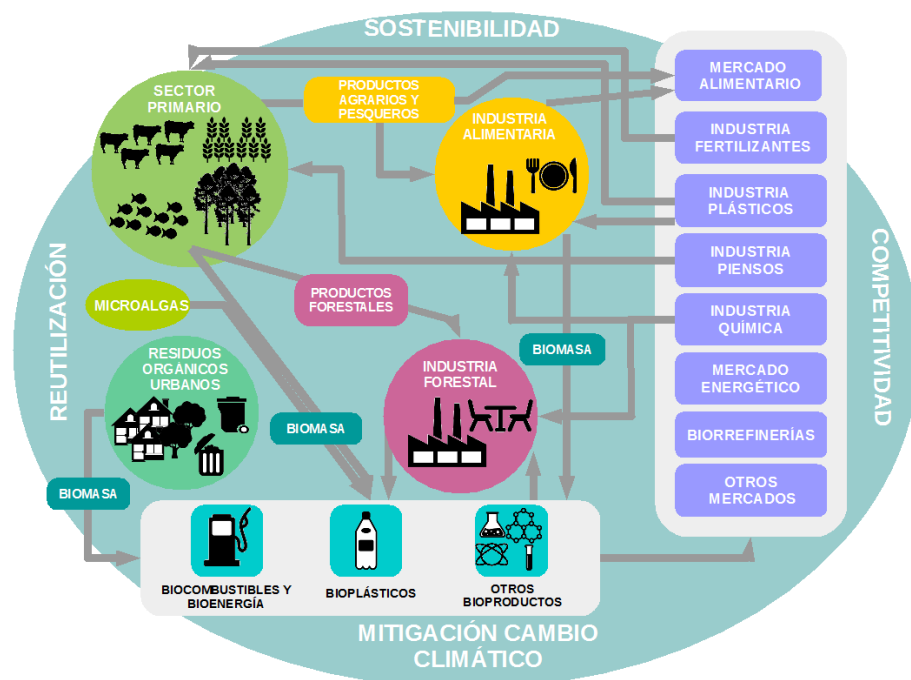


Figura 1. Esquema de bioeconomía. Fuente: Junta de Andalucía, 2018.

En 1993, la **Comisión Europea** estableció las primeras bases de la bioeconomía. En estas se destacaba la necesidad de invertir en conocimiento y especialmente en ciencia para la innovación y crecimiento económico (Hodson de Jaramillo, 2018). La implementación industrial del conocimiento se produjo gracias a los planes de biotecnología y ciencias biológicas. En este sentido, la política de investigación se reformó en el V Programa Marco de la Unión Europea (UE) (1998-2002) debido a la formulación de las 6 acciones claves. Estas acciones se basaban en pasar de investigación básica a aplicaciones reales con el fin de conseguir un desarrollo tecnológico e industrial y finalmente, la explotación y comercialización industrial. Una de las acciones seleccionadas fue la “Fábrica celular” (Cell Factory) cuyo objetivo era utilizar la célula como fábrica para generar nuevos productos farmacéuticos, alimentos nutritivos, tecnologías capaces de degradar compuestos recalcitrantes, enzimas industriales respetuosas con el medio ambiente y bioproductos con alto valor añadido (Patermann y Aguilar, 2018). Este hecho produjo el avance de tecnologías innovadoras y el desarrollo y fortalecimiento en ciencia, tecnología e innovación.

Posteriormente, en 2005 se celebró en Bruselas la Conferencia en Bioeconomía Basada en el Conocimiento (Knowledge Based Bio-Economy) que estableció unas políticas y estrategias sobre bioeconomía que se mantuvieron hasta 2007 cuando se inició VII Programa Marco en enero de 2007 (Patermann y Aguilar, 2018). En 2012, la Unión

Europea estableció la estrategia de bioeconomía en el documento “Innovación para el crecimiento sostenible: una bioeconomía para Europa”, cuya finalidad es el uso de nuevas tecnologías y la unión entre la ciencia y la industria (Małyska y Jacobi, 2018).

Otra estrategia adoptada por la UE fue la creación de una asociación público-privada de bioindustrias denominada Bio-Based Industries Joint Undertaking (BBIJU) (Ruiz-Sierra et al., 2012). Se implantó en 2014 y sus objetivos son proporcionar un marco estable a largo plazo que permita la programación estratégica con la industria y que proporcione estabilidad para lograr una unión colaborativa entre todos los sectores industriales. Las acciones de innovación aplicadas en este ámbito abordan toda la cadena de valor, desde el abastecimiento de materias primas hasta las aplicaciones de mercado (Mengal et al., 2018). El Programa de inversión en investigación e innovación Horizonte 2020 (2014-2020) se constituyó como un programa cuyas áreas principales eran la ciencia excelente, el liderazgo industrial y los desafíos de la sociedad, también dirigido al desarrollo de un modelo basado en la bioeconomía.

Con el objetivo de erradicar la pobreza, cuidar nuestro hábitat y el bienestar de las personas, en la Cumbre Mundial sobre Bioeconomía de 2015, 197 países miembros de la **Organización de la Naciones Unidas (ONU)** crearon la Agenda 2030 e implantaron los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) que eran elementos claves para una bioeconomía inclusiva para todos (Hodson de Jaramillo, 2018). En la Cumbre Global de Bioeconomía de 2018 se reiteró la importancia de dichos objetivos para el desarrollo de la bioeconomía (International Advisory Council on Global Bioeconomy [IACGB], 2020). Entre ellos, es de destacar el objetivo 12 de la ONU “Garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles” y su meta “reducir considerablemente la generación de desechos mediante actividades de prevención, reducción, reciclado y reutilización” (Naciones Unidas, 2015) (Figura 2). Así como, el objetivo 7 que plantea “Garantizar el acceso a una energía asequible, segura y sostenible”. Ambos objetivos son conceptos clave de las políticas de bioeconomía circular a nivel mundial y la biomasa un biorecurso fundamental.



Figura 2. Objetivos de desarrollo sostenible. Fuente: Naciones Unidas, 2015.

En **España** el sistema económico actual está basado en un modelo lineal cuyas pautas son “extraer-producir-desechar” lo que provoca un elevado uso de recursos naturales que incide directamente sobre el medio ambiente, dando lugar al agotamiento de los recursos y la generación de grandes cantidades de residuos, gases de efecto invernadero, contaminación de suelos y agua, etc. (Figura 3).



Figura 3. Esquema de economía lineal y economía circular. Fuente: ECOLEC.

Para mitigar estos problemas se ha elaborado la “Estrategia Española de Economía Circular, España Circular 2030 (‘Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto

Demográfico”, [(MITECO, 2020)] con una serie de objetivos para el año 2030 (Figura 4).

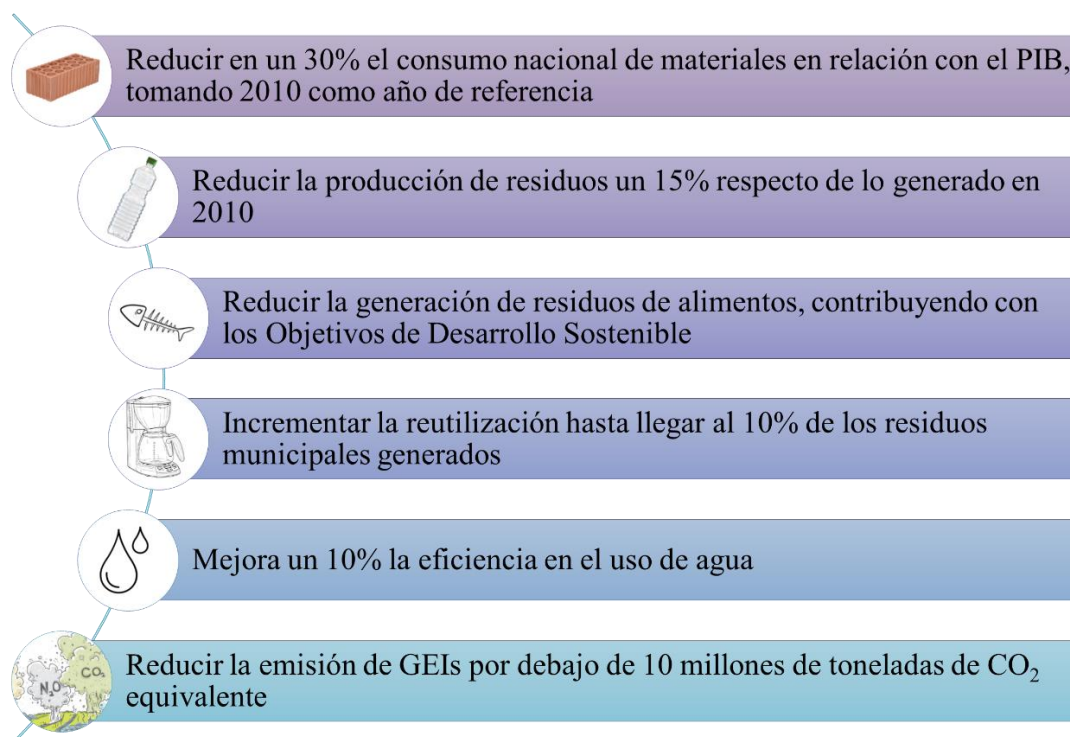


Figura 4. Objetivos de la Estrategia Española de Economía Circular para 2030. Fuente: Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, 2020.

Para que España logre la transición hacia una bioeconomía circular se establecieron una serie de bases: cuidado y mejora del medio ambiente, acción preventiva, economía libre de carbono, desarrollo sostenible, cuidado de la salud humana, participación pública, cooperación y unión entre las administraciones públicas, racionalización y eficiencia, mejora de la competitividad de la economía e incorporación de los aspectos ambientales en la toma de decisiones.

La Estrategia de Economía Circular y sus correspondientes planes de acción, políticas e instrumentos se centran en: producción, consumo, gestión de residuos, materias primas secundarias, reutilización y depuración del agua, sensibilización y participación, investigación, innovación y competitividad, empleo y formación. De entre ellas la gestión de residuos cobra especial importancia dado que en España actualmente solo se recicla un 37,1% de los residuos y se requieren vías para su valorización (MITECO, 2020).

Andalucía contribuye con los retos globales de bioeconomía de diversas formas. Los Fondos Estructurales y de Inversión de Andalucía (2014-2020) establecieron políticas vinculadas con la bioeconomía en el campo de innovación, investigación, formación y desarrollo empresarial. El Programa de Desarrollo Rural de Andalucía 2014-2020 (PDR) y el Programa operativo del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) para Andalucía apuestan por el empleo de los recursos y por una descarbonización de la economía. El Programa Operativo del Fondo Europeo Marítimo y de Pesca 2014-2020 establece diferentes principios para la transición hacia una pesca más sostenible. Otros documentos de la Junta de Andalucía que integran el concepto de bioeconomía son: el Plan Económico de Andalucía 2014-2020, la Agenda por el Empleo, la Estrategia por la Competitividad, la Estrategia Industrial de Andalucía 2014-2020, el Plan Andaluz de Medio Ambiente Horizonte 2017 y la Ley de Agricultura y Ganadería (EABC, Junta de Andalucía, 2018).

Andalucía ha creado su propia Estrategia de Bioeconomía Circular (EABC) cuya finalidad está dirigida al crecimiento y desarrollo sostenibles de Andalucía mediante actividades encaminadas a la producción de recursos y de procesos biológicos renovables. La Figura 5 muestra las estrategias y las líneas de actuación de la EABC 2030.



Figura 5. Marco estratégico e instrumental de la Estrategia de Bioeconomía Circular 2030. Fuente: Junta de Andalucía, 2018.

Como se observa, el aprovechamiento de la biomasa y el desarrollo de biorrefinerías son pilares fundamentales de dicha estrategia. Una biorrefinería sería una industria análoga a las refinerías de petróleo pero basada en biomasa, es decir, “instalaciones con el equipamiento necesario para integrar los procesos de conversión de biomasa en combustibles, energía y coproductos de valor añadido” (Laboratorio Nacional de Energía Renovables, [NREL]).

En la Figura 6 se esquematizan posibles rutas de obtención de bioproductos y bioenergía, así como sus mercados de consumo en Andalucía.

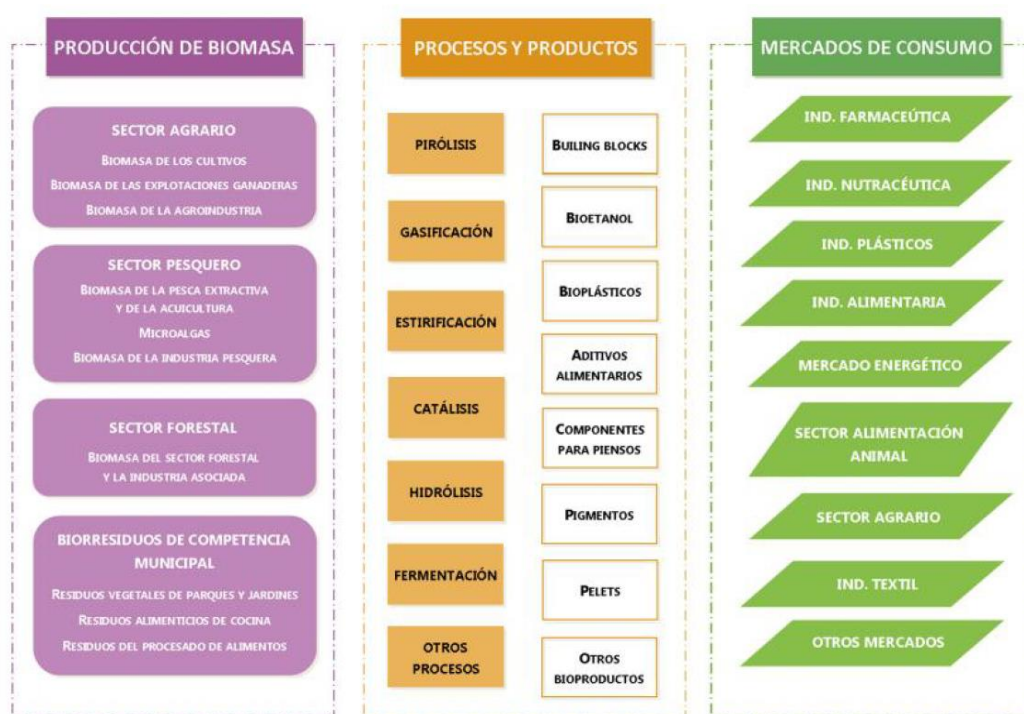


Figura 6. Rutas de obtención de bioproductos y mercados de consumo en Andalucía. Fuente: Junta de Andalucía, 2018.

2.1.2. La biomasa en la bioeconomía circular y transición energética

Actualmente, la energía juega un papel clave en el crecimiento económico de las sociedades y de la bioeconomía. A partir de los combustibles de origen fósil se genera el 80% de las necesidades energéticas del mundo (Hassan et al., 2021), pero estos son un recurso natural no renovable y se consideran los responsables del 75% del total de las emisiones de los gases de efecto invernadero (GEIs) en Europa. El consumo de combustibles fósiles (petróleo, carbón y gas natural) ha aumentado significativamente durante el último medio siglo (Ritchie y Roser, 2017) (Figura 7) y siguen siendo la fuente

de energía dominante (Martins et al., 2019). No obstante, ya no cabe duda de que los combustibles fósiles provocan contaminación ambiental y efectos perjudiciales para la salud humana (Hassan et al., 2021).

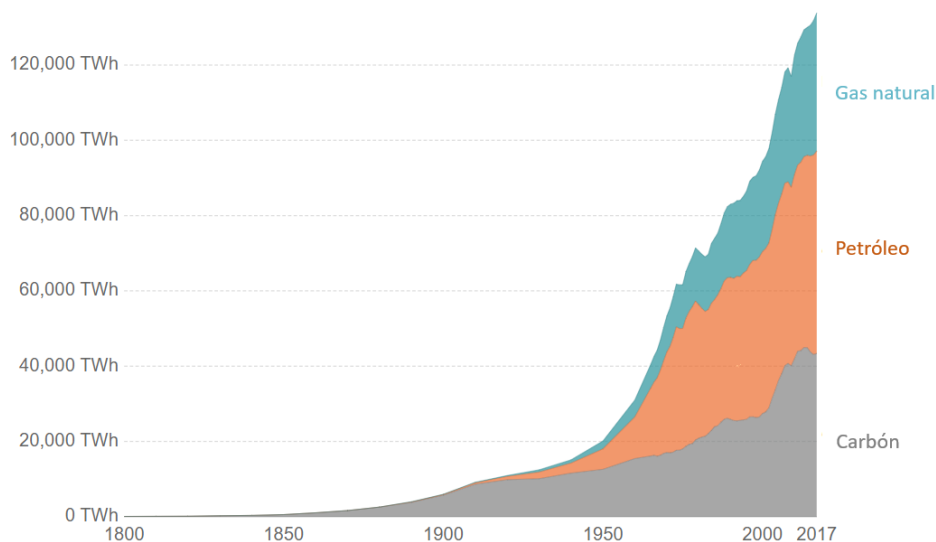


Figura 7. Consumo mundial de combustibles fósiles. Fuente: adaptado de Ritchie y Roser, 2017.

En 1972, en la Conferencia Mundial sobre el Clima de la ONU se manifestó que el empleo sin control de las energías de origen fósil, el deterioro de la capa de ozono y la devastación de los bosques producían un constante incremento de la temperatura de la Tierra que daba lugar, a nivel mundial, a importantes cambios climáticos, económicos y sociales. Es por eso, que, ante esta situación, en 1997 los gobiernos propusieron objetivos específicos para reducir las emisiones de GEIs quedando recogidos en el Protocolo de Kyoto (Böhringer, 2003) que entró en vigor en 2005. De acuerdo con este protocolo, los países que conforman la Unión Europea se comprometieron a alcanzar una reducción de GEIs del 8% en 2010 y a proporcionar mediante energías renovables un 12% de la energía primaria demandada en Europa (Fernández-Martín, 2010). Los avances que se produjeron gracias al Protocolo de Kyoto no fueron suficientes para solventar los problemas que se planteaban en el ámbito ambiental. Por ello, en 2015 se estableció el “Acuerdo de París para el Cambio Climático”, cuyo objetivo principal era limitar el incremento de la temperatura media global por debajo de 2°C respecto a los niveles preindustriales y emisiones netas de carbono cero después de 2050 (Convención Marco de las Naciones

Unidad sobre el Cambio climático) (Naciones Unidas, 2021), lo que contribuiría a una transición energética a nivel mundial.

La eficiencia energética y las reducciones a cero de emisiones netas de carbono resultan fundamentales para alcanzar este objetivo (Rogelj et al., 2015). De hecho, desde su entrada en vigor, las soluciones para reducir a cero las emisiones netas de carbono se volvieron competitivas en los sectores económicos que representan el 25% de las emisiones, especialmente en actividades relacionadas con la energía y el transporte. Para 2030, las actividades propuestas para la descarbonización podrían ser eficaces en sectores que suponen más del 70% de las emisiones a nivel global (MITECO, 2017).

Por otra parte, la dependencia energética de los países que conforman la UE es muy elevada. Su consumo corresponde a una quinta parte de la energía mundial, siendo el 53% de esta importada (EUROSTAT, 2021).

La bioeconomía en términos generales se basa en la transición de la dependencia de combustibles de origen fósil a una situación en la que el sector agrícola, además de contribuir a la seguridad alimentaria, dé lugar a la producción de biomasa como materia prima renovable con empleo en la industria, en sectores energéticos y otros usos (Hodson de Jaramillo, 2018). El empleo de biomasa podría contribuir a balancear la emisión de carbono neto hacia el cero y reducir esa dependencia energética, además de posibilitar la obtención de bioproductos en el contexto de biorrefinerías. Esto favorecería la transición energética, entendida como el cambio del actual modelo energético que trata de sustituir las formas convencionales de generar energía por el empleo de fuentes de origen renovables. También, conlleva concienciar sobre el uso responsable y sostenible de la energía (Enel Green Power, 2021).

Este último concepto es clave para cumplir con el acuerdo de París de 2015, con los objetivos de desarrollo sostenible de Naciones Unidas (Naciones Unidas, 2015) y con la entrega de energía al consumidor a precios asequibles que favorezca la creación de empleo mediante un sistema energético seguro y competitivo. También, es la base de la Estrategia de Transición Justa (MITECO, 2018), del Plan Nacional Integrado de Energía y Clima en España (PNIEC) 2021-2030 (MITECO, 2021) y de la nueva Ley 7/2021, de 20 de mayo, de cambio climático y transición energética (Boletín Oficial del Estado

[BOE], 2021). El principal objetivo que se propone es la completa descarbonización de España para el año 2050 y para ello se establecen unos objetivos específicos:

- En el año 2030, una reducción de, al menos un 23% de emisión de GEIs en comparación a 1990 y alcanzar la neutralidad climática en el año 2050.
- En el año 2030, al menos, un 42% de consumo de energía final debería derivar de energías renovables.
- En el año 2030, al menos un 74% de la energía eléctrica debe proceder de energías renovables.
- Un 39,5% en la mejora de eficiencia energética.

Para cumplir con estos objetivos es de vital importancia tener presente el concepto de bioenergía. Este concepto puede incorporarse a nivel regional a través de biorrefinerías, en las que mediante tecnologías novedosas y eficaces se realiza un aprovechamiento integral de los recursos biomásicos y de los desechos. La biorrefinería conlleva una integración de procesos en los que se generan diversas corrientes para obtención de bioproductos de alto valor añadido y biocombustibles y biochar por conversión termoquímica, dando lugar así a un aprovechamiento integral de los productos de la agricultura (Zabaniotou et al., 2018). La idea de biorrefinería como un proceso multiproducto basado en recursos renovables es la base de un modelo de bioeconomía circular que supone la valorización de biomasas de carácter residual.

La biomasa se trata de un conjunto de materias primas heterogéneas debido a su origen, naturaleza y composición, que, como se ha comentado previamente, se puede emplear para obtener energía. La propiedad de energía renovable de la biomasa se debe a que su contenido energético es aportado mediante la energía del sol que los vegetales son capaces de captar en el proceso de fotosíntesis (Romero, 2010). El empleo de la biomasa para la producción de energía o la generación de combustibles de transporte es conocido como bioenergía (Martinez-Hernandez y Siew, 2020). La biomasa representa tres cuartas partes del consumo global de energías renovables a nivel mundial (IRENA, 2017) y resulta fundamental para conseguir los objetivos energéticos. Según informes estadísticos de “Bioenergy Europe”, actualmente, más del 60% de la energía renovable que consume la UE proviene de la biomasa (Figura 8) (UE-28, 2018), incluida la fracción biodegradable de los residuos urbanos. A pesar de que España cuenta con un gran potencial de biomasa,

solamente hay algo más de un gigavatio de potencia instalada a partir de esta fuente renovable.

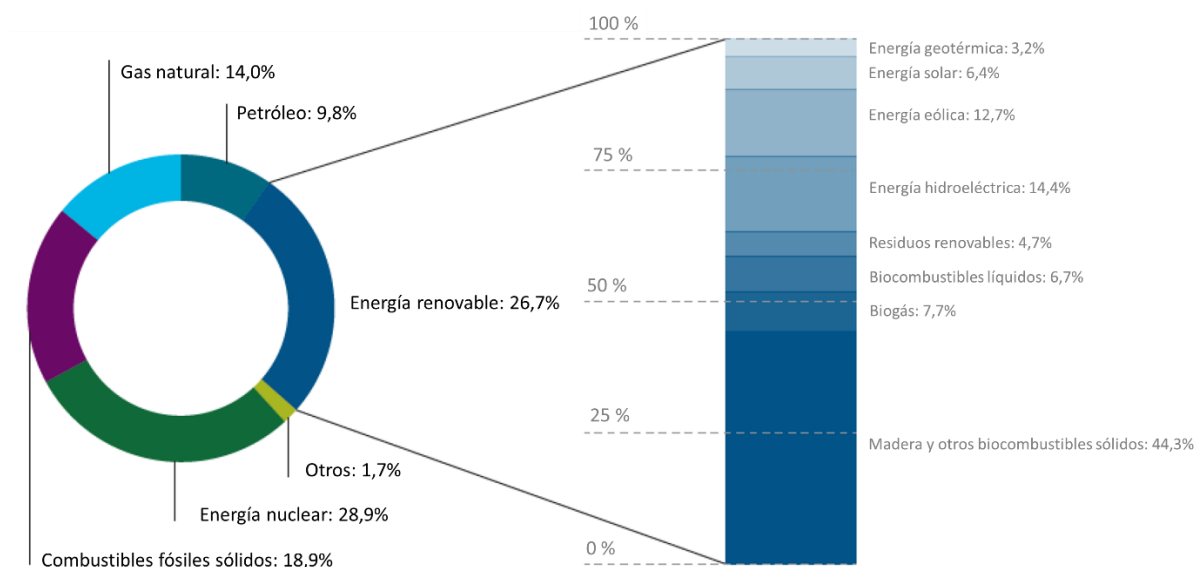


Figura 8. Producción de energía primaria (% del total, basado en toneladas de equivalente de petróleo). Fuente: adaptado de Renewable energy for sustainable rural development: significant potential synergies, but mostly unrealised (UE-28), 2018.

Atendiendo a la composición de la biomasa, su potencial de aprovechamiento para producir energía o compuestos de alto valor añadido es diferente, de ahí que se establezca la clasificación que se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de la biomasa en función de su composición.

Tipo de biomasa	Ejemplos	
Azucarada (predominan azúcares monosacáridos o disacáridos)	Mostos y jugos de frutas	
	Remolacha y caña de azúcar	
	Sorgo azucarado	
	Mandioca	
	Algarroba	
Oleaginosa (alto contenido en lípidos)	Semillas de jatrofa, soja, girasol, etc.	
Amilácea (predomina almidón)	Cereales	Maíz
		Cebada
		Trigo
		Malta
		Avena
		Centeno
		Arroz
	Tubérculos	Patata
		Boniato
		Pataca
Lignocelulósica (predomina la celulosa, hemicelulosa y lignina)	Maderas	Olivo
		Eucalipto
		Pino
		Chopo
		Álamo
		Pajas de cereales
	Residuos agrícolas y forestales	Bagazo de caña de azúcar
		Residuos de chopo, álamo, etc.
		Residuos forestales y de actividades silvícolas
	Residuos de la industrial del papel, alimentaria y maderera	
	Residuos sólidos urbanos y aguas residuales	
	Lodos de depuradora	

2.2. Biomásas generadas en el sector oleícola

2.2.1. El olivar y la producción de aceite de oliva

El olivo, *Olea europea* L., es un árbol de la familia de las oleáceas y la única especie de esta familia con fruto comestible. El área principal para el cultivo del olivo se encuentra en el hemisferio norte y sur entre las latitudes 30-45°, es por esta razón que, más del 97% de la producción mundial de aceitunas, se concentra en la cuenca mediterránea (Christoforou y Fokaides, 2016). De entre los países mediterráneos, España es considerada la primera potencia mundial productora y exportadora de aceite de oliva (Agencia de Crédito a la Exportación, [ECA]). La superficie dedicada al olivar en España fue de 2.601.900 Ha en 2019 con una producción de aceituna de 5.965.080 toneladas (FAOSTAT, 2021). En cuanto a la producción española de aceite, esta representa el 60% de la producción de la UE y el 45% de la producción mundial.

En Andalucía el olivar constituye la principal formación vegetal (Rodríguez- Pleguezuelo et al., 2018) contando con una superficie cultivada en 2018 de 1.514.868 Ha, lo que representa más del 60,2% de la superficie del olivar nacional y aproximadamente el 14% de la superficie mundial del olivar (MAPA, 2021). Según el Anuario de Estadísticas Agrarias y Pesqueras y Censo Agrario (2017), en Andalucía existen 170.000 explotaciones distribuidas principalmente en las provincias de Jaén, Córdoba, Granada, Málaga y Sevilla. En la Figura 9 se muestra la distribución municipal de la superficie de olivar en Andalucía.

El fruto del olivo, la aceituna, está formado por piel (exocarpio o cáscara), pulpa (mesocarpio o carne) y hueso (endocarpio o avellano). Normalmente las aceitunas están compuestas de 50% agua, 18-25% de aceite, 20% carbohidratos y 1,5% de proteínas (Esencia de Olivo, 2021).

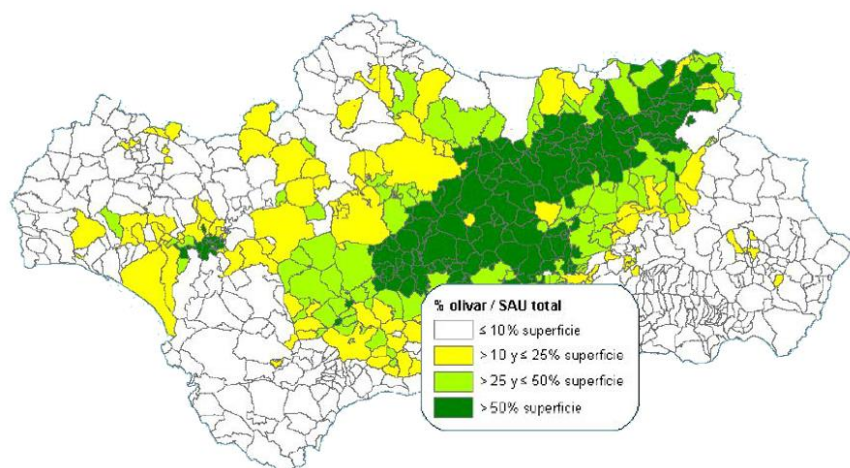


Figura 9. Distribución municipal de la superficie de olivar en Andalucía en función del porcentaje que representa respecto a la Superficie Agraria Útil (SAU). Fuente: Elaboración a partir de SIGPAC, 2010. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.

En España se cultivan más de 200 variedades de aceituna, destacando en el olivar andaluz el cultivar ‘Picual’ (59,6% de la superficie de olivar andaluz), seguido de ‘Hojiblanca’ (17,8%), ‘Manzanilla de Sevilla’ (4,9%) y ‘Arbequina’ (1,8%). Se cuenta con una estructura agroindustrial formada por 830 almazaras, de las cuales 325 pertenecen a la provincia de Jaén (39%), 211 entamadoras y 38 extractoras de aceite de orujo (Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía, 2019).

El olivar, además de generar como productos principales el aceite de oliva y la aceituna de mesa también produce un conjunto de subproductos y residuos como la poda de olivo, el hojín, el hueso, el orujo graso, el orujillo y aguas de lavado cuyo uso puede enfocarse hacia el desarrollo de una biorrefinería basada en el olivar. En el siguiente esquema (Figura 10) se muestran las vías para la producción de aceite de oliva y de orujo y los subproductos y residuos que se generan. Brevemente, las aceitunas se limpian en el molino donde se separan hojas y ramitas finas (hojín). Luego, las aceitunas se trituran y la pasta se centrifuga para producir aceite de oliva y orujo de oliva. Este subproducto, particularmente es obtenido en la extracción de dos fases, se suele procesar, separando

una parte de los huesos triturados, y una parte del aceite residual. Finalmente, en las orujeras, el orujo se extrae para recuperar el aceite de oliva residual y producir aceite de orujo. Esto genera el subproducto denominado orujillo (Contreras et al., 2020a).

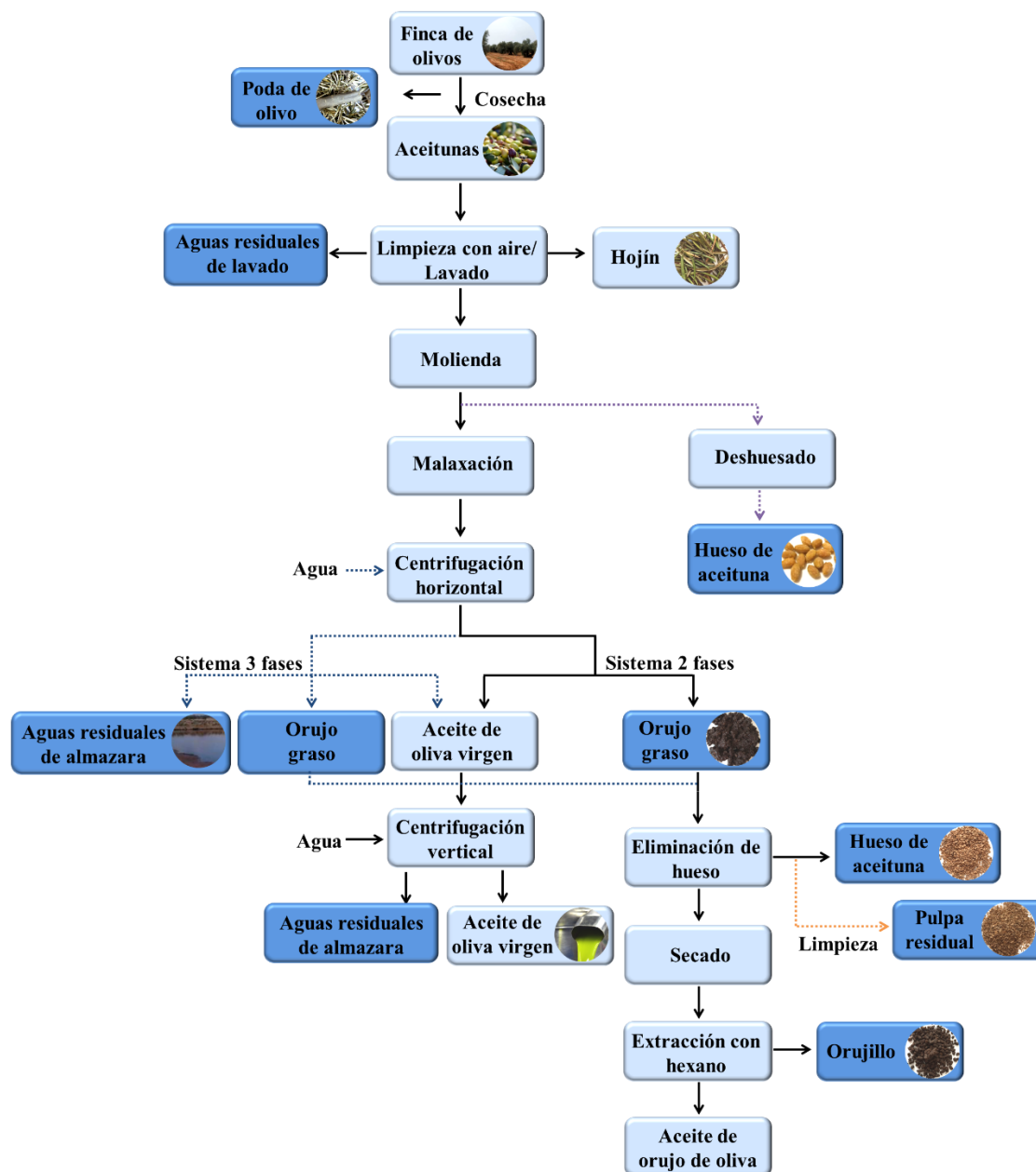


Figura 10. Esquema simplificado de producción de aceite de oliva y de orujo y los residuos/subproductos obtenidos. Fuente: adaptado de Contreras et al. (2020a).

2.2.2. Residuos y subproductos del olivar y sus industrias asociadas

2.2.2.1. Poda de olivo

La poda de olivo es una operación agrícola bienal que se realiza tras la recolección de la aceituna (Figura 10) y cuyo objetivo es eliminar las ramas deterioradas menos productivas, dando lugar a la regeneración de la masa foliar del olivo. Esto también reduce la solarización del tronco y ramas evitando quemaduras y daños irreversibles en el árbol (de la Rosa et al., 2010).

El residuo que genera esta operación está formado por aproximadamente un 25% en peso de hojas, un 25% en peso de ramas gruesas (diámetro medio mayor a 5 cm) y un 50% en peso de ramas delgadas de diferente grosor, aunque esta proporción pueden diferir en función de las técnicas de cultivo, la edad del árbol y de su localización (Landolsi et al., 2021). Una hectárea de olivar puede producir anualmente entre 1,5 y 3 t de poda (Ruiz et al., 2017), lo que supone una producción mundial muy significativa cuantitativamente teniendo en cuenta que la superficie mundial dedicada al cultivo del olivo alcanzó las 12,8 millones de hectáreas en 2020 (FAOSTAST, 2020; Ruiz et al., 2017). Tradicionalmente, los restos de poda se han quemado en el propio olivar, produciéndose durante su combustión emisiones de CO₂ a la atmósfera, además de la mineralización del suelo, el aumento de los riesgos de propagación de plagas, la proliferación de insectos y los accidentes por incendio (Martínez-Patiño et al., 2017a). Actualmente, se encuentra en auge la práctica del triturado y esparcimiento de este residuo en el campo (Martínez-Patiño et al., 2017a), presentando una serie de beneficios como un aporte extra de materia orgánica en los olivares, una menor pérdida de agua por evaporación y protección del terreno frente a la erosión (Rodríguez-Lizana et al., 2017). También, los agricultores suelen utilizar los troncos más grandes, conocidos como leña, en pequeñas calderas domésticas.

La poda de olivo es un material lignocelulósico, compuesto principalmente por azúcares estructurales, celulosa (21-23%) y hemicelulosa (14-18%), por lignina (18-23%) y una elevada proporción de extractivos (componentes no estructurales) (23-28%), que son una fuente potencial de compuestos fenólicos, y presentan una gran cantidad de glucosa soluble (Contreras et al., 2020a; Ruiz et al., 2017) (Tabla 2). Por todo ello, el estudio de alternativas de valorización para la poda resulta de gran interés desde el punto de vista medioambiental, social y económico.

Tabla 2. Composición de las biomásas del olivar (% en peso seco).

	Extractivos	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Grasa	Proteína	Cenizas	Referencia
Poda de olivo	28,6	21,6	14,5	17,7	N.D.	3,1	3,9	Contreras et al., 2020a
	24,5	22,3	17,5	17,8	N.D.	N.D.	4,1	Negro et al., 2015
	23,3	22,7	16,4	19,1	N.D.	N.D.	3,4	Ballesteros et al., 2011
	27,8	20,8	14,5	22,6	N.D.	3,4	2,7	Doménech et al., 2021
Hojas de olivo	38,8	11,8	4,5	19,3	N.D.	N.D.	3,7	Romero-García et al., 2016a
	45,1	7,0	5,7	16,1	N.D.	9,3	5,1	Contreras et al., 2021
Hojín	45,2	9,3	9,5	17,7	N.D.	N.D.	8,3	Manzanares et al., 2017
	41,9	12,0	10,5	17,1	N.D.	6,9	6,9	Gullón et al., 2018
	43,7	9,6	9,3	17,0	2,5	8,1	8,4	Solarte-Toro et al., 2018
	43,7	10,6	9,3	17,0	2,5	8,1	8,4	López-Linares et al., 2019
	35,8	9,9	7,9	23,3	9,8	8,1	6,9	Contreras et al., 2020b
	35,0	9,7	8,4	25,7	N.D.	7,8	9,1	Doménech et al., 2021
Orujo de dos fases	N.D.	19,3	35,1	42,6	12,1	7,1	4,3-6,7	Medouni-Haroune et al., 2018
	N.D.	17,9	35,0	34,5	N.D.	9,9	N.D.	Tortosa et al., 2012
	N.D.	7,8-8,7	10,3-11,3	42,5-43,9	15,6-20,0	8,8	4,5-4,9	Ribeiro et al., 2020
	51,3	6,8	7,9	29,3	5,7	5,9	2,7	Rodríguez et al., 2007
	N.D.	22,3	12,5	43,2	N.D.	0,4	6,6	Leite et al., 2016
	N.D.	23,7	18,0	38,0	10,3	N.D.	3,8	Buratti et al., 2016
Orujo de tres fases	N.D.	24,1	21,3	33,4	4,4	N.D.	1,9	Buratti et al., 2016
	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4,0-4,6	N.D.	2,4	Medouni-Haroune et al., 2018
	N.D.	12,1	22,3	43,2	16,7	0,4	6,6	Contreras et al., 2020a
Orujillo	42,0	11,4	10,2	23,7	N.D.	N.D.	9,4	Manzanares et al., 2020
	41,8	8,4	9,0	22,6	N.D.	N.D.	6,1	Paz et al., 2020
	42,0	10,9	11,7	23,1	N.D.	9,1	9,0	Doménech et al., 2021
	48,8	11,0	11,3	21,9	4,0	10,6	9,1	Contreras et al., 2021
	N.D.	11,0	24,1	41,6	N.D.	0,3	3,4	Leite et al., 2016
Hueso de aceituna	6,3	20,9	26,0	35,6	N.D.	0,9*	0,6	Padilla-Rascón et al., 2020
	10,5	20,1	29,9	38,9	N.D.	N.D.	0,6	Hernández et al., 2014
	6,3	20,9	26,0	35,6	N.D.	0,7	0,6	Doménech et al., 2021

Aguas	N.D.	19,5	36,9	28,5	14,3	15,0	21,8	Hadhoum et al., 2019
residuales	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,0-23,0	N.D.	1,0	Foti et al., 2021
Pulpa	N.D.	12,2	14,2	32,3	8,7	4,5	3,0	Contreras et al., 2021
residual	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7,6	2,7	1,5	Peláez Renovables, 2020

*Determinación propia, N.D., no determinado.

Las investigaciones realizadas hasta el momento han permitido determinar que esta biomasa puede emplearse para la producción de etanol a partir de la bioconversión de glucosa y xilosa (Oliva et al., 2020).

También, se ha investigado la obtención de productos de alto valor añadido con aplicación directa en la industria farmacéutica y alimentaria a partir de xilitol, (Mateo et al., 2015), lignina (Erdocia et al., 2014), oligosacáridos (Negro et al., 2017) y compuestos fenólicos (Conde et al., 2009). Por tanto, esta biomasa se considera una materia prima prometedora para biorrefinerías.

2.2.2.2. Hojas de olivo. Hojín

Las hojas de olivo pueden encontrarse en dos puntos distintos dentro del esquema de la biomasa del olivar. Se pueden hallar, por un lado, como una mezcla de hojas y ramitas que se generan en el campo durante la poda de olivo, que constituye un 25% y generalmente son quemadas o molidas junto con el resto de la poda. Y, por otro lado, en la almazara, durante la limpieza de la aceituna antes de su procesado (Figura 10), se generan hojas y ramas delgadas ($\approx 4\%$ - 10% en peso), estas son conocidas como hojín (Berbel y Posadillo, 2018) y representan un 4-7% del peso de la aceituna (Ruiz et al., 2017). Una hectárea de olivos podría generar entre 300 y 750 kg de hojas de olivo y 250 kg de hojín. Estas proporciones pueden ser distintas dependiendo de la edad del árbol, la producción de cultivos, la intensidad de la poda, las prácticas locales de poda, etc. (Ruiz et al., 2017; Talhaoui et al., 2015). El hojín está localizado en la almazara, lo que reduce los costos de transporte y está listo para ser utilizado (Contreras et al., 2020a). Este subproducto tradicionalmente se ha utilizado para alimentación animal, caprino y ovino, principalmente (Doménech et al., 2021). Actualmente, también, se puede emplear como materia prima para la combustión directa, la fabricación de pellet y compostaje ya que presenta un poder calorífico de 18410 kJ/kg. Sin embargo, su elevado contenido en humedad ($\sim 40\%$) lo hace poco adecuado para su uso en plantas de generación de energía eléctrica (Junta de Andalucía, 2010).

El hojín es un material lignocelulósico compuesto principalmente por extractivos (36-42%) y lignina (17-23%). También está compuesto por carbohidratos, celulosa (10-12%) y hemicelulosa (8-11%), grasa ($\sim 10\%$) y proteínas ($\sim 8\%$) (Contreras et al., 2020a) (Tabla 2).

Estudios recientes han revelado que las hojas de olivo y el hojín se pueden utilizar para obtener productos de valor añadido como antioxidantes y antibacterianos a partir de extractos fenólicos, que pueden emplearse en la industria alimentaria con el fin de producir alimentos beneficiosos para la salud y prolongar la vida útil de los productos alimenticios (Gullón et al., 2018; Lama-Muñoz et al., 2019a; Talhaoui et al., 2015). Estos compuestos también son de interés en la industria farmacéutica y en cosmética. Otra aplicación reciente es la producción de materiales multicapa de polietileno a partir de extractos antioxidantes de esta biomasa (Ruiz et al., 2017). También, se ha estudiado su valorización para producción de azúcares fermentables como manitol y oligosacáridos (Romero-García et al., 2016a), así como se trata de una buena fuente de lignina (Lama-Muñoz et al., 2020a) y proteínas (Vergara-Barberán et al., 2015). Es por todo esto, que las hojas de olivo son un residuo interesante para obtener biocompuestos de interés en el contexto de una biorrefinería (Lama-Muñoz et al., 2020b).

2.2.2.3. Orujo de aceituna

El orujo de aceituna es el principal subproducto del proceso de obtención del aceite de oliva en las almazaras y representa casi el 70-80% del peso de las aceitunas (Manzanares et al., 2017; Ruiz et al., 2017). En España, casi la totalidad de las almazaras utilizan el decánter de dos fases, que separa la pasta oleosa en dos fases, aceite y orujo (o alpeorujo o alperujo) de aceituna sin necesidad de añadir agua (Figura 10). Esto reduce la generación de aguas residuales en comparación con el sistema de separación en tres fases y el método tradicional de prensado. Sin embargo, el empleo del sistema de extracción de tres fases es todavía común en el resto de países mediterráneos (Contreras et al., 2020a). En la Figura 11 se muestran las diferencias entre los sistemas de separación de dos y tres fases en lo que se refiere a cantidad de agua de proceso que se puede añadir, los residuos generados y sus principales características. Así, el orujo está compuesto por una parte sólida (piel, pulpa y hueso) y otra líquida, el agua de vegetación de aceituna, que en algunas ocasiones puede ir acompañada de agua de proceso. La humedad de este subproducto depende del sistema empleado, pudiendo alcanzar valores de entre 60-70% cuando se emplea una separación en dos fases (EMGRISA y MITECO, 2019).

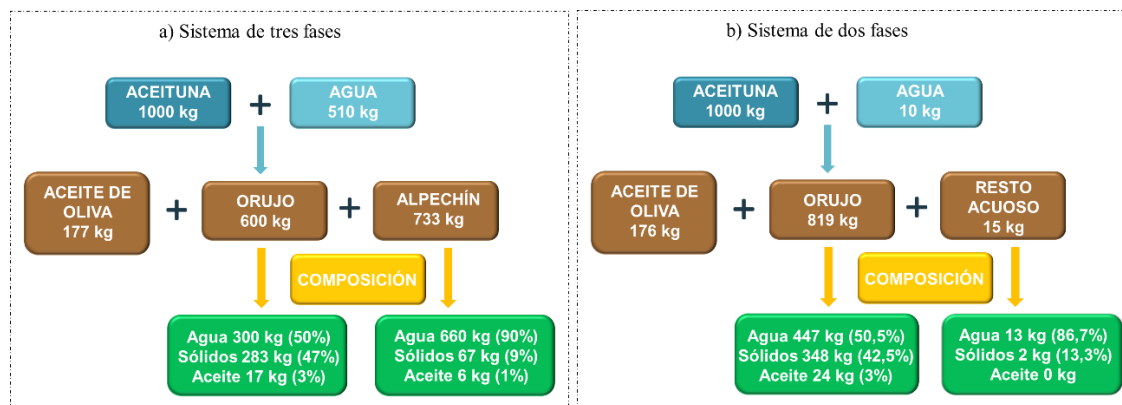


Figura 11. Sistemas de separación de aceite de oliva de dos y tres fases: agua necesaria, cantidad de aceite y de residuos generados y sus principales características. Fuente: adaptado de “Potencial energético de los subproductos de la industria olivarera en Andalucía” de la Junta de Andalucía, 2010.

El orujo de aceituna contiene, principalmente, grasa, proteínas, carbohidratos hidrosolubles (manitol, sacarosa y fructosa), celulosa (19-22%), hemicelulosa (12-35%), lignina (~42%) y extractivos (27%) (Tabla 2), aunque esta composición depende del cultivo, de la variedad de aceituna y del proceso de extracción (Goldsmith et al., 2018). Además, el contenido de aceite, que puede variar entre 3 y 5%, aproximadamente, también puede reducirse si se somete a una segunda extracción en la propia almazara por medio de una centrifugación para obtener el llamado aceite de repaso (EMGRISA y MITECO, 2019).

Generalmente, el orujo, tras la obtención del aceite de repaso, aún contiene una cantidad de aceite del 2%, por lo que es transportado a las plantas orujeras o extractoras para su procesamiento (Figura 12).

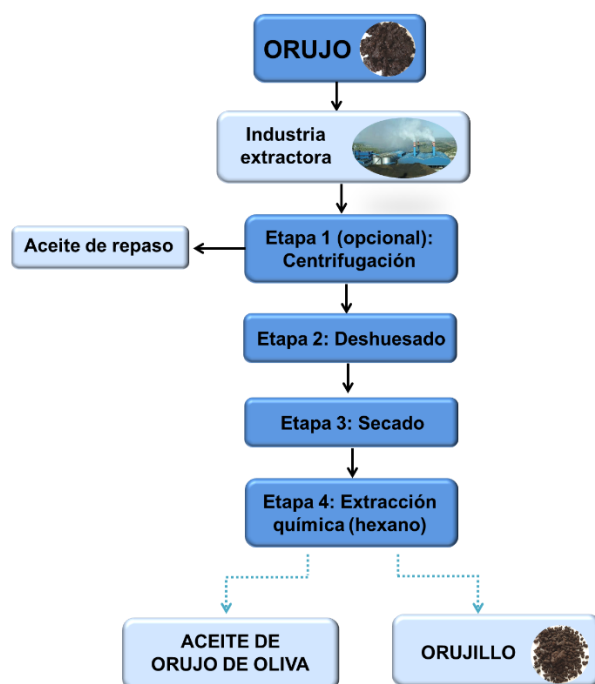


Figura 12. Diagrama simplificado de la extracción de aceite de orujo de oliva. Fuente: Adaptado de Manzanares et al. (2020).

La principal aplicación de este subproducto es la producción de aceite orujo. También es empleado para alimentación de animales (Sayehban et al., 2020), como fertilizante de suelos agrícolas y con fines energéticos. También, puede emplearse en la producción de biogás o metano (Difonzo et al., 2021) y en la producción de gas sintético o “syngas” (Puig-Gamero et al., 2021).

Por otra parte, numerosas investigaciones se han centrado en el empleo de este subproducto para la obtención de compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos, que presentan numerosas aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica (Chanioti y Tzia, 2018; Goldsmith et al., 2018; Pavez et al., 2019). Otro posible uso del orujo es para la extracción de pectinas que pueden emplearse como agentes gelificantes, estabilizadores y emulsionantes en la industria alimentaria (Rubio-Senent et al., 2015). Sin embargo, ninguna de estas aplicaciones se ha realizado a escala industrial para su valorización o se está haciendo de forma marginal.

2.2.2.4. Orujillo

Este residuo se genera en las orujeras como resultado del secado y posterior extracción de aceite residual del orujo de aceituna con un disolvente orgánico, como el hexano

(Manzanares et al., 2017) (Figura 12). En España, se produce anualmente alrededor de 1,2 millones de toneladas de este residuo (Contreras et al., 2020a).

Su fracción seca está compuesta por piel (15-30%), hueso (30-45%) y pulpa (30-50%) (Manzanares et al., 2020). La humedad del orujillo es baja, varía entre 6%-12%, el contenido en grasa es mínimo y presenta un poder calorífico en torno a 18000 kJ/kg en base seca.

Actualmente, el orujillo se emplea como combustible y para la generación de calor en las propias extractoras, así como combustible en pequeños sistemas de calefacción domésticos (Paz et al., 2020). De acuerdo con la normativa de emisiones vigente, el uso de este residuo como combustible renovable produce problemas debido a la emisión de partículas. También, la presencia de compuestos orgánicos contaminantes limita su uso como combustible (Miranda et al., 2014). Por tanto, la búsqueda de usos alternativos para este residuo agroindustrial es de gran interés.

Según su composición química, el orujillo presenta celulosa (9-11%), hemicelulosa (9-12%), lignina (~23%) y un alto contenido en extractivos (~42%) (Manzanares et al., 2020) (Tabla 2), por lo que constituye una materia prima prometedora para la producción de bioenergía y la extracción de compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos en un sistema de biorrefinería (Contreras et al., 2020a; Manzanares et al., 2020). Sin embargo, su composición dependerá del porcentaje de hueso que contenga, que a su vez depende del procesado previo. De acuerdo a un estudio reciente, aproximadamente el 75% de las orujeras separa parcialmente el hueso antes del secado del orujo y la extracción del aceite de orujo, mientras que un 25% de las industrias no lleva a cabo esta práctica, dando lugar a un orujillo con un mayor porcentaje de hueso (Manzanares et al., 2017).

Diferentes estudios han evaluado el potencial del orujillo para obtención de azúcares fermentables (Manzanares et al., 2020), bioetanol (López-Linares et al., 2020a), xilitol (López-Linares et al., 2020b), poligalacturonasa y ácidos grasos omega-3 (Paz et al., 2020).

2.2.2.5. Hueso de aceituna

El hueso de aceituna es una biomasa lignocelulósica que se genera en las almazaras, en las industrias extractoras (a partir del orujo) y en las entamadoras. En las entamadoras se

produce alrededor de 30.000 t de huesos de aceituna cada año (Mata-Sánchez et al., 2015) y se obtienen tras deshuesar las aceitunas. Los huesos de aceituna representan aproximadamente el 20% del peso de la aceituna, es decir, 100 kg de aceitunas frescas contienen 22 kg de huesos de aceituna (Rodríguez et al., 2008). En el caso de las almazaras y las industrias extractoras, este subproducto resulta de separar los huesos de la pulpa de la aceituna presentes en el orujo. En este sector se producen 600.000 t/año de hueso en España (Manzanares et al., 2017) y en Andalucía más de 450.000 t/año de hueso (Lopez et al., 2010).

La mayor parte de los huesos de aceitunas generados en la almazara presentan calibres entre 1 mm y 1,6 mm (Mata-Sánchez et al., 2015). Este tamaño de partícula tan pequeño supone una ventaja con respecto a otros subproductos del olivar, ya que una etapa de molienda, que supondría un coste adicional, no es necesaria en el caso del hueso y, además, es fácil de almacenar.

Como material lignocelulósico, sus componentes principales son celulosa (~21%), hemicelulosa (26-29%) y lignina (36-39%), aunque su porcentaje varía en función de la ubicación geográfica, variedad de aceituna y la presencia de trazas de pulpa y pericarpio (García-Martín et al., 2020) (Tabla 2). Debido a su alto poder calorífico (~18.000 kJ/kg), humedad es relativamente baja (15%), tamaño uniforme y alta densidad, el 99% del hueso de la aceituna generado se utiliza como combustible en sistemas de calefacción domésticos o en pequeñas calderas industriales (Álvarez et al., 2015).

Actualmente, se están buscando procesos alternativos para mejorar el empleo de este subproducto y así poder integrarlo dentro del contexto de una biorrefinería basada en el olivar (Ruiz et al., 2017). El hueso de aceituna se considera una fuente rica en antioxidantes naturales que pueden ser utilizados en la industria alimentaria como aditivo o nutracéutico y en la industria cosmética (Padilla-Rascón et al., 2020). Además, el hueso presenta un alto potencial para obtener polioles, polisacáridos y lignina (Miranda et al., 2019). Debido a su elevado contenido en carbohidratos, el hueso es una materia prima prometedora para la producción de azúcares (Cuevas et al., 2015; Doménech et al., 2021; Padilla-Rascón et al., 2020) y compuestos derivados como el etanol (Cuevas et al., 2021; Romero-García et al., 2016b). Gracias al elevado contenido de hemicelulosa (principalmente, en forma de xilano), otras aplicaciones son plausibles como la producción de xilitol y de furfural (Padilla-Rascón et al., 2021).

2.2.2.6. Aguas residuales

Durante el proceso de producción del aceite de oliva se generan aguas residuales en las almazaras. Dependiendo del proceso, estas aguas se generan en tres puntos distintos: durante la limpieza de la aceituna, en la centrifuga horizontal cuando se emplea el sistema de tres fases y en la centrífuga vertical tras el proceso del lavado del aceite de oliva. Las almazaras producen en España alrededor de 700.000 m³ de aguas residuales al año (ESAMUR, 2020). Hoy día, debido a las altas propiedades contaminantes que presentan estas aguas residuales continúa siendo un problema su gestión. Se caracterizan por un elevado contenido en agua, entre 83% y 99% (Contreras et al., 2020a), un fuerte olor a aceite de oliva y un intenso color violeta-marrón oscuro a negro. Además, presentan un contenido orgánico excesivamente elevado (25-45 g carbono orgánico total/L), una alta concentración de compuestos fenólicos (0,5-2,4 g/L) y acidez (pH ~ 3-6) (Hadhoud et al., 2019).

Normalmente, las aguas residuales se mantienen en una balsa al aire libre para su evaporación. La estacionalidad en su generación y sus propiedades, las convierte en un residuo difícil de reutilizar de forma sostenible con el medio ambiente. Estas aguas están compuestas por celulosa (19%), hemicelulosa (37%), lignina (29%), grasa (~14%) y proteínas (~15%). Dicha composición, en base seca, hace que las aguas residuales presenten características de materiales lignocelulósicos (Contreras et al., 2020a; Hadhoud et al., 2019).

Actualmente, se investiga el potencial de las aguas residuales de las almazaras como bioplaguicidas, fertilizantes contra patógenos vegetales y su empleo como compost (Sciubba et al., 2020). Esto contribuiría a la protección de los cultivos contra enfermedades, evitaría el uso de insecticidas sintéticos y los problemas ambientales asociados a esta práctica. Su alta carga en materia orgánica hace que estas aguas residuales sean una fuente energética para producción de biogás (Difonzo et al., 2021).

2.2.2.7. Pulpa residual

Los fragmentos de hueso de aceituna que se recuperan del orujo de aceituna, en ocasiones, se limpian mediante un proceso neumático para potenciar su potencial energético (Figura 10). Esta fracción residual derivada de la limpieza de huesos de aceituna (conocida como pulpa residual) consiste en restos de pulpa de aceituna y piel (Contreras et al., 2021). El

hueso representa alrededor del 8-10% del peso de la aceituna, y los restos de pulpa y piel que llevan adheridos pueden suponer hasta un 4% de su peso (Mata-Sánchez et al., 2015). Se trata de un residuo con elevado contenido en lignina (~32%), celulosa (~12%), hemicelulosa (~14%) y extractivos (~26%), principalmente, extractivos etanólicos (~18%), (Tabla 2). Actualmente, este residuo no presenta ninguna aplicación industrial (Contreras et al., 2021). No obstante, estudios recientes sugieren que este material biomásico podría ser empleado para la obtención de compuestos bioactivos, en concreto ácidos triterpénicos (Romero et al., 2017a) y extractos fenólicos (Contreras et al., 2021).

2.2.3. Composición de la biomasa del olivar

La biomasa del olivar debido a su composición química (Tabla 2) se podría clasificar como una biomasa lignocelulósica. La composición de los materiales lignocelulósicos consiste principalmente en componentes estructurales: carbohidratos poliméricos, celulosa y hemicelulosa, y un polímero aromático, lignina (Figura 13). También contienen diversas proporciones de pectinas, componentes no estructurales o extractivos, proteínas, grasas, y cenizas (Bajpai, 2016). Los extractivos son complejos y pueden presentar azúcares libres, oligosacáridos y polioles, compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, triterpenos, etc. (Doménech et al., 2021). Dicha composición varía en función de la especie, el tejido vegetal y las condiciones de crecimiento, entre otros factores (Hassan et al., 2018) (Figura 14).

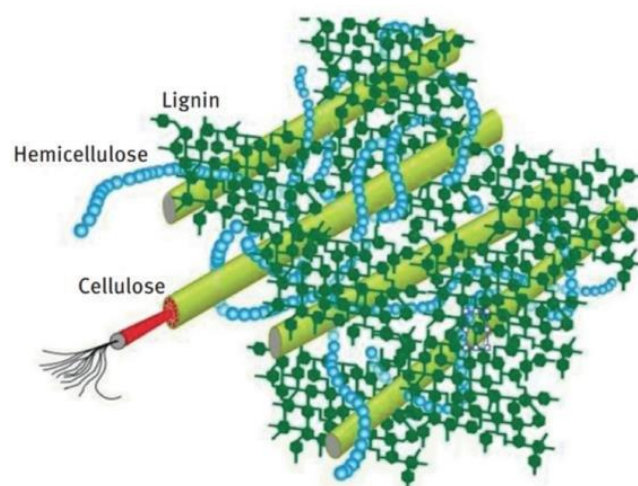


Figura 13. Disposición espacial de la celulosa, hemicelulosa y lignina en la pared celular de la biomasa lignocelulósica. Fuente: Wang et al. (2017).

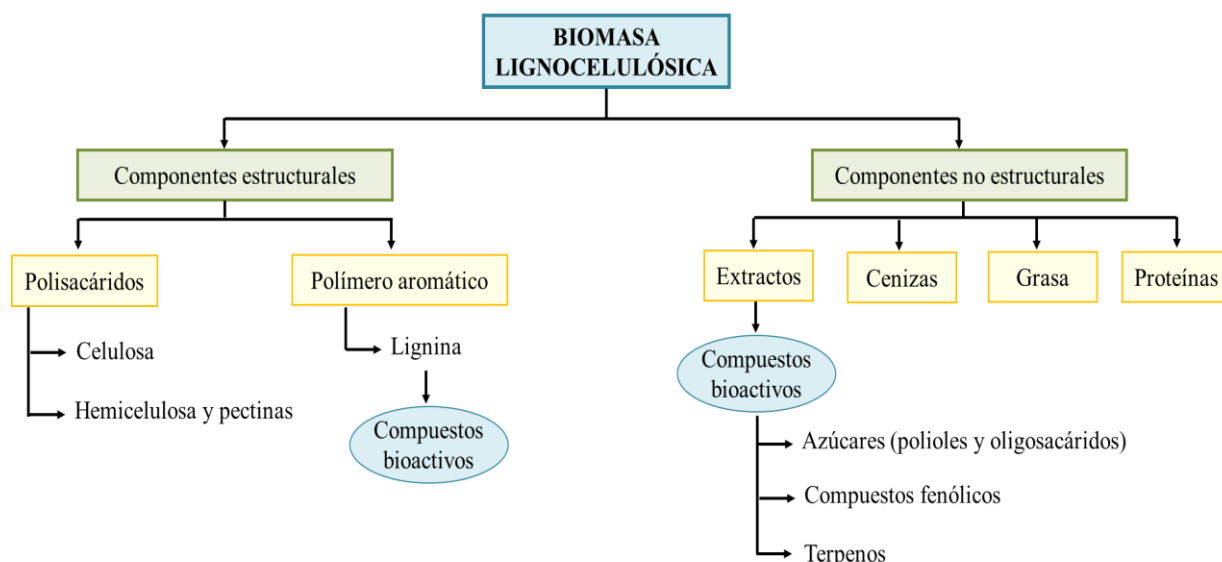


Figura 14. Componentes principales de la biomasa del olivar. Fuente: elaboración propia.

2.2.3.1. Celulosa

La celulosa es el recurso renovable más abundante en la naturaleza que determina la estructura de la pared de las células vegetales (Li et al., 2020). En maderas se encuentra en una proporción entre 40 y 50%, en materiales agrícolas constituye entre 25 y 40% de este (Rivas-Siota, 2014) y en los residuos del sector oleícola varía entre 7% (hojas de olivo) y 23% (poda de olivo), como se ha comentado previamente (Tabla 2).

Se trata de un biopolímero estructural sintetizado por las plantas y formado por unidades lineales de glucosa unidas por enlaces β -(1,4)-glucosídicos, siendo la celobiosa, el disacárido de β -1,4-glucopiranososa, la unidad básica que se repite (Figura 15) (Rivas-Siota, 2014).

Los grupos OH presentes en la cadena de celulosa poseen distintas propiedades. El grupo OH del carbono 1 (Figura 15) es un grupo aldehído con propiedades reductoras, mientras que el grupo OH del carbono 4 es un grupo hidroxil-alcohólico y por lo tanto no reductor. Estos grupos hidroxilos son capaces de interaccionar entre sí o con otros átomos estableciéndose múltiples puentes de hidrógeno que le aportan una estabilidad intra e intermolecular, de ahí su cristalinidad (Franco et al., 2020).

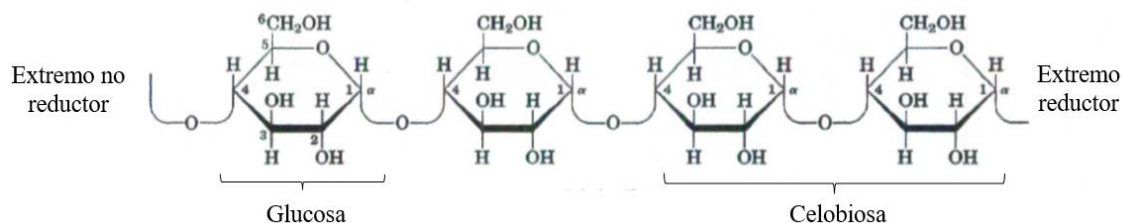


Figura 15. Estructura de la cadena molecular de celulosa. Fuente: adaptada de EcuRed, 2021.

Estos puentes de hidrógeno dan lugar a la formación fibrillas de celulosa (pequeña unidad de estiramiento, compuesta por microfibrillas de celulosa entrelazadas) que tienen regiones desordenadas (amorfias). Estas regiones pueden ser selectivamente hidrolizadas por ácido y susceptibles a todas las reacciones químicas (celulosa amorfa) o altamente ordenadas (celulosa cristalina) caracterizadas por un alto grado de cristalinidad y de polimerización, resultando por tanto insolubles en agua, en disolventes orgánicos y en disoluciones de ácidos y álcalis diluidas (Bolio-López et al., 2011) (Figura 16).

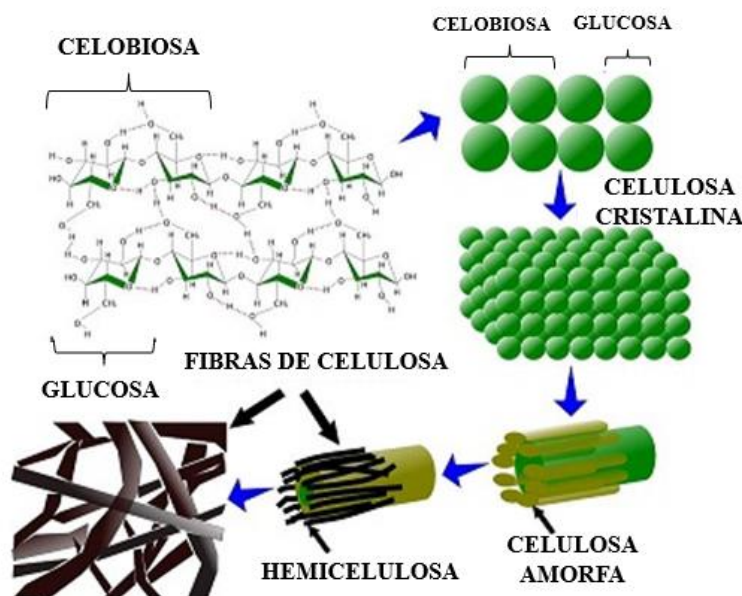


Figura 16. Constitución de la celulosa. Fuente: Nueva Génesis, 2012.

2.2.3.2. Hemicelulosa y pectinas

Las hemicelulosas son los segundos polisacáridos más comunes en la naturaleza, están estrechamente asociadas con la celulosa y desempeñan una función muy importante en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta (Ferreira et al., 2009). Las hemicelulosas son polímeros heterogéneos constituidos por diferentes unidades de

monosacáridos: pentosas (β -D-xilosa, α -L-arabinosa), hexosas (β -D-manosa, β -D-glucosa, α -D galactosa), principalmente (Zhou et al., 2017). Estos monosacáridos se encuentran enlazados entre sí por enlaces glucosídicos dando lugar a estructuras cortas y ramificadas (Pińkowska et al., 2013) (Figura 17).

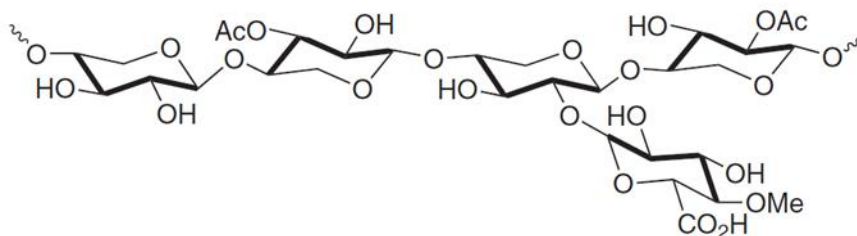


Figura 17. Estructura química de la hemicelulosa. Fuente: Ferreira et al. (2009).

Las hemicelulosas presentan bajo grado de polimerización, baja cristalinidad y en general son amorfas lo que hace que sean solubles en ácidos inorgánicos diluidos y en álcalis a temperaturas altas (Pereira et al., 2008). La cadena principal de la hemicelulosa puede estar constituida por un único azúcar, homopolímero (ej., xilano), o de dos o más azúcares, heteropolímero (ej., glucomanano) (Gírio et al., 2010). En particular, los xilanos y mananos son las dos clases principales de hemicelulosas que se acumulan en las paredes celulares secundarias, pero también son componentes de las paredes primarias de las dicotiledóneas, que incluye al olivo (Parra y Gomez-Jimenez, 2020) (Figura 18).

El tipo y contenido en polímeros hemicelulósicos depende de la naturaleza de cada biomasa lignocelulósica (Zhou et al., 2017), aunque por lo general las hemicelulosas representan alrededor del 15-30% en peso de la biomasa lignocelulósica. En el caso de la biomasa del olivar, su valor está entre 4% (hojas de olivo) y 37% (aguas residuales) (Tabla 2), dependiendo del tipo de biomasa, como se indicó en el Apartado 2.2.1. El contenido en xilosa, galactosa, manosa y arabinosa también depende de la biomasa, aunque en todos los casos la xilosa es el principal carbohidrato que conforma este polímero (Tabla 3).

Tabla 3. Contenido en azúcares hemicelulósicos de los subproductos y residuos de la industria del olivar.

Residuo	Xilanos	Galactanos	Arabinanos	Mananos	Referencia
Poda de olivo	9,2	1,9	2,6	0,8	Doménech et al., 2021
	11,7	1,7	2,7	1,4	Martínez-Patiño et al., 2015
	9,0	2,0	2,8	0,5	Gullón et al., 2018
	10,2	2,2	3,2	0,6	Manzanares et al., 2017
Hojas de olivo	4,5	2,0	4,0	0,3	Manzanares et al., 2017
Hojín	3,3	1,9	2,8	0,4	Doménech et al., 2021
	5,5	1,8	3,0	0,2	Gullón et al., 2018
	4,0	1,9	3,2	0,2	Solarte-Toro et al., 2018
Orujo de dos fases	5,8-7,1	1,7	0,3-0,7	0,9	Ribeiro et al., 2020
Orujillo	9,5	1,0	1,0	N.D.	López-Linares et al., 2020a
	9,4	1,0	1,0	0,3	Doménech et al., 2021
	10,3	1,0	1,1	0,3	Manzanares et al., 2017
Hueso	23,5	1,2	1,2	0,1	Doménech et al., 2021
	26,6	1,4	1,3	N.D.	Padilla-Rascón et al., 2020
Pulpa residual	7,3	1,9	0,5-1,5	1,1	Ribeiro et al., 2020
	10,9	N.D.	1,8	N.D.	Georgieva y Ahring, 2007
	13,5	0,4	0,3	N.D.	Contreras et al., 2021

N.D., no determinado.

La hemicelulosa muestra propiedades como la biodegradabilidad, biocompatibilidad y la bioactividad lo que permite su aplicación en áreas como la alimentación, la medicina, la energía, la industria química y los materiales poliméricos (Luo et al., 2019). Además, se pueden hidrolizar los azúcares para obtener azúcares fermentables que, a su vez, se pueden fermentar para obtener bioetanol, xilitol, etc. Un ejemplo de materias primas para la obtención de estos productos en el caso del olivar son el orujillo y la poda de olivo (López-Linares et al., 2020a, 2020b; Mateo et al., 2015; Romero-García et al., 2016b).

Las pectinas son polímeros naturales formados por moléculas de ácido galacturónico y suelen aparecer en la pared celular primaria y en los tejidos de frutos y vegetales. Su peso molecular varía entre 25.000 y 50.000 Da, y cada cadena contiene más de 200 unidades de ácido galacturónico. Las pectinas pueden considerarse como compuestos cementantes de la pared celular. De esta forma, las paredes celulares se han modelado como una red de celulosa-hemicelulosa incrustada en una matriz de pectina (Xiao y Anderson, 2013) (Figura 18).

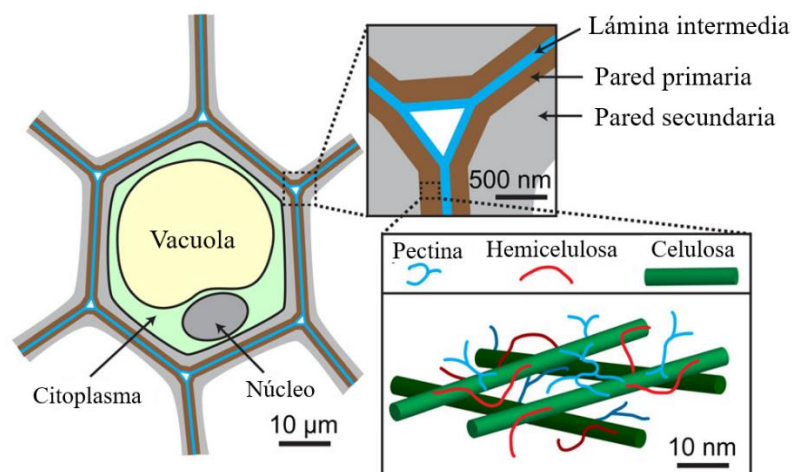


Figura 18. Localización de la celulosa, hemicelulosa y pectina en la pared celular vegetal. Fuente: adaptada de Xiao y Anderson (2013).

La aceituna contiene pectinas (Parra et al., 2020), que pasarían a los residuos derivados tras la obtención del aceite. Así, se han obtenido fracciones de pectinas a partir de orujo de dos fases, que contenían ácido galacturónico junto con galactosa y ramnosa (Lama-Muñoz et al., 2012), así como del alpechín y del alpeorujo (Rubio-Senent et al., 2015).

Debido a sus propiedades gelificantes y de absorción las pectinas se emplean en la industria de los alimentos como aditivos alimentarios (E-440) y son consideradas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos como ingredientes seguros (“Generally Recognized As Safe” o GRAS) (Morris et al., 2013). También se emplean en cosmética para la elaboración de jabones y mascarillas faciales y en la industria farmacéutica como excipientes, estabilizadores, películas y agentes de unión (Muñoz, 2016).

2.2.3.3. Lignina

La **lignina** es el tercer componente mayoritario de los materiales lignocelulósicos. Químicamente es un polímero tridimensional aromático no polisacárido insoluble, amorfo y de alto peso molecular. Se encuentra constituida por varios alcoholes y ácidos fenilpropílicos, unidos a través de distintos tipos de enlaces, tales como carbono-carbono y uniones tipo éter y éster que se alternan sin un orden concreto, formando una matriz compleja (Santos et al., 2017). Sus monómeros básicos son los llamados alcoholes fenilpropílicos (o cinamílicos) que se diferencian por las sustituciones que presenta el anillo aromático. El monómero *p*-hidroxifenilo (tipo H) derivado del alcohol cumarílico

no presenta ningún sustituyente; el monómero guayacilo (tipo G) derivado del alcohol coniferílico presenta un grupo metoxilo en la posición 3 del anillo y el monómero siringilo (tipo S) derivado del alcohol sinapílico presenta dos grupos metoxilo en las posiciones 3 y 5 (Figura 19) (Santos et al., 2017).

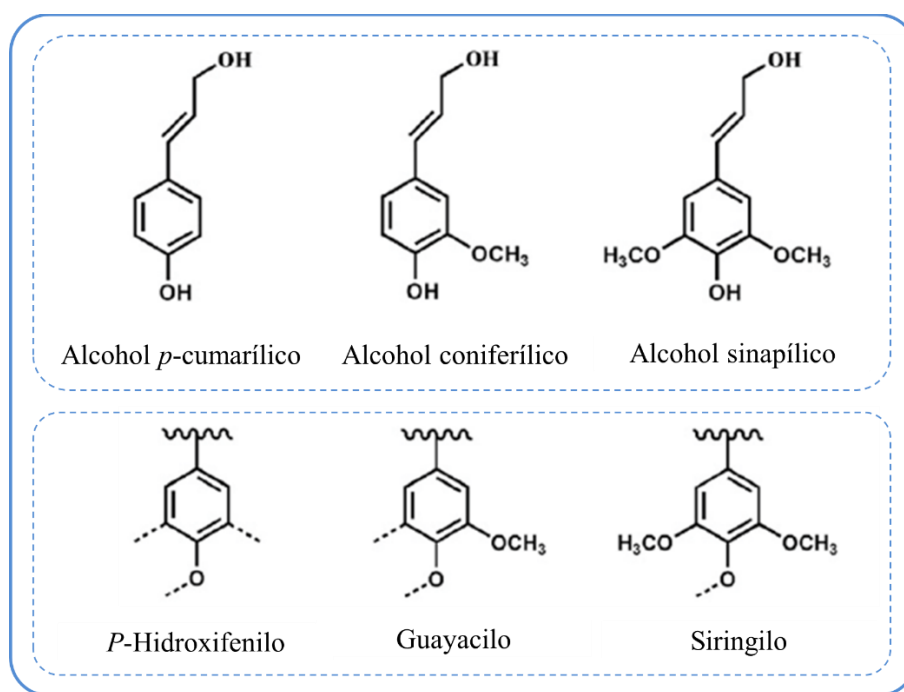


Figura 19. Unidades y monómeros básicos de la lignina. Fuente: Yuan et al. (2013).

Aunque la composición de la lignina suele estar entre un 10-30% del peso del material lignocelulósico, puede variar en función del tipo de biomasa. Concretamente, en la biomasa del olivar está entre 16% (hojas de olivo) y 46% (pulpa residual) (Tabla 2).

La lignina le confiere al material resistencia contra la acción microbiana. Se han encontrado diferencias entre los compuestos aromáticos en función del tipo de biomasa. Por ejemplo, en maderas duras, la lignina incluye grandes cantidades de unidades guayacilo (G). Las unidades estructurales de la lignina en maderas blandas son principalmente unidades tipo siringilo (S), existiendo una pequeña cantidad de unidades del tipo *p*-hidroxifenilo (H). La biomasa herbácea contiene los tres tipos de unidades, H, G y S; lo que provoca que su lignina sea más compleja y heterogénea que en las maderas. Aunque hay pocos estudios sobre caracterización de lignina de biomasa del olivar, se ha observado que la poda de olivo contiene una cantidad similar de unidades G y S, encontrándose normalmente estas últimas en mayor proporción (Erdocia et al., 2014) mientras que en el orujo predominan las unidades G (Sampedro et al., 2009).

La lignina es considerada como un producto natural con elevada funcionalidad química y biofísica. En los últimos años, el interés industrial por este polímero ha ido aumentando debido a su bajo coste, a sus numerosas propiedades (alto contenido de carbono, alta estabilidad térmica, biodegradabilidad, actividad antioxidante y rigidez favorable) (Zhu et al., 2020) y sus múltiples aplicaciones en los sectores de los biocombustibles, los bioplásticos y los alimentos (Gutiérrez-Villanueva et al., 2020). La lignina también es considerada una interesante fuente natural de compuestos aromáticos (Michelin et al., 2018), que actúan como agentes antioxidantes, antiinflamatorios, antibacterianos o anticancerígenos (Spiridon, 2018).

2.2.3.4. Componentes no estructurales

Los componentes no estructurales son compuestos que se encuentran en la biomasa lignocelulósica en bajas concentraciones y no presentan una función estructural dentro de la pared celular (Pecha y Garcia-Perez, 2020).

2.2.3.4.1. Extractivos

Los extractivos son un grupo heterogéneo que representan entre el 4-10% del peso seco del material, aunque dependiendo de la biomasa puede alcanzar valores más altos como es el caso de la poda de olivo y el orujillo. En este caso, los valores rondan entre 29% y 42%, respectivamente (Contreras et al., 2020a; Manzanares et al., 2020).

Los extractivos son el grupo principal de compuestos no estructurales y están formados por una gran variedad de compuestos químicos como ceras, resinas, proteínas, terpenos, compuestos fenólicos, etc. (Pecha y Garcia-Perez, 2020; Pereira et al., 2003). Entre sus funciones están las de reservas de energía, son intermediarios metabólicos y actúan como parte de mecanismos de defensa contra ataques microbianos. Los extractivos pueden mejorar las propiedades de resistencia y son los responsables del color y del olor de la planta (Loaiza-Rodríguez, 2019).

Estos compuestos presentan un bajo peso molecular y son solubles en agua o disolventes orgánicos, que pueden eliminarse del vegetal sin que se produzcan cambios estructurales en la célula (Pereira et al., 2003). En los procedimientos estandarizados del NREL, los extractivos se dividen en extractivos acuosos y extractivos etanólicos en función del disolvente en el que se disuelven mediante extracción Soxhlet (Sluiter et al., 2005). En la

siguiente tabla, se muestra los porcentajes de dichos extractivos en los subproductos /residuos del olivar y de la industria oleícola (Tabla 4).

Tabla 4. Contenido (% peso seco) de extractivos acuosos y etanólicos en los subproductos y residuos de la industria del olivar.

Biomasa	Extractivo acuoso	Extractivo etanólico
Poda de olivo	23,7	4,1
Hojín	21,9	13,2
	23,1	12,7
Orujo de dos fases	31,0	20,3
Orujillo	37,5	4,5
Hueso de aceituna	3,9	2,4
Pulpa residual	8,4	17,9

Un estudio reciente ha puesto de manifiesto que los extractivos acuosos de poda, hojín, orujillo y hueso contienen azúcares libres y oligoméricos, ácidos orgánicos, alditoles como el manitol, elementos inorgánicos, compuestos fenólicos, proteínas y otros componentes no identificados (Doménech et al., 2021) (Figura 20).

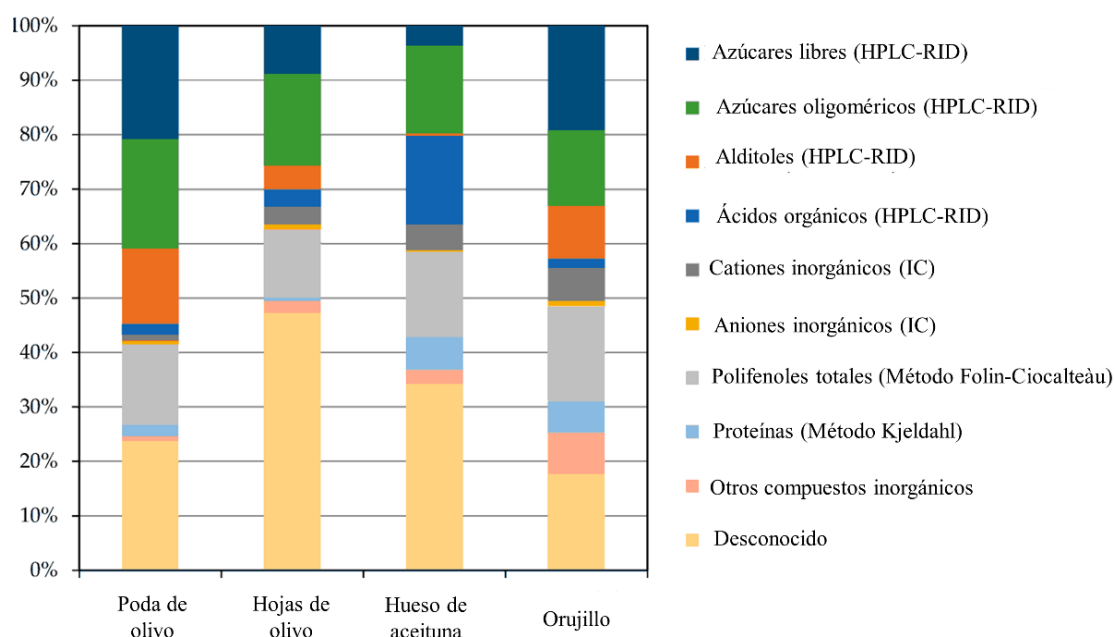


Figura 20. Composición de los extractivos acuosos de los residuos y subproductos del olivar y del aceite de oliva. Fuente: adaptado de Doménech et al. (2021).

Esta fracción posee un interés industrial bastante significativo por la presencia de componentes bioactivos, en particular los compuestos fenólicos y terpenos. Estos

compuestos tienen interés en la industria alimentaria, cosmética, textil y de embalaje (Albuquerque et al., 2021).

2.2.3.4.2. Grasa

El contenido de grasa de los residuos del olivar varía entre 2% (hojín) y 21% (pulpa residual) (Tabla 2). Como se ha comentado previamente, el aceite residual del orujo se extrae para obtener aceite de repaso y aceite de orujo, que es rico en ácido oleico, por lo que puede ser una interesante alternativa a otras grasas al permitir alcanzar la recomendación de consumir el 20% de la energía total de la dieta en forma de ácidos grasos monoinsaturados (Mateos et al., 2020). Estudios recientes sugieren que este aceite también podría emplearse para obtener biodiesel *via* transesterificación (Özçelik et al., 2020).

Por otra parte, la pulpa residual contiene alrededor del 8,5% de grasa con un alto contenido en ácidos grasos insaturados (80,3%), siendo el ácido oleico (68,5%) el principal ácido graso (Peláez Renovables, 2020).

2.2.3.4.3. Proteínas

Las proteínas suelen encontrarse en pequeñas cantidades en los materiales lignocelulósicos. En la biomasa del olivar varía entre 0,7% (hueso) y 10% (orujo de dos fases y orujillo) (Tabla 2), siendo el hueso el material que menos proteína tiene. Las principales proteínas que componen la pared celular de los materiales lignocelulósicos pueden ser: extensinas, lectinas (actualmente, no se conoce su función), proteínas arabino-galactano (su función principal es participar en el reconocimiento célula-célula), proteínas ricas en glicina (tienen importantes funciones relacionadas con el sistema vascular y con la cicatrización de heridas) y proteínas ricas en prolina (se relacionan con el desarrollo normal de la planta) (Loaiza-Rodríguez, 2019). En la hoja, se puede encontrar proteínas como la oleuropeína- β -glucosidasa y rubisco, implicada en la fotosíntesis (Vergara-Barberán et al., 2015).

Otros estudios sugieren que las proteínas juegan un papel importante en el procesado, estabilidad y calidad de la aceituna y del aceite (Vergara-Barberán et al., 2015). Entre las proteínas presentes en la semilla y pulpa de la aceituna, se han detectado proteínas de almacenamiento, oleosinas, proteínas de tipo taumatina y polipéptidos (Montealegre et

al., 2014). De estas, las proteínas de almacenamiento de semillas de tipo globulina, similares a las proteínas 11S de otras familias de plantas, se han caracterizado en el alpeorujo (Jiménez et al., 2007).

El valor nutricional de las proteínas como fuente de amino ácidos las hace adecuadas para la alimentación humana y para formulación de piensos (Baker y Charlton, 2020), además son de interés en la industria química (Sari et al., 2015). Su extracción eficiente permitiría incrementar la cadena de valor de las biomasas residuales del olivar.

2.2.3.4.4. Cenizas

Las cenizas se definen como el residuo obtenido en la combustión de la biomasa. Representan en torno al 1% del peso de la madera, aunque en las plantas herbáceas su contenido es más elevado. Estos valores son también relativamente altos en la poda y en los residuos de la industria oleícola (entre 3 y 9%), salvo en el caso del hueso (0,6%) (Tabla 2).

Están compuestas principalmente por compuestos inorgánicos formados por elementos como calcio, potasio y magnesio que permanecen después de la incineración del material (Kim et al., 2018). Así, las cenizas de la poda, del hueso, del orujo y del orujillo son ricas en potasio por lo que podrían servir para fertilización (Pellet del Sur, 2021), para fabricación de ladrillos de arcilla (de la Casa y Castro, 2014) y como activadores alcalinos en la producción de geopolímeros sostenibles (Carrillo-Beltrán et al., 2021).

2.3. Compuestos bioactivos de la biomasa del olivar

2.3.1. Tipos de compuestos bioactivos e interés industrial

Según Biesalski et al. (2009), los compuestos bioactivos son “compuestos esenciales y no esenciales que se encuentran en la naturaleza, forman parte de la cadena alimentaria y se puede demostrar que tienen un efecto sobre la salud humana”. En este concepto se incluyen a los fitoquímicos o metabolitos secundarios producidos por las plantas, para su supervivencia y defensa, que provocan efectos farmacológicos o toxicológicos en el hombre y los animales.

2.3.1.1. Derivados de azúcares

2.3.1.1.1. Polioles

Los polioles, también conocidos como alcoholes de azúcar, son un conjunto de compuestos de sabor dulce que se emplean como edulcorantes bajos en calorías y que presentan baja digestibilidad (Ghosh y Sudha, 2012). Además, son empleados en una gran variedad de alimentos comerciales como aditivos ya que son estables a altas temperaturas y diferentes pH y confieren características organolépticas a los alimentos (Plaza-Díaz et al., 2020).

Los principales polioles utilizados como edulcorantes y autorizados por la FDA, el Codex Alimentarius y la EFSA son el sorbitol (E420), manitol (E421), isomalt (E953), maltitol (E965), lactitol (E966), xilitol (E967), eritritol y los hidrolizados de almidón hidrogenado.

Según la Comisión Europea estos compuestos presentan un valor calórico de 2,4 kcal/g, mientras que la Federación de Sociedades Estadounidenses de Biología Experimental (FASEB) indicó que oscilan entre 1,6 y 3,0 kcal/g. La ingesta máxima debe ser 40-50 g/día para adultos y 30 g/día para niños con el fin de evitar molestias gastrointestinales. La Figura 21 muestra la estructura de los principales polioles.

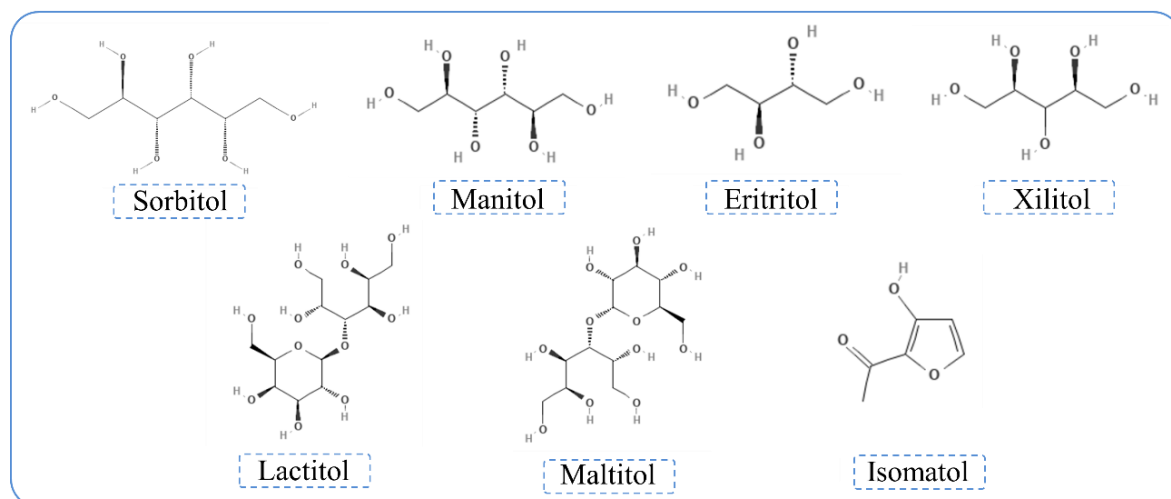


Figura 21. Estructura química de los polioles. Fuente: elaboración propia a partir de PubChem.

De entre estos polioles, el **manitol** es uno de los primeros ingredientes “sin azúcar” que se emplea en alimentos. Se encuentra de forma natural en la poda y en los residuos de la industrial oleícola. Un estudio reciente sugiere que es abundante en la poda, constituyendo alrededor del 14% del peso total de extracto acuoso, mientras que el contenido de este compuesto es muy bajo en el hueso (<0.5% del peso total de extracto acuosos) (Doménech et al., 2021). En este estudio no se detectó otros polioles como el glicerol, xilitol, arabinitol y sorbitol. La Tabla 5 muestra el contenido de manitol extraído de estas biomásas y el método de extracción empleado.

Actualmente, el manitol se utiliza en la industria alimentaria como edulcorante, para la conservación de alimentos (aumentando su vida útil al reducir la cristalización del azúcar) y para enmascarar sabores amargos (Contreras et al., 2021; Ribeiro et al., 2020). Este compuesto se emplea como fármaco para tratar el ictus agudo, como agente protector y terapéutico durante la insuficiencia neurológica o renal (Chiang et al., 2017) y para tratar enfermedades como el Parkinson (Paul et al., 2019). Este compuesto puede ser co-extraído con otros compuestos bioactivos de interés como los compuestos fenólicos (Contreras et al., 2020a).

Otro poliol interesante es el **xilitol**, que puede obtenerse a partir de la hoja de olivo en pequeñas cantidades de entre 2 y 6 mg/g de hoja, dependiendo del método de extracción y del cultivar (Lama-Muñoz et al., 2020a; Romero-García et al., 2016a). Como se comentó anteriormente, este compuesto también puede obtenerse por fermentación a partir de poda de olivo, hueso de aceituna y orujillo (López-Linares et al., 2020b; Susmozas et al., 2019).

Las principales aplicaciones de este compuesto son: en la industria alimentaria (confitería y chicles), en odontología (evita el crecimiento de bacterias que causan caries, reduce el daño del esmalte y reduce la proliferación de la candidiasis oral) y en la industria farmacéutica (previene infecciones de oído y otitis y se utiliza como edulcorante para jarabes, vitaminas, etc.). El consumo de este compuesto es apto para diabéticos y ayuda al tratamiento de la hiperglucemia (Lugani et al., 2017).

2.3.1.1.2. Oligosacaridos

Los oligosacáridos son carbohidratos que contienen de 2 a 10 unidades de monosacáridos unidos por enlaces O-glicosídicos. Dependiendo del número de unidades se denominan disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos, etc. (Martín-Ortíz, 2019). Dentro de este grupo y en función de sus propiedades fisiológicas se encuentran los oligosacáridos digeribles y los que son resistentes a la hidrólisis por parte de las enzimas digestivas humanas. Estos compuestos son solubles en agua, sirven como fibras dietéticas y pueden presentar propiedades prebióticas, es decir, sirven de sustrato para la microbiota intestinal “que los utiliza de forma selectiva y confieren un beneficio para la salud” (La Fata et al., 2017). Estos compuestos, además presentan un poder calorífico bajo, resultan entre 0,3 y 0,6 veces más dulces que la sacarosa, y no son cariogénicos. Su dulzor relativamente bajo los hace adecuados para mejorar la calidad de muchos alimentos, aunque también se pueden utilizar como sustitutos del azúcar en confitería, chicles, yogures y bebidas (Mussatto y Mancilha, 2007).

Dentro de los oligosacáridos funcionales se encuentran los fructooligosacáridos, glucooligosacáridos, isomaltoligosacáridos, oligosacáridos manano, galactooligosacáridos, gentiooligosacáridos, isomaltulosa, lactosacarosa, maltoligosacáridos, xilooligosacáridos, oligosacáridos ácidos derivados de pectina y ciclodextrinas. En el caso de los residuos del olivar y de la industria oleícola, estos se han

obtenido a partir de la poda de olivo y del hueso de aceituna. La Tabla 5 muestra el contenido de oligosacáridos extraído de las biomásas de olivar y el método de extracción empleado.

Tabla 5. Obtención de manitol y oligosacáridos a partir de residuos del olivar y de la industria oleícola mediante diferentes métodos de extracción.

Muestra	Técnica de extracción y condiciones	Disolvente	Cantidad	Referencia
Manitol				
Poda de olivo	Extracción Soxhlet (2% m/v, 12 h)	Agua	139 mg/g ^a	Doménech et al., 2021
Hojas de olivo	Extracción con fluidos presurizados (14% m/v, 190°C, 5 min)	60% etanol	29,7-63,7 mg/g ^a	Lama-Muñoz et al., 2020b
	Extracción Soxhlet (4 h)	60% etanol	31,7-82,2 mg/g ^a	Lama-Muñoz et al., 2020b
	Explosión por vapor (180°C, 8,3 min)	-	52,0 mg/g ^a	Romero-García et al., 2016a
Hojín	Extracción Soxhlet (2% m/v, durante la noche)	Agua	44 mg/g ^a	Doménech et al., 2021
	Extracción hidrotérmica (5% m/v, 100°C, 90 min)	Agua	36 mg/g ^a	López-Linares et al., 2019
Orujillo	Extracción Soxhlet (2% m/v, 12 h)	Agua	96 mg/g ^a	Doménech et al., 2021
	Extracción hidrotérmica (15% m/v, 100°C, 30 min)	Agua	39,0 mg/g ^a	Manzanares et al., 2020
Orujo de dos fases	Centrifugación (10000 × g, 10 min)		141 mg/g ^b	Ribeiro et al., 2021
Hueso de aceituna	Extracción Soxhlet (2% m/v, 12 h)	Agua	4 mg/g ^a	Doménech et al., 2021
Oligosacáridos				
Poda de olivo	Autohidrólisis (180°C, 10 min)	Agua	37,5 g/L	Cara et al., 2012
Hueso de aceituna	Autohidrólisis (100°C, 5 min)	Agua	147 mg /g ^a	Cuevas et al., 2015

^aReferido a peso seco de biomasa.

2.3.1.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son uno de los grupos más importante de fitoquímicos que se encuentran presentes en las plantas como metabolitos secundarios (Alara et al., 2021). Estos confieren a las plantas diversas capacidades como soporte estructural, protección contra los rayos ultravioletas, agente alelopático, atrayentes para animales polinizadores y dispersores de semillas, etc. (de la Rosa et al., 2019).

Están compuestos por un anillo aromático de seis átomos de carbono unido normalmente al menos a un grupo hidróxilo (-OH) u otros grupos funcionales como azúcares, estando vinculados a la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa, arabinosa, etc., terpenos, ácidos orgánicos, etc. (Medina-Torres et al., 2017). También, pueden estar unidos a azúcares por medio de enlaces C-glicosídicos (Ammar et al., 2017). La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a su facilidad para ceder átomos de hidrógeno al radical libre y también a la posibilidad de deslocalizar las cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático (Duthie et al., 2003).

Atendiendo al número de anillos aromáticos que contienen y a su estructura química, los compuestos fenólicos se pueden clasificar como: fenoles simples, alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, taninos y lignanos (Albuquerque et al., 2021) (Figura 22).

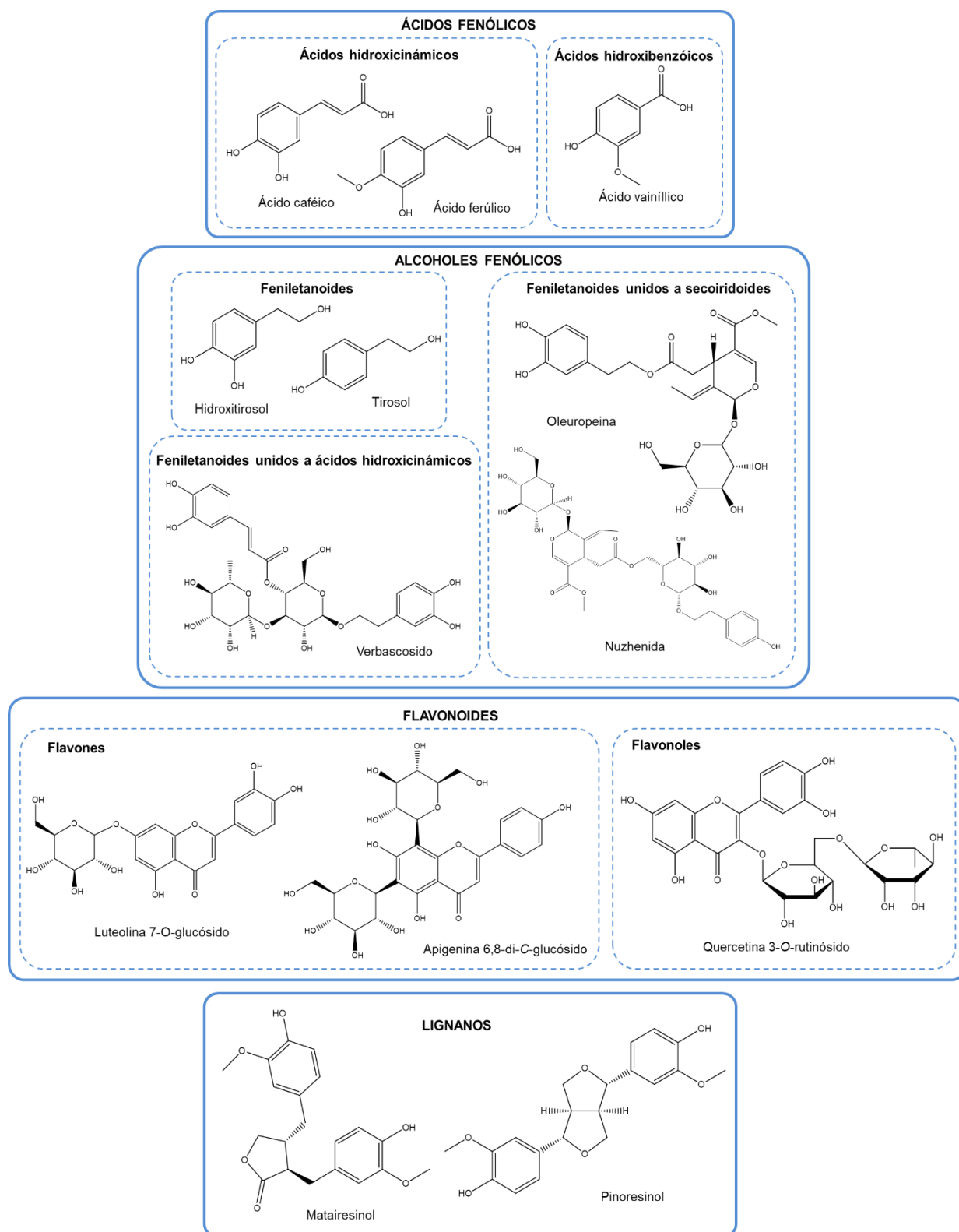


Figura 22. Estructura química de los principales compuestos fenólicos presentes en los subproductos y residuos de la industria del olivar. Fuente: elaboración propia.

- **Fenoles simples:** son aquellos que tienen solo un anillo de benceno. Los principales fenoles simples son el catecol, la hidroquinona y el floroglucinol, que se encuentran presentes en plantas aromáticas y medicinales (Tsimogiannis y Oreopoulou, 2019).

- **Ácidos fenólicos:** son compuestos que presentan un grupo ácido carboxílico y constituyen alrededor de un tercio de los fenoles de la dieta. Pueden presentarse de manera conjugada solubles e insolubles y raramente en forma libre. Estos compuestos se dividen principalmente en dos subgrupos: ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos. En los ácidos hidroxibenzoicos, el grupo carboxilo está directamente unido al anillo aromático, presentando una estructura C6 (anillo aromático)-C1 (Figura 22). Los más comunes son: los ácidos *p*-hidroxibenzoico, vanílico y sirínico. Los ácidos hidroxicinámicos presentan una cadena lateral de tres carbonos unida al anillo aromático, presentando una estructura C6-C3 (Figura 22). Los más comunes son los ácidos ferúlico, cafeico, *p*-cumarico y sinápico (Albuquerque et al., 2021).

- **Alcoholes fenólicos:** dentro de este grupo se encuentran los alcoholes fenilpropílicos y los feniletanoides. Los alcoholes fenilpropílicos pueden aparecer libres o, también, unidos formando la lignina como se comentó en el Apartado 2.2.3.3. Los feniletanoides pueden estar libres como el hidroxitirosol, unidos a terpenos como la oleuropeína (secoiridoide) o a un ácido fenólico como el ácido cafeico (Figura 22).

- **Flavonoides:** comúnmente, se encuentran en frutas y verduras, aunque su contenido y tipo varía en función de la planta y de las condiciones de crecimiento, climatológicas y de almacenamiento (Górniak et al., 2019). Hasta la fecha, se han identificado más de 8000 flavonoides distintos (Albuquerque et al., 2021). Estos compuestos constan de 15 átomos de carbono dispuestos en una configuración C6-C3-C6, es decir, la mayoría de sus estructuras químicas consisten en dos anillos de fenilo (A y B) unidos a través de un anillo C pirano (heterocíclico) (Figura 23). Esta estructura básica permite una gran variedad de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C, de ahí que se distingan las siguientes clases de flavonoides: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, isoflavonas, flavanonoles y antocianidinas (Testai, 2015) (Figura 23). A su vez, en el grupo de flavanoles, se puede distinguir: formas monoméricas (catequinas) y formas oligoméricas y poliméricas (proantocianidinas o taninos condensados).

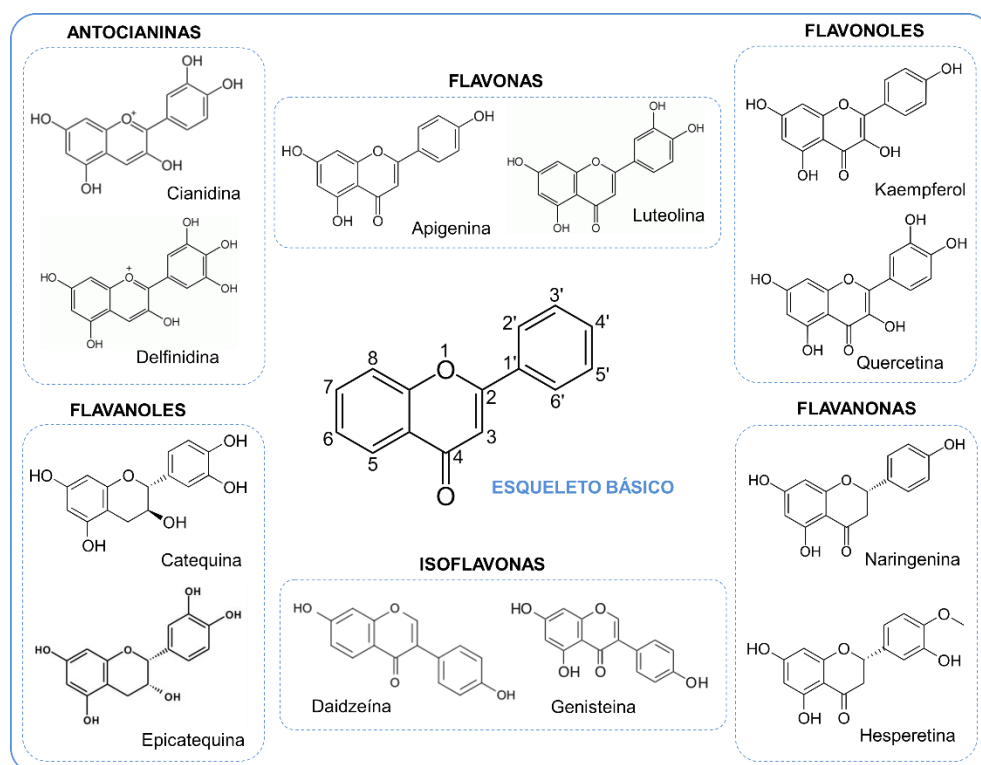


Figura 23. Estructura química de los principales tipos de flavonoides.
Fuente: Elaboración propia.

La Figura 23 muestra ejemplos de la estructura química de flavonoides presentes en los residuos del olivar, observándose que pueden aparecer unidos a azúcares mediante enlaces O- y C-glucosídicos.

- **Estilbenos:** poseen una estructura C6-C2-C6 que contiene dos anillos aromáticos unidos por un puente de etileno. Normalmente se encuentran en un número reducido de especies de plantas y se hallan como monómeros, oligómeros y como conjugados con azúcares. Se conocen más de 400 estilbenos y la forma molecular más extendida de este grupo es el resveratrol (Durazzo et al., 2019) (Figura 24).

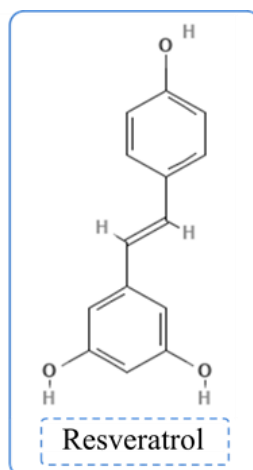


Figura 24. Estructura química del resveratrol. Fuente: PubChem.

- **Taninos:** son compuestos polifenólicos que presentan un peso molecular entre 500 y 3000 (ésteres de ácido gálico) y hasta 20000 (proantocianidinas) (Alamgir, 2018). Se clasifican en taninos hidrolizables y taninos condensados o proantocianidinas (Figura 25). Los taninos hidrolizables consisten en una molécula central de glucosa unida a moléculas de ácido gálico (galotaninos) o ácido hexahidroxidifénico (elagitaninos). Se encuentran normalmente en las bayas, el mango y las nueces. Los taninos condensados son flavanoles poliméricos que no se hidrolizan con facilidad. Se trata de moléculas de catequina y epicatequina unidas por enlaces carbono-carbono (Tsimogiannis y Oreopoulou, 2019).

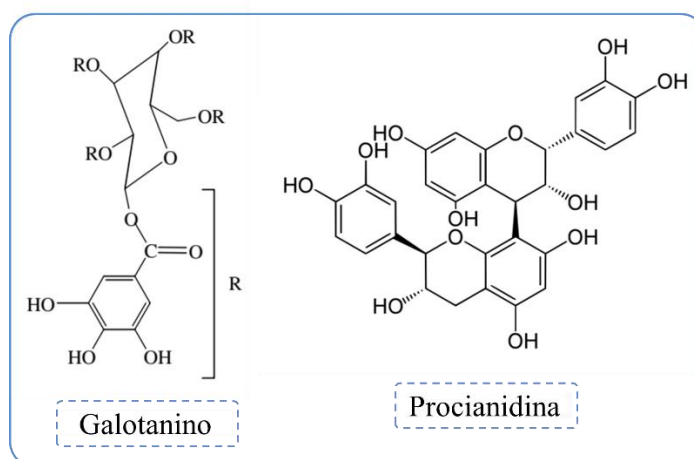


Figura 25. Estructura química de un galotanino y una procianidina. Fuente: He et al. (2011); Mingshu et al. (2006).

- **Lignanós:** son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por dimerización oxidativa de dos unidades fenilpropanoides (C_6-C_3). A pesar de presentar en su estructura solo dos unidades de fenilpropano, se pueden encontrar una elevada

diversidad de estructuras y normalmente se encuentran en la naturaleza de forma libre (Zhang et al., 2014) (Figura 22).

Los subproductos de la industria del olivar se caracterizan por poseer un alto contenido en compuestos fenólicos: las hojas de olivo (Lama-Muñoz et al., 2020a), la poda de olivo (Conde et al., 2009), hojín (Talhaoui et al., 2015; Martínez-Patiño et al., 2019a), orujo (Chanioti y Tzia, 2018; Goldsmith et al., 2018), hueso (Inostroza et al., 2018) y orujillo (Domenech et al., 2021). La Figura 22, como ejemplo, muestra estructuras químicas de los principales compuestos fenólicos caracterizados en estos residuos/subproductos, así como su clasificación.

La Tabla 6 muestra algunos de los compuestos cuantificados en los diferentes residuos y subproductos del olivar y sus industrias asociadas. Estos compuestos pueden presentar efectos beneficiosos para la salud humana y función protectora contra una amplia variedad de enfermedades y otros trastornos neurodegenerativos (Wang et al., 2015), y aportan protección cardiovascular (Testai, 2015).

Además, estos compuestos pueden presentar excelentes propiedades como conservantes de alimentos (Martillanes et al., 2017) y tienen muchas aplicaciones industriales, por ejemplo, pueden usarse como colorantes naturales para alimentos, o en la producción de pinturas, papel y cosméticos (Albuquerque et al., 2021).

Tabla 6. Compuestos fenólicos identificados en residuos y subproductos del olivar y de la industria oleícola.

Tipo de muestra	Clase	Compuesto fenólico	Cantidad	Referencia
Poda de olivo	Feniletanolide	Hidroxitirosol	31,1 mg/g ^b	Conde et al., 2009
	Aldehído fenólico	3-4 hidroxibenzaldehído	2,0 mg/g ^b	Conde et al., 2009
	Feniletanoide	Tirosol	2,4 mg/g ^b	Conde et al., 2009
	Secoiridoide	Oleuropeína	4,7 mg/g ^b	Conde et al., 2009
Hojas de olivo	Secoiridoide	Oleuropeína	63,4 mg/g ^a	Lama-Muñoz et al., 2019b
	Flavona	Luteolina-7-O-glucósido	2,7 mg/g ^a	Lama-Muñoz et al., 2019b
Hojín	Secoiridoide	Oleuropeína	30,0 mg/g ^b	Contreras et al., 2021
	Feniletanoide	Hidroxitirosol	2,0 mg/g ^b	Contreras et al., 2021
	Secoiridoide	Oleuropeína	47,0 mg/g ^a	Romero et al., 2017
Orujo de dos fases	Feniletanoide	Hidroxitirosol	1,4 mg/g ^c	Rigane et al., 2012
	Feniletanoide	Hidroxitirosol	2,0 mg/g ^a	Ramos et al., 2013
Hueso de aceituna	Feniletanoide	Hidroxitirosol	1,1 mg/g ^a	Fernández-Bolaños et al., 1998
	Feniletanoide	Tirosol	0,6 mg/g ^a	Fernández-Bolaños et al., 1998
	Secoiridoide	Nuezhenide	3,3 mg/g ^a	Mansour et al., 2015
	Lignano	Pinoresinol	1,9 mg/g ^a (UAE)	Inostroza et al., 2018
			1,0 mg/g ^a (Soxhlet)	
Aguas residuales	Secoiridoide	3,4-DHPEA-EDA	3,1 mg/g ^a (SPE)	La Scalia et al., 2017
			0,005 mg/g ^a	
			0,2 mg/g ^a	
			0,02 mg/g ^a	
	Secoiridoide	3,4-DHPEA-EA	0,02 mg/kg ^a	La Scalia et al., 2017

^aReferido a peso seco de biomasa; ^bReferido a peso seco de extracto; ^cReferido a biomasa húmeda; 3,4-DHPEA-EDA:oleaceína.

Entre estos compuestos cabe destacar el hidroxitirosol y la oleuropeína ya que se han publicado numerosos estudios *in vivo* y clínicos que demuestran sus propiedades farmacológicas (Tabla 7). Así, el hidroxitirosol protege contra la oxidación de lípidos y previene las enfermedades cardiovasculares (Boronat et al., 2019) y en combinación con la vitamina E mejora la esteatosis y la hipertrigliceridemia en los niños (Mosca et al., 2020). De hecho, la EFSA ha publicado una declaración de propiedades saludables sobre los beneficios de una ingesta diaria mínima de 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados a través del consumo de aceite de oliva (Boronat et al., 2019; EFSA).

Además, el hidroxitirosol tiene una característica lipofílica e hidrofílica que lo hace soluble en agua y grasas (Martínez et al., 2018). De esta forma, la EFSA ha incluido el hidroxitirosol como un nuevo ingrediente alimentario antioxidante seguro que se puede añadir a los aceites vegetales y de pescado, y grasas para untar (EFSA). Esto hace que actualmente haya un gran interés en obtener ingredientes funcionales a partir de hidroxitirosol y extractos ricos en dicho compuesto.

Tabla 7. Ensayos *in vivo* y clínicos del hidroxitirosol (HT).

Muestra	Pureza	Dosis	Efecto	Referencia
Estudios <i>in vivo</i>				
Extractos de hoja de olivo ricos en HT	-	100-1000 mg/kg, 24 horas	Potente actividad antiinflamatoria y analgésica en ratas Wistar y ratones albinos suizos	Haloui et al., 2011
HT puro	100%	10-50 mg/kg, 8 semanas	Mejora la función mitocondrial y reduce el estrés oxidativo en el cerebro de ratones db/db con diabetes tipo 2	Zheng et al., 2015
HT puro y extracto secoiridoide	85-100%	5 mg/kg/día 3 semanas	Captación cerebral de HT y sus principales metabolitos circulantes: potencial protector en las células neuronales de ratas Wistar	López de las Hazas et al., 2018
HT purificado a partir de agua residual	98%	0,4 mg/g, 8 semanas	Efectos metabólicos positivos de HT en ratas Wistar hipercolesterolémicas (ej, mejora de los niveles de glucosa, insulina y leptina)	Tabernero et al., 2014
HT purificado a partir de aceitunas	98%	20 mg/kg/día, 8 semanas	Mejora de parámetros cardiovasculares y hepáticos en un modelo de rata de síndrome metabólico inducido por la dieta	Poudyal et al., 2017
HT	-	20 mg/kg, 2 veces al día, 90 días	Efecto protector del HT contra el estrés oxidativo inducido por la ocratoxina en células del riñón de ratones Sprague-Dawley	Crupi et al., 2020
Estudios clínicos				
HT puro	99,50%	45 mg/día, 8 semanas	Aumento de niveles de vitamina C endógena en voluntarios humanos con hiperlipidemia leve	Lopez-Huertas y Fonolla, 2017
Extracto de hoja de olivo rico en HT y Ole	6,8 mg/ml Ole + 0,3 mg HT/ml	136 mg Ole + 6 mg HT, 2 veces al día durante 6 semanas	Reducción de la presión arterial y mejora de los lípidos plasmáticos y los marcadores inflamatorios	Lockyer et al., 2017
HT y vitamina E	-	3,75 mg HT + 5 mg de vitamina E), 2 cápsulas diarias durante 16 semanas	Reducción de la inflamación sistémica relacionada con la enfermedad del hígado graso no alcohólico en niños, mejora de la esteatosis y la hipertrigliceridemia	Mosca et al., 2020

Ole, oleuropeína.

2.3.1.3. Terpenos

Los terpenos son una clase de metabolitos secundarios naturales que se encuentran en diversas especies animales y vegetales. Constituyen la clase más amplia de compuestos naturales con más de 60.000 compuestos diferentes identificados (Pazouki y Niinemetst, 2016). Estos compuestos son hidrocarburos que se clasifican por el número de unidades de isopreno (C_5H_8) (Figura 26), siendo los más comunes los mono-, sesqui-, di- y tri-terpenos (C_{10} , C_{15} , C_{20} , C_{30} , respectivamente).

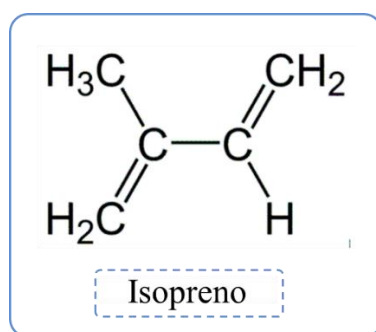


Figura 26. Fórmula estructural del isopreno. Fuente: PubChem.

Los terpenos son empleados en la industria como agroquímicos, cosméticos, nutracéuticos y farmacéuticos (Lima et al., 2016). También, se han identificado terpenos específicos para su empleo como biocombustibles especiales ya que presentan puntos de inflamación, puntos de congelación y densidades energéticas adecuados para ese uso (Mewalal et al., 2017).

En las biomásas del olivar se encuentran, principalmente, monoterpenos y triterpenos. Dentro del primer grupo se encuentran los iridoides y secoiridoides. Estos pueden estar libres o unidos a compuestos fenólicos, como se ha indicado previamente. Atendiendo a su estructura, los triterpenos se pueden clasificar en lineales (principalmente derivados del escualeno), tetracíclicos y pentacíclicos (Chudzik et al., 2015) (Figura 27). Los triterpenos caracterizados en la hoja de olivo y en los residuos del olivar y de la industria oleícola pertenecerían a este último tipo, destacando los ácidos triterpénicos y los alcoholes triterpénicos.

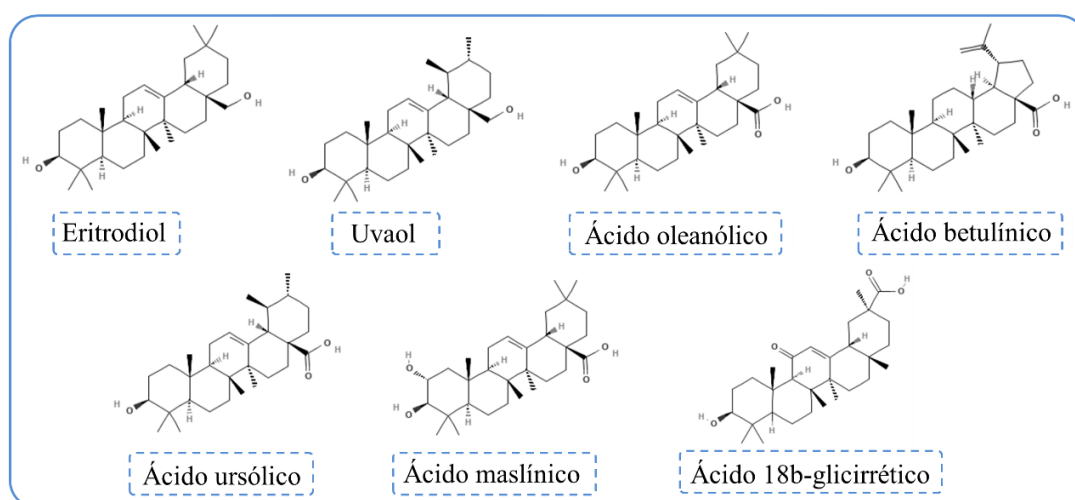


Figura 27. Estructura química de compuestos triterpénicos que pueden estar presentes en el aceite y/o residuos del olivar y de la industria oleícola. Fuente: adaptado de Guinda et al. (2010).

En particular, el ácido maslínico, es un ácido triterpénico presente en una concentración relativamente alta en las hojas de olivo, orujo, orujillo y pulpa residual de la limpieza del hueso (Contreras et al., 2020a; Romero et al., 2017). El ácido oleanólico es también un compuesto bioactivo presente en las hojas de olivo (Contreras et al., 2020a; Martín-García et al., 2019). La Tabla 8 muestra los principales triterpenos identificados en dichas biomásas, su contenido y el método de extracción empleado en cada caso.

En general, los triterpenos pueden presentar propiedades antiinflamatorias, hepatoprotectoras, antitumorales, antivirales, anti-VIH, antimicrobiano, antifúngico, antidiabético, gastroprotector, antioxidantes y antihiperlipidémico (Chudzik et al., 2015). Por ello, su extracción también es interesante para obtener productos enriquecidos en los mismos con una amplia gama de aplicaciones en los sectores de la alimentación, la salud y la biotecnología industrial (Thimmappa et al., 2014).

Tabla 8. Obtención de triterpenos de residuos del olivar y de la industria oleícola mediante diferentes métodos de extracción sólido-líquido.

Muestra	Método de extracción	Disolvente	Contenido total en triterpenos	Triterpenos principales	Referencia
Hojas de olivo	Homogeneización + UAE (2% m/v, 60°C, 30 min)	100% etanol	30,3-52,0 mg/g ^a	Ácido oleanólico (18,9-39,8 mg/g ^a) Ácido maslínico (1,9–5,9 mg/g ^a)	Martín-García et al., 2019
	Reflujo (65°C)	Diclorometano/metanol (2:1)	3,3 mg/g ^a	Ácido maslínico (2,8 mg/g ^a) Eritrodiol (0,4 mg/g ^a) Ácido oleanólico (0,07 mg/g ^a)	Stiti y Hartmann, 2012
	Maceración (doble extracción) (25°C, 5% m/v, 1h)	Agua	45,8 mg/g ^a	Ácido maslínico (7,3 mg/g ^a) Eritrodiol (0,8 mg/g ^a) Ácido oleanólico (34,5 mg/g ^a) Uvaol (0,7 mg/g ^a) Ácido ursólico (2,5 mg/g ^a)	Guinda et al., 2010
	Extracción fluidos supercríticos (40°C, 150 bar)	CO ₂ + 6,6% etanol	18,8-27,4 mg/g ^a	Ácido oleanólico (<16 mg/g ^a) Ácido ursólico (<12 mg/g ^a) Ácido maslínico (<1 mg/g ^a)	Taamalli et al., 2019
	Agitación (10% m/v, 1 min)	Metanol-etanol (1:1)	<35,0 mg/g ^b	Ácido oleanólico más abundante Otros: ácido maslínico	Romero et al., 2017
Orujo de dos fases	Agitación (10% m/v, 1 min)	Metanol-etanol (1:1)	2,5 mg/g ^b	Ácido maslínico más abundante que el ácido oleanólico	Romero et al., 2017
Orujo ^c	Extracción por microondas (5% m/v, 42°C, 3 min)	90% etanol	0,025 mg/g ^b	Ácido oleanólico (0,005 mg/g ^b) Ácido maslínico (0,02 mg/g ^b)	Ozkan et al., 2017
	Extracción Soxhlet (5% m/v, 4 h)	Etanol	0,014 mg/g ^b	Ácido oleanólico (0,004 mg/g ^b) Ácido maslínico (0,01 mg/g ^b)	Ozkan et al., 2017
	Extracción en baño (85°C, 0,5% m/v, 240 min)	90% etanol	309,7 mg/g ^b	Ácido oleanólico (21,5 mg/g ^b) Ácido maslínico (288,2 mg/g ^b)	Xie et al., 2019
	Extracción por microondas (50°C, 600W, 3,5% m/v, 5 min)	90% etanol	382,3 mg/g ^b	Ácido oleanólico (26,3 mg/g ^b) Ácido maslínico (356,0 mg/g ^b)	Xie et al., 2019
	Extracción por ultrasonidos (50°C, 135,6 W/cm ² , 3,5% m/v, 3 min)	90% etanol	411,0 mg/g ^b	Ácido oleanólico (29,8 mg/g ^b) Ácido maslínico (381,2 mg/g ^b)	Xie et al., 2019
Pulpa residual	Agitación (2,5% m/v, 1 min)	Metanol-etanol (1:1)	40 y 140 mg/g ^b	Ácido maslínico: 70% del total Otros: ácido oleanólico	Romero et al., 2017

^aReferido a peso seco de biomasa; ^bReferido a biomasa; ^cNo se ha definido que tipo de decánter se usa para extraer el aceite de oliva.

2.3.2. Extracción de compuestos bioactivos

La biomasa del olivar generalmente presenta un porcentaje alto de extractivos, que contienen compuestos bioactivos como el manitol, compuestos fenólicos y triterpenos, por lo que su extracción es de interés. Según Soto-García y Rosales-Castro, (2016) y Zhang et al. (2018), la extracción de compuestos bioactivos a partir de materias primas vegetales es bastante compleja ya que depende de diversos factores:

- El tipo de disolvente y el pH del medio de extracción, que influye en el rendimiento de extracción y el tipo de compuesto a extraer. Los disolventes polares, como el agua, etanol, metanol, acetona y acetato de etilo, se usan con frecuencia para recuperar compuestos bioactivos. Entre estos disolventes, el agua y el etanol son seguros para el uso de los extractos en humanos debido a la ausencia de toxicidad. El uso en alimentación de los otros disolventes está regulado por Real Decreto 1101/2011. Cabe decir, que el metanol suele emplearse para la extracción de compuestos fenólicos de bajo peso molecular, mientras que las disoluciones acuosas de acetona resultan eficientes para la extracción de compuestos de mayor peso molecular como los flavonoides. La temperatura que afecta a la solubilidad, a la transferencia de materia y a la estabilidad de los compuestos fenólicos debido a posibles reacciones de degradación química y enzimática, pérdidas por volatilización o descomposición térmica.

- El tiempo de extracción es un factor clave ya que influye en la eficiencia de la extracción.

- El tamaño de partícula cuya reducción favorece la penetración de solventes y la difusión de solutos, así como la forma de partícula es otro factor importante.

Además de la tecnología y condiciones de extracción, otros factores que pueden influir en la extracción de compuestos bioactivos son: el periodo de recolección, la variedad del olivo, el procesado de la aceituna, la humedad de la muestra y el método analítico empleado (Martín-García et al., 2019; Romero et al., 2017; Taamalli et al., 2019).

Respecto a la tecnología de extracción, en la actualidad, se usan las técnicas de extracción convencionales como la maceración, extracción en Soxhlet e hidrodestilación debido a su principal ventaja como procesos de extracción más económicos ya que no requieren equipamientos sofisticados, entre otros aspectos (Wong-Paz et al., 2020). Sin embargo,

también, presentan diversas desventajas, como el hecho de requerir tiempos de extracción largos y una gran cantidad de disolvente (Tabla 9). Por ello, se han desarrollado tecnologías alternativas que cumplen con los principios de la química verde (tecnologías “green”), como son las extracciones por ultrasonidos, por microondas, electrotecnologías, con fluidos supercríticos y subcríticos, con caída presión controlada instantánea y empleando una presión alta (Tabla 9).

Tabla 9. Ventajas e inconvenientes de las técnicas convencionales y nuevas tecnologías de extracción (basada en Buckow et al., 2010; Croxatto et al., 2021; Lavilla y Bendicho, 2017; Yahya et al., 2018).

	Ventajas	Desventajas
Técnicas convencionales de extracción		
Maceración	- No usa equipamiento sofisticado - Procesamiento poco costoso en términos ambientales y económicos	- Tiempos prolongados de extracción - Baja eficiencia de extracción
Soxhlet	- No usa equipamiento sofisticado - La muestra se encuentra repetidamente en contacto con el disolvente	- Grandes cantidades de disolvente - Tiempos largos de extracción - Degradación de compuestos termolábiles
Hidrodestilación	- No usa un equipamiento sofisticado	- Degradación de compuestos termolábiles y pérdida de volátiles a alta temperatura
Tecnologías novedosas de extracción – tecnologías “verdes”		
Ultrasonidos	- Tiempos cortos - Funcionamiento sencillo - Rendimiento alto - Ahorro de energía - Consumo reducido de disolvente - Escalable a escala industrial	- Requiere una etapa de filtración - Posible degradación de compuestos a altas frecuencias
Microondas	- Rápido - Fácil de manejar - Uso moderado de disolvente	- Riesgo de explosión. - El disolvente debe absorber la potencia del microondas - Caro
Electrotecnologías	- Coste energético limitado - Flexibilidad - Buena penetración del disolvente - Rendimiento de extracción alto - Escalable a escala industrial	- Falta de uniformidad del proceso - Alto coste de operación debido a la alta disipación de energía
Fluidos supercríticos	- Rápido - Los fluidos supercríticos presentan mejores propiedades de transporte que los líquidos - Alta selectividad - Proceso sostenible	- Coste de operación elevado - Se requiere conocimiento técnico de las propiedades del fluido supercrítico empleado

Extracción con enzimas	- Menor uso de disolvente - Reducido consumo de energía - Rendimiento de extracción alto - Extracción rápida - No se ha escalado, aunque es fácilmente escalable	- Alto coste de las enzimas
Caída de presión instantánea controlada	- Modifica las características estructurales de la biomasa (porosidad y superficie específica). - Aumenta la permeabilidad y disponibilidad de los compuestos de interés - Extracción rápida	- Riesgo de degradación térmica de los compuestos
Extracción acelerada con solventes o subcrítica	- Técnica respetuosa con el medio ambiente - Tiempo de extracción corto y simplicidad	- Formación de compuestos indeseables a altas temperaturas - Posible degradación de compuestos termolábiles
Extracción de alta presión hidrostática	- Coste energético reducido - No produce deterioro de sustancias termolábiles - No genera residuos	- Alto coste del equipo

2.3.2.1. Técnicas de extracción convencionales

2.3.2.1.1. Maceración

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido que se realiza a temperatura ambiente y normalmente emplea como disolventes agua y alcohol, o combinaciones de ambas para extraer los compuestos de interés. En general, la biomasa, primero, se muele, es decir, se reduce su tamaño para aumentar el área de la superficie de contacto con el solvente, luego se pone en contacto la biomasa con el solvente para poder extraer los compuestos bioactivos y, finalmente, se filtra, centrifuga o prensa la mezcla para recoger el extracto y separarlo del residuo sólido. La agitación, en el proceso de maceración, facilita la extracción ya que mejora la difusión de los compuestos al solvente y, así, aumenta el rendimiento de extracción (Selvamuthukumaran y Shi, 2017). Habitualmente, se utiliza para la extracción de componentes termolábiles.

Sus principales inconvenientes son que se emplean tiempos largos de extracción y presenta una baja eficiencia (Zhang et al., 2018). Por ello, en algunos estudios se han empleado temperaturas suaves para incrementar la extracción de compuestos bioactivos, incluso de hasta 70°C, ya que esta juega un papel importante en la tensión superficial, viscosidad del medio líquido y presión de vapor, aunque la temperatura óptima de extracción dependerá del tipo de compuesto bioactivo (Deng et al., 2017).

2.3.2.1.2. Soxhlet

La extracción Soxhlet es una técnica estándar de extracción sólido-líquido que presenta un rendimiento de extracción mayor que el resto de las técnicas de extracción convencionales. El disolvente se evapora y condensa entrando en contacto con la biomasa que contiene el compuesto de interés a extraer. El disolvente regresa al matraz (o cámara de disolvente) separando los compuestos extraídos. Permite el reciclaje eficiente del solvente y un contacto continuo de solvente fresco con la matriz sólida (Figura 28) (Arciniegas, 2020). Esta es su principal ventaja y, de ahí su eficiencia.

Algunos de los inconvenientes son el hecho de requerir un tiempo de extracción largo, una gran cantidad de disolvente y la falta de agitación (Hirondart et al., 2020).



Figura 28. Equipo experimental de extracción Soxhlet. Fuente: Elaboración propia.

2.3.2.1.3. Hidrodestilación

Este método de extracción se emplea para obtener aceites esenciales y compuestos bioactivos volátiles de plantas (Costa et al., 2012; Jeleń y Gracka, 2015). Existen tres tipos de hidrodestilación empleando agua como disolvente: destilación con agua, destilación con agua y vapor, y destilación con vapor directo (o por arrastre con vapor de agua) (Vankar, 2004). En esta técnica se agrega agua e inyecta vapor sobre el material a extraer y se lleva a ebullición. A continuación, se produce un enfriamiento del agua que conlleva a la condensación de la mezcla de vapor de agua y aceite. Finalmente, la mezcla condensada discurre desde el condensador hasta un separador, donde el aceite y los compuestos bioactivos se separan del agua (Selvamuthukumaran y Shi, 2017).

Los principales factores que influyen en la liberación de los compuestos bioactivos del material vegetal son el agua caliente y el vapor. Los principales inconvenientes de esta técnica son la pérdida de compuestos volátiles a alta temperatura y una limitada extracción de compuestos termolábiles (Azmir et al., 2013).

2.3.2.2. Tecnologías novedosas de extracción o “green”

En los últimos años se ha llevado a cabo la implementación de nuevas tecnologías de extracción de compuestos bioactivos, empleando diferentes mecanismos con el propósito de reducir el tiempo de extracción y el consumo de energía, lo que se traduce en un coste de proceso menor (Zeković et al., 2017). Estas técnicas son consideradas como “ecológicas e innovadoras” y, también, se denominan tecnologías de extracción verdes o “green” (Kumar et al., 2021). Algunas de las técnicas más prometedoras son la extracción por ultrasonidos y microondas, las electrotecnologías, el empleo de enzimas, líquidos presurizados y fluidos supercríticos y aquellas que se basan en un cambio de presión.

2.3.2.2.1. Extracción por ultrasonidos

La tecnología de ultrasonidos es una técnica basada en la incidencia de ondas ultrasónicas sobre un medio físico a diferentes frecuencias. Atendiendo a su frecuencia, los ultrasonidos se pueden clasificar como: i) ultrasonidos de potencia convencional, (también llamados ultrasonidos de baja frecuencia) que van de 20 kHz a 100 kHz ($<1 \text{ W/cm}^2$) y son empleados para la extracción de compuestos bioactivos, desespumado, desgasificación y esterilización; ii) ultrasonidos de diagnóstico (también conocidos como ultrasonidos de alta frecuencia) que van de 2 MHz a 10 MHz ($10\text{-}1000 \text{ W/cm}^2$) y se emplean para la obtención de imágenes médicas (Osorio-Tobón, 2020).

La extracción por ultrasonidos se ve afectada por diversos factores como la frecuencia, la temperatura, el tiempo de extracción, la amplitud, la intensidad, la potencia de sonicación y las propiedades del disolvente empleado (Chemat et al., 2017). Esta técnica puede producir diferentes efectos físicos, químicos y mecánicos como la cavitación, la vibración, la agitación y la presión sobre el material en el que se aplique. Estos fenómenos permiten una mayor penetración del disolvente en la matriz celular, una alteración de la estructura y como consecuencia una mejora en la transferencia de materia (Xu et al., 2017).

La extracción asistida por ultrasonidos se basa fundamentalmente en el principio básico de funcionamiento de la cavitación acústica o ultrasónica. Cuando las ondas se propagan a través de un medio se producen una serie de compresiones y refracciones en las moléculas del medio. Cada cambio de presión causa la formación, expansión y colapso de las burbujas formadas, dando lugar finalmente a la implosión de las burbujas en el medio líquido durante la fase de compresión.

La cavitación puede ser estable o transitoria. La cavitación estable se produce a bajas intensidades y los efectos químicos producidos son mínimos. Por el contrario, la cavitación transitoria, se produce a intensidades elevadas produciendo grandes efectos químicos (Lavilla y Bendicho, 2017) (Figura 29).

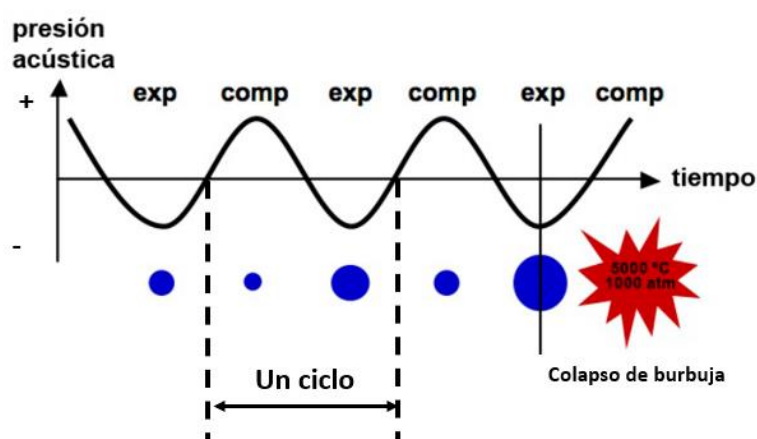


Figura 29. Fenómeno de cavitación en ultrasonidos. Fuente: adaptada de Grupo GIDOLQUIM.

Los equipos de ultrasonidos comúnmente empleados para la extracción de compuestos bioactivos son el baño de ultrasonidos y el ultrasonidos de tipo sonda (Martínez-Patiño et al., 2019b). El baño de ultrasonidos es empleado principalmente para lograr la dispersión de sólidos en solventes, esto produce una disminución del tamaño de partícula del material y mejora su solubilización. Este equipo, por lo general presenta una intensidad baja ya que el transductor no se encuentra en contacto con la muestra. En cambio, en el sistema de tipo sonda (Figura 30), la energía se aplica directamente a la muestra por lo que la pérdida de energía es insignificante (Wen et al., 2020).

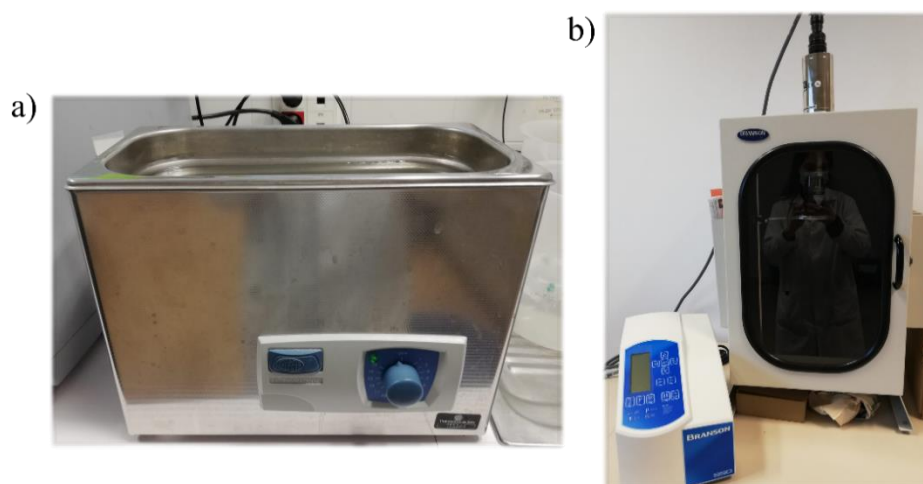


Figura 30. Equipo experimental de ultrasonidos: baño (a) y sonda (b)
Fuente: Elaboración propia.

Se trata de equipos implantados actualmente a escala industrial. Por ejemplo, la compañía REUS ha desarrollado reactores de ultrasonidos tipo baño de 30 a 1000 L de capacidad para la extracción de principios activos de vegetales. Hielscher-Ultrasound Technology emplea el sistema de sonda (discontinuos y continuos) para la fabricación de cosméticos, alimentos, bebidas, pinturas y extracción de pigmentos. Otras empresas que fabrican ultrasonidos para la extracción compuestos de vegetales a escala industrial y para aplicaciones en la industria alimentaria y de nutraceuticos son GIOTTI y MOLISERB SRL (Mason et al., 2015).

2.3.2.2. Extracción por microondas

Se basa en el empleo de ondas microondas, es decir, ondas electromagnéticas con una frecuencia comprendida entre 0,3 y 30 GHz. En aplicaciones industriales usualmente se emplea una frecuencia de 915 MHz, mientras que en hornos microondas domésticos se emplea una frecuencia de 2,45 MHz (Wen et al., 2020).

La extracción por microondas es una técnica capaz de calentar una matriz externa e internamente sin necesidad de un gradiente térmico (de la Calle y Costas-Rodríguez, 2017). Las microondas también provocan el calentamiento interno del agua de una muestra, lo que favorece la alteración celular y mejora la recuperación de los compuestos de interés (Osorio-Tobón, 2020). Esto permite acortar el tiempo de extracción, el consumo de energía y el requerimiento de solvente (Nabet et al., 2019). Este hecho hace que sea una tecnología respetuosa con el medio ambiente, especialmente si se aplican

solventes verdes, y que se haya usado ampliamente para la extracción de compuestos bioactivos a partir de distintas biomásas (da Rosa et al., 2019; Garcia-Vaquero et al., 2020).

Existen tres tipos de extracciones con microondas: la extracción con solvente asistida por microondas, la extracción por microondas sin solvente y la extracción por microondas que combina hidrodifusión y gravedad. A su vez, la extracción con microondas se puede clasificar en función de si el equipo es abierto o cerrado (Figura 31) (Yahya et al., 2018). Tanto el tipo de recipiente cerrado como el tipo abierto están disponibles comercialmente como multimodo y monomodo. En el primer caso, hay una dispersión aleatoria de la radiación de microondas dentro de la cavidad del equipo, por lo que todas las zonas de la cavidad y la muestra se irradian uniformemente (Delazar et al., 2012). Este se puede utilizar para llevar a cabo varias extracciones en paralelo. Alternativamente, los microondas monomodo tienen una cavidad pequeña en la que la irradiación de microondas se enfoca directamente en un solo recipiente que contiene la mezcla de reacción (Anton Paar, 2021).

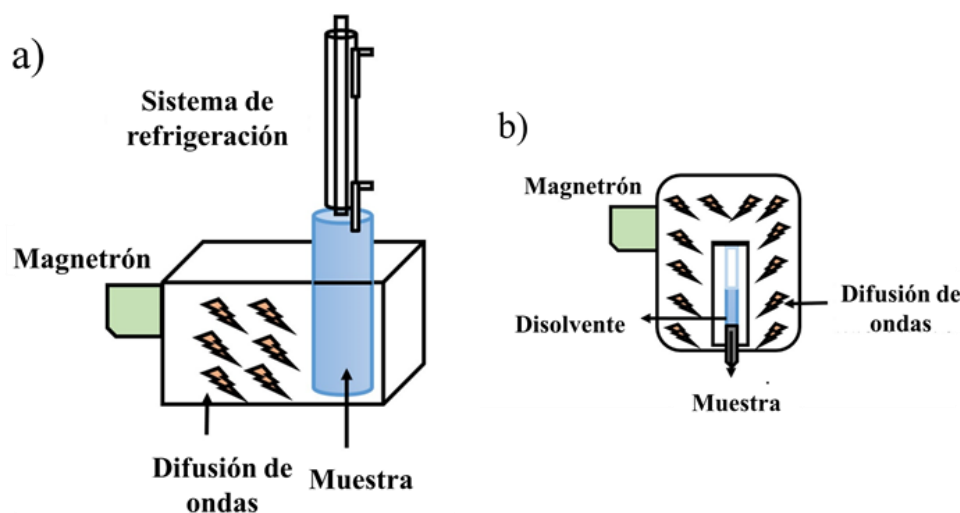


Figura 31. Diagrama esquemático de una configuración de recipiente abierto (a) y recipiente cerrado (b) para extracción asistida por microondas. Fuente: adaptada de Yahya et al. (2018).

Los principales factores a tener en cuenta en la extracción por microondas son el tipo de solvente que tiene que absorber este tipo de ondas, el tiempo, la potencia, la temperatura y el área de la superficie de contacto. Esta tecnología presenta una alta eficiencia de

extracción y requiere menos energía y un menor volumen de disolvente que otras técnicas de extracción.

Aunque esta tecnología no está bien desarrollada a gran escala, existen dispositivos asistidos por microondas en formato de proceso continuo o por lotes (SAIREM, 2021).

2.3.2.2.3. Electrotecnologías

Las electrotecnologías empleadas en la extracción de compuestos bioactivos son principalmente los campos eléctricos pulsados y las descargas eléctricas de alto voltaje. El primer tipo es un tratamiento no térmico de muy corta duración (nanosegundos o milisegundos) y alta intensidad de campo eléctrico (de 100 V/cm a 40 kV/cm) que se basa en el fenómeno de electroporación (formación de poros en las membranas celulares) (Parniakov et al., 2015) (Figura 32). En la extracción mediante descargas eléctricas de alto voltaje se aplica energía directamente a una disolución acuosa a través de un canal de plasma formado por una descarga eléctrica de alto voltaje entre dos electrodos sumergidos, produciendo efectos eléctricos y mecánicos en la biomasa (Roselló-Soto et al., 2015) (Figura 32).



Figura 32. Equipo de campos eléctricos pulsados (a) y descargas eléctricas de alto voltaje (b). Fuente: adaptada de Rajha et al. (2014).

A nivel industrial, se está promoviendo la implantación de la tecnología de campo eléctrico pulsado (CORDIS, 2017). En el caso de la tecnología mediante descargas eléctricas de alto voltaje se han realizado pruebas a escala piloto para la extracción de polifenoles de orujo de uva (Boussetta et al., 2012). En general, la falta de uniformidad en el proceso y los altos costos de operación debido a la alta disipación de energía limitan la aplicación industrial de estas tecnologías (Buckow et al., 2010).

2.3.2.2.4. Extracción con fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico es un líquido que presenta un estado con características tanto de líquido como de gas. Este estado se conoce como estado supercrítico y se logra cuando la sustancia es sometida a presión y temperatura más allá de su punto crítico (temperatura y presión características por encima de las cuales no existen fases distintivas entre gas y líquido) (Yahya et al., 2018).

En este tipo de extracción se producen dos etapas: la solubilización de los compuestos bioactivos presentes en la biomasa y su separación en el disolvente supercrítico. En la extracción, la bomba presuriza el recipiente y el fluido supercrítico fluye a través del sólido solubilizando los componentes extraíbles. Posteriormente, el solvente sale del extractor con los compuestos solubilizados, y por reducción de presión y/o aumento de temperatura, el extracto queda libre de solvente ya que es liberado al medio ambiente o se recicla (da Silva et al., 2016). La Figura 33 muestra el esquema seguido para la extracción de compuestos bioactivos mediante esta técnica.

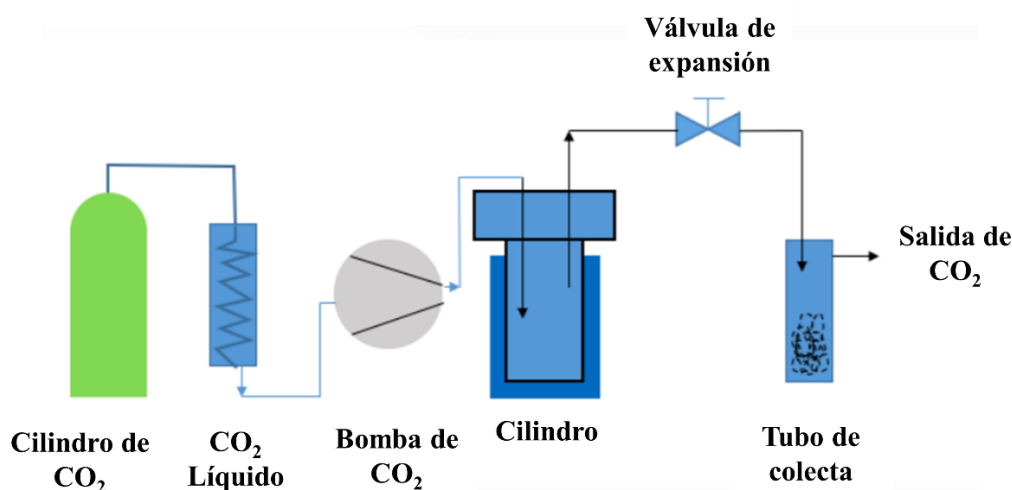


Figura 33. Diagrama esquemático del sistema de extracción con fluidos supercríticos. Fuente: Román et al. (2016).

Las principales variables que influyen en esta técnica son el fluido supercrítico empleado, la temperatura, la presión, el tamaño de partícula, el codisolvente y la humedad de la biomasa a extraer (Yahya et al., 2018).

El fluido supercrítico comúnmente empleado es el CO₂, que presenta una temperatura crítica de 31°C y una presión crítica de 74 bares (Bauer y Kruse, 2019). El CO₂ es no tóxico, es barato y está reconocido como seguro por la EFSA y la FDA de los Estados

Unidos (Herrero et al., 2010). El CO₂ presenta baja polaridad, lo que lo hace un fluido ideal para extraer compuestos no polares, como lípidos, pero en el caso de sustancias polares es un inconveniente. Este problema puede solventarse adicionando codisolventes polares como metanol, agua, acetona, etanol, etc. (Ameer et al., 2017).

En la actualidad, existen equipos industriales para la extracción supercrítica de compuestos bioactivos (SARAPECO).

2.3.2.2.5. Extracción asistida por enzimas

Algunos compuestos bioactivos se encuentran dispersos en el citoplasma, mientras que otros compuestos se encuentran retenidos en la red polimérica de la biomasa por enlaces de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas, por lo que no son accesibles empleando una extracción con solventes rutinaria. Por ello, el empleo de enzimas se considera una forma eficaz de liberar estos compuestos ligados y también de aumentar el rendimiento general de extracción (Selvamuthukumaran y Shi, 2017). Así, la extracción con enzimas se basa en la capacidad que presentan para catalizar reacciones con exhaustiva especificidad y selectividad (Nadar et al., 2018). Las principales enzimas empleadas son celulasas, hemicelulasas y pectinasas (Sowbhagya y Chitra, 2010), que al romper la pared celular e hidrolizar los polisacáridos estructurales, permite liberar compuestos fenólicos. Otros estudios han empleado peptidasas para favorecer la extracción de compuestos fenólicos (López-Fernández-Sobrino et al., 2021).

Las reacciones enzimáticas normalmente se realizan a temperaturas bajas, 15-45°C, por lo que son adecuadas para la extracción de compuestos termolábiles (Sowbhagya y Chitra, 2010). Además, al utilizar agua como disolvente en lugar de productos químicos orgánicos, este método de extracción se considera ecológico (Wen et al., 2020). Los principales factores a tener en cuenta en este tipo de extracción son el tipo y dosis de enzimas, el tamaño de partícula, pH y el tiempo de hidrólisis.

Entre las ventajas que presenta este tipo de extracción son un reducido consumo de energía y la obtención de altos valores de recuperación de los compuestos de interés (Azmir et al., 2013). Hasta el momento no se ha aplicado a escala industrial, pero su escalado sería fácil ya que es una tecnología ampliamente conocida y utilizada.

2.3.2.2.6. Caída de presión instantánea controlada

Este tipo de extracción consiste en mantener la biomasa a alta presión (0,08-1 MPa) durante un corto tiempo (5-60 s) seguido de una caída de presión instantánea hacia el vacío (~ 5 kPa) dando lugar a la autoevaporación del agua, expansión y enfriamiento rápido del producto (Hamoud-Agha y Allaf, 2020) (Figura 34). Se ha comprobado que la transferencia de masa y la recuperación del compuesto deseado se mejora debido a la caída de presión (Rashidi et al., 2018). Además, se modifican las características estructurales de la planta (porosidad y superficie específica) permitiendo una mejora de la difusividad, permeabilidad y disponibilidad de los compuestos de interés (Mkaouer et al., 2015).

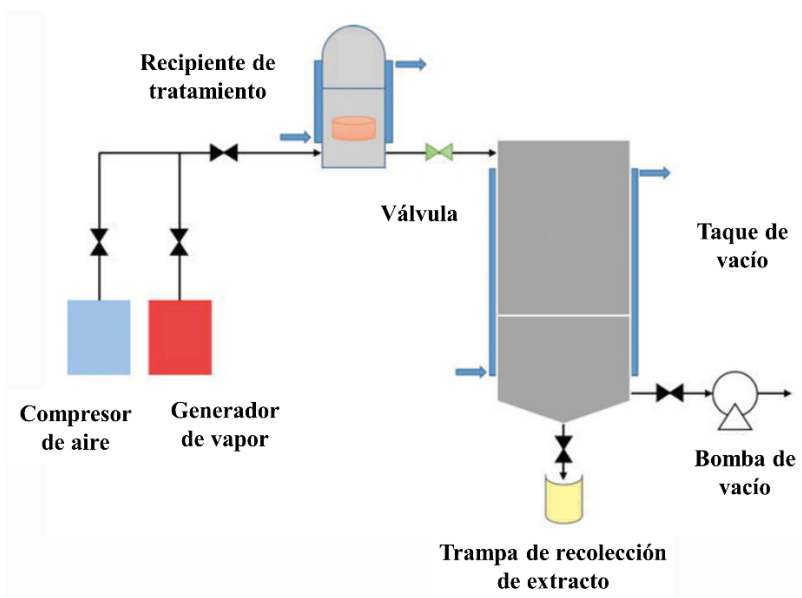


Figura 34. Diagrama esquemático de un reactor de descompresión instantánea controlada. Fuente: Hamoud-Agha y Allaf, (2020).

Esta tecnología se aplica en sectores de las industrias alimentaria y farmacéutica, aunque actualmente su uso es limitado debido a su elevado coste (Hamoud-Agha y Allaf, 2020).

2.3.2.2.7. Extracción con líquidos presurizados o extracción acelerada con solventes

Este método de extracción consiste en la aplicación de alta presión para mantener el solvente en estado líquido más allá de su punto de ebullición, lo que provoca un aumento de la cinética de extracción (Li et al., 2019). La extracción se realiza en un rango de temperatura entre 50 y 200°C y a una presión de 100-150 bar. Los parámetros que influyen

en esta técnica son el disolvente, la temperatura, el tamaño de partícula y el tiempo de extracción. El aumento de la temperatura y de la presión puede permitir una mejora en la extracción de los compuestos de interés debido a la mayor penetración del disolvente en la matriz (Li et al., 2019). No obstante, también se debe tener en cuenta que el empleo de temperaturas excesivamente elevadas no es apropiado para la extracción de compuestos termolábiles ya que su estructura y actividad funcional pueden verse seriamente afectadas (Azmir et al., 2013). Además, a altas temperaturas se pueden generar compuestos indeseables como furfural e hidroximetilfurfural que en concentraciones elevadas pueden tener un efecto tóxico para el consumo de los extractos obtenidos (Vladić et al., 2020).

Cuando se emplea agua en este tipo de extracción, también se conoce como extracción con agua subcrítica o extracción de agua caliente presurizada. En este caso, se emplean temperaturas de entre 100 y 374°C y presión de entre 10 y 60 bares; condiciones en las que el agua se mantiene en estado líquido (Gil-Chávez et al., 2013) ya que la temperatura y presión crítica del agua es de 374°C y 221 bares (Zhang et al., 2020) (Figura 35).

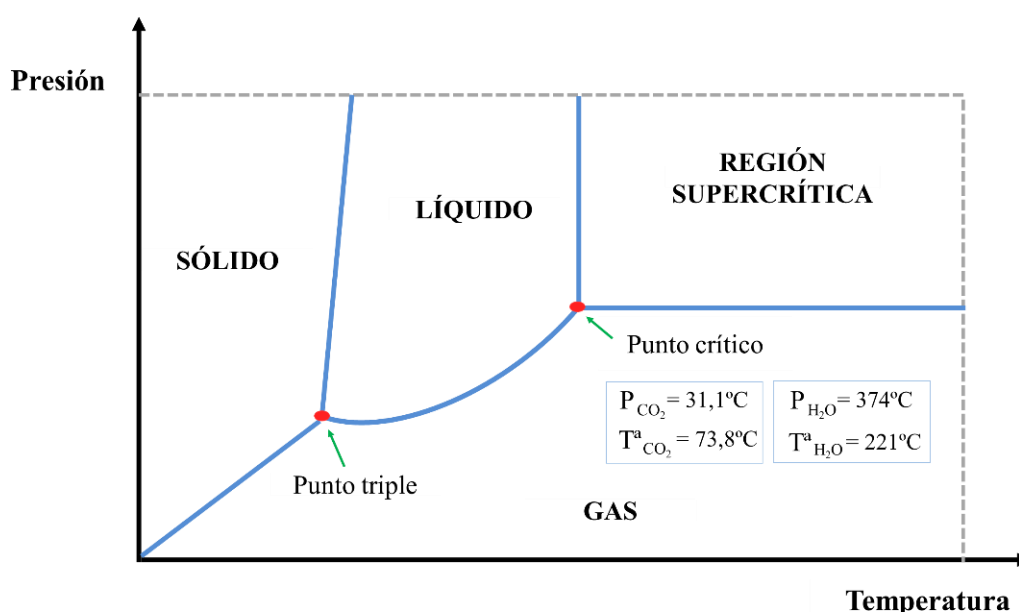


Figura 35. Punto crítico líquido-vapor del agua y del CO₂ en un diagrama de fases presión-temperatura. Fuente: adaptada de Martines y Lira, (2008).

Los principales factores que afectan a este tipo de extracción son el tamaño de partícula, tasa de flujo de disolvente y la constante dieléctrica del agua (Yahya et al., 2018).

Aunque esta tecnología se ha empleado en ocasiones a escala industrial, no es una técnica viable económicamente, ya que se emplean equipos muy costosos (Croxatto et al., 2021; Herrero et al., 2010).

2.3.2.2.8. Extracción por alta presión hidrostática

El proceso de alta presión ocurre a temperatura ambiente o de refrigeración y, por tanto, es una técnica de extracción no térmica. Debido a la alta presión se produce una mayor solubilidad y transferencia de materia, favoreciendo la extracción de compuestos bioactivos y reduciendo el tiempo de extracción (Scepankova et al., 2018).

Este tipo de extracción tiene lugar en un equipo de alta presión que, básicamente, consta de un recipiente de alta presión hidrostática cuyo volumen va desde 8 mL (escala laboratorio) hasta 525 L (escala industrial) y un sistema de generación de presión que va desde 600 MPa a 1000 MPa (Scepankova et al., 2018).

Esta tecnología ofrece numerosas ventajas como el hecho de no producir deterioros en sustancias termolábiles, no producir residuos, no alterar el sabor natural ni la coloración del producto de partida y presentar un reducido coste energético (Moreira et al., 2020). El principal inconveniente es el alto coste del equipo. De esta tecnología ya existen equipos industriales para la extracción de diversos compuestos (Stansted Fluid Power, 2021).

2.3.2.3. Ejemplos de aplicación en los residuos del sector oleícola

Las técnicas de extracción “green” se han empleado satisfactoriamente para la extracción de compuestos fenólicos (Tabla 10) y triterpenos (Tabla 8) de biomásas del olivar y de la industria oleícola a escala de laboratorio, principalmente, hojas y orujo. Mientras que existen pocos estudios sobre la extracción del orujillo y otros residuos marginales como la pulpa residual. Por otra parte, la extracción de manitol mediante estas tecnologías ha sido menos estudiada y principalmente se ha empleado la extracción en Soxhlet. Además, se han empleado distintos disolventes (agua, etanol, acetona, etc) reconocidos como seguros para su uso alimentario (Real Decreto 1101/2011).

Tabla 10. Obtención de compuestos fenólicos de residuos del olivar y de la industria oleícola mediante diferentes tecnologías de extracción.

Muestra	Método de extracción	Disolvente de extracción	TPC	Compuestos fenólicos principales	Referencia
Poda de olivo	Maceración (17% m/v, 90 min, 55°C)	50% etanol	23,9 mg/g ^a	-	Gullón et al., 2018
	Extracción por ultrasonidos (sonda) (5% m/v, 15 min, 70% de amplitud)	55% etanol	31,0 mg/g ^a	-	Martínez-Patiño et al., 2019a
	Extracción Soxhlet (2% m/v, 12 h)	Agua	149,0 mg/g ^c	Tirosol (0,6 mg/g ^c) Hidroxitirosol (8 mg/g ^c) 3,4-Dihidroxifenilglicol (11,4 mg/g ^c)	Doménech et al., 2021
Hojas de olivo	Extracción por ultrasonidos (sonda) (7,7% m/v, 40°C, ≈15 min, 30% de amplitud)	60% etanol	35,8 mg/g ^a	Oleuropeína (69,9 mg/g ^a) Luteolina-7-glucósido (1,8 mg/g ^a)	Lama-Muñoz et al., 2019a
	Extracción con líquidos presurizados (14% m/v, 190 °C, 5 min)	60% etanol	45,9-59,3 mg/g ^a	Oleuropeína (43,4-115,0 mg/g ^a) Luteolina-7-glucósido (0,9-3,8 mg/g ^a)	Lama-Muñoz et al., 2019b
	Extracción Soxhlet (4 h)	60% etanol	42,5-60,2 mg/g ^a	Oleuropeína (49,1-122,3 mg/g ^a) Luteolina-7-glucósido (1,3-4,7 mg/g ^a)	Lama-Muñoz et al., 2019b
	Explosión por vapor (180°C, 8,3 min)	-	44,8 mg/g ^a	Oleuropeína (15,8 mg/g ^a) Hidroxitirosol (3,4 mg/g ^a)	Romero-García et al., 2016a
	Extracción por ultrasonidos (sonda) (6,7% m/v, 60°C, ≈4 min, 70% de amplitud)	80% etanol	56,17 mg/g ^a	Oleuropeína (13,4 mg/g ^a) Luteolina-7-glucósido (0,5 mg/g ^a)	Giacometti et al., 2018
Hojín	Maceración (17% m/v, 90 min, 55°C)	50% etanol	27,5 mg/g ^a	-	Gullón et al., 2018
	Extracción por ultrasonidos (sonda) (5% m/v, 15 min, 70% de amplitud)	51% etanol	42,0 mg/g ^a	-	Martínez-Patiño et al., 2019a
	Extracción Soxhlet (2% m/v, 12 h)	Agua	125 mg/g ^c	Hidroxitirosol (2,8 mg/g ^c) 3,4-Dihidroxifenilglicol (10,4 mg/g ^c)	Doménech et al., 2021
Orujo de dos fases	Extracción con microondas (monomodo) (5% m/v, 90°C, 5 min)	50% etanol	≤12,0 mg/g ^d	Hidroxitirosol, ácido cafeico, ácido <i>p</i> -cumarico, rutina, oleuropeína y luteolina	Tapia-Quirós et al., 2020
	Extracción por ultrasonidos (baño) (5% m/v, 20-24°C; 30 min)	50% etanol	2,1-8,1 mg/g; 1,9-9,7 mg/g ^{b,d}	Hidroxitirosol, ácido cafeico, ácido <i>p</i> -cumarico, rutina, oleuropeína y luteolina	Tapia-Quirós et al., 2020

	Extracción con líquidos presurizados (20% m/v, 100°C, 5min (+5 min de precalentamiento), 103 psi)	50% etanol	< 0,9 mg/g ^d	Hidroxitirosol, ácido cafeico, ácido <i>p</i> -cumarico, rutina, oleuropeína y luteolina	Tapia-Quirós et al., 2020
	Centrifugación (10 000×g, 10 min)	-	30,52 mg/g ^c	Hidroxitirosol (5,0 mg/g) ^c	Ribeiro et al., 2021
Orujo de tres fases	Extracción con líquidos presurizados (14,7% m/v, 136,5 °C, 20 min, 103 bar)	52% etanol	1,7 mg/g ^{a,b}	Hidroxitirosol (0,1 mg/g ^a) Hidroxitirosol oxidado (0,6 mg/g ^a) Oleuropeína (0,1 mg/g ^a)	Pavez et al., 2019
	Maceración (25% m/v, 2 h)	80% metanol	0,3 mg/g ^a	Oleuropeína (0,02 mg/g ^a)	Pavez et al., 2019
	Extracción por microondas (monomodo) (8% m/v, 60°C, 30 min)	80% cloruro de colina-ácido láctico	29,6 mg/g ^a	Hidroxitirosol (0,9 mg/g ^d) Oleuropeína (7,56 mg/g ^d)	Chanioti y Tzia, 2018
	Homogeneización 30 min (33% m/v, T ^a ambiente)	Dimetilsulfóxido	0,7 mg/g ^d	-	Yakhlef et al., 2018
Orujillo	Extracción por ultrasonidos (baño) (6% m/v, 50 min)	47% etanol	44,5 mg/g ^a	Hidroxitirosol (8,0 mg/g ^a)	Contreras et al., 2021
	Extracción Soxhlet (2% m/v, 12 h)	Agua	175,0 mg/g ^c	Tirosol (2,1 mg/g ^c) Hidroxitirosol (11,0 mg/g ^c)	Doménech et al., 2021
Hueso de aceituna	Extracción Soxhlet (2% m/v, 12 h)	Agua	156,0 mg/g ^c	Tirosol (11 mg/g ^c) Hidroxitirosol (3,1 mg/g ^c) Vainillina (1,7 mg/g ^c) Ácido vainílico (2,1 mg/g ^c) Siringaldehído (1,0 mg/g ^c)	Doménech et al., 2021
Aguas residuales	-	-	1184,0 mg/L	Tirosol (14 mg/L) Hidroxitirosol (108 mg/L)	Yakhlef et al., 2018
Pulpa residual	Extracción por ultrasonidos (baño) (6% m/v, 50 min)	47% etanol	4,6 mg/g ^a	Hidroxitirosol (<1,2 mg/g ^a) Trilignoles	Contreras et al., 2021

^aReferido a peso seco de biomasa; ^bSuma total de compuestos fenólicos (el resto de datos están expresados como equivalentes de ácido gálico); ^cReferido a peso seco de extracto; ^dReferido a biomasa.

TPC, contenido total de compuestos fenólicos expresado como equivalentes de ácido gálico (GAE)

2.4. Purificación de compuestos bioactivos

Tras la aplicación de alguno de los métodos de extracción descritos en el apartado anterior y para la obtención de extractos enriquecidos en compuestos bioactivos, se deben emplear técnicas de purificación como la tecnología de membranas, extracción líquido-líquido y separación con adsorbentes y resinas (Dávila et al., 2019; Trikas et al., 2017).

2.4.1. Tecnología de membranas

La tecnología de membranas se emplea para separar componentes de una disolución rechazando las sustancias no deseadas y permitiendo que las demás pasen a través de la membrana (Saleh-Abdo y Kumar-Gupta, 2016). Se trata de técnicas que presentan múltiples aplicaciones en la industria de procesos químicos y son competitivas con otras tecnologías de separación ya consolidadas (Zagklis y Paraskeva, 2019). En esta técnica la corriente de alimentación es transportada a través de la membrana debido a la acción de una fuerza impulsora. La alimentación se separa en dos corrientes: un permeado, que contiene el material que ha pasado a través de la membrana y un retenido o concentrado formado por todas las partículas que no atraviesan la membrana (Figura 36).

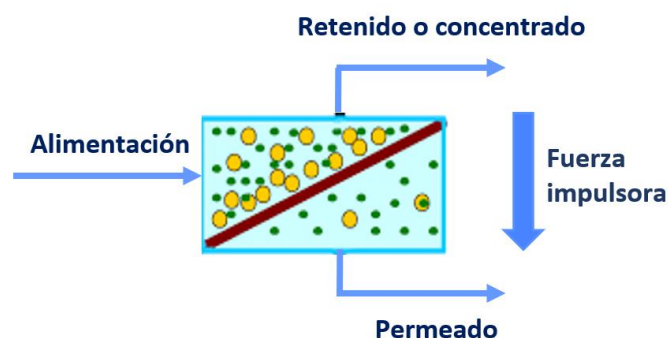


Figura 36. Componentes que intervienen en el proceso de separación por membranas.
Fuente: adaptada de Díez-Ruano, (2010).

La Tabla 11 muestra los diferentes procesos de membranas que existen dependiendo de la fuerza impulsora que se aplica. Las más empleadas para la obtención de compuestos bioactivos son: la microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y osmosis inversa (Figura 37).

Tabla 11. Procesos de separación por membranas que existen dependiendo de la fuerza impulsora aplicada en el proceso (basada en Wang y Tang, (2011)).

Fuerza impulsora	Tipo tecnología
Presión	- Ósmosis inversa - Nanofiltración - Ultrafiltración - Microfiltración - Separación de gases - Pervaporación
Temperatura	- Destilación por membranas
Gradientes de concentración	- Diálisis
Potencial eléctrico	- Electrodiálisis

En la microfiltración el mecanismo de transporte está basado en la exclusión molecular. Se emplean membranas con un tamaño medio de poro que oscila entre 0,05 y 10 μm y permite eliminar las partículas que tienen un peso molecular medio mayor de 400 kDa. Estas membranas se fabrican en un amplio rango de materiales, tanto orgánicos como inorgánicos (Ray et al., 2020). Las presiones de operación requeridas son bajas, varían de

0,5 a 3 bar. El coste de operación en esta técnica es bajo, aunque el grado de purificación es menor que en otras tecnologías de membranas.

En el caso de la ultrafiltración, el principal mecanismo es la exclusión molecular, permitiendo separar macromoléculas de entre 1 y 150 kDa mediante membranas porosas, tanto orgánicas como inorgánicas. Dependiendo de los compuestos presentes en la muestra, se pueden producir reacciones entre las partículas y la membrana que podrían disminuir la eficiencia del proceso (Al Aani et al., 2020).

La nanofiltración es la operación intermedia entre la ultrafiltración y la ósmosis inversa. El tipo de membranas empleadas presentan una estructura no porosa y un mecanismo de transporte de difusión de la solución. Las membranas tienen un tamaño de poro de 1 nm, que corresponden a un corte molecular de 300-500 Da y la presión de trabajo oscila entre 5-15 bar (Teixeira et al., 2014). El principal inconveniente de esta tecnología es la dificultad de reproducibilidad del tamaño de los poros de la membrana y la distribución de estos. Además, las membranas de nanofiltración pueden ensuciarse rápidamente, lo que provoca una disminución del flujo de trabajo (Wang y Tang, 2011).

Finalmente, el mecanismo de separación de la ósmosis inversa consiste en la disolución-difusión a través de la membrana. Prácticamente solo permite el paso de agua a través de la membrana ya que retiene partículas de masa inferior o igual a 50 Da y trabaja a una presión de 10-100 bar. Las membranas de ósmosis inversa se clasifican en membranas asimétricas y membranas compuestas de película delgada. El principal inconveniente de esta técnica es el ensuciamiento de la membrana que provoca una reducción de la productividad y de la calidad de permeación, dando lugar al aumento del costo energético ya que se requiere una mayor demanda de energía y a la reducción de la vida útil de la membrana (Muñoz et al., 2021).

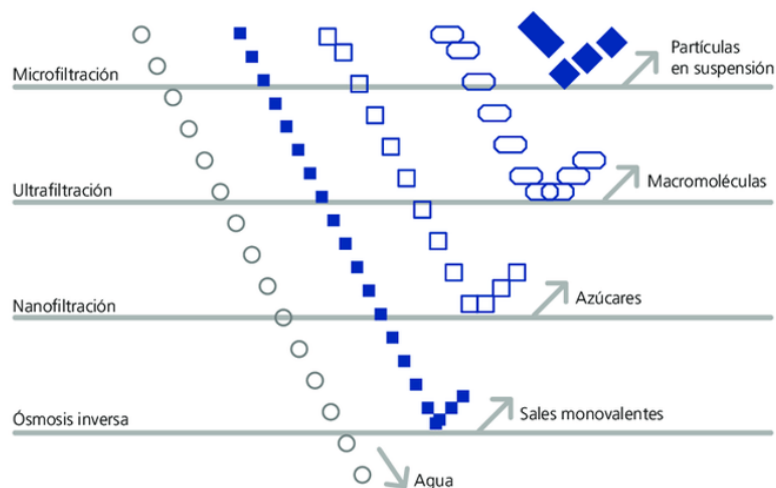


Figura 37. Tipos de procesos de membranas para los que la fuerza impulsora es un gradiente de presión y tipo de compuestos que se pueden separar. Fuente: Cantero et al. (2010).

En general, los procesos de separación por membranas presentan múltiples ventajas como son: bajo coste energético, temperatura de operación moderada, posibilidad de operar en continuo y fácilmente automatizable, facilidad de montaje, desmontaje y operación. Todo esto favorece su aplicación en la industria ya que permiten el reciclaje de materiales y recuperación de recursos haciéndolas técnicas más sostenibles (Al Aani et al., 2020). Sin embargo, presentan algunos inconvenientes como son: elevado coste de las membranas, ensuciamiento de las membranas, baja resistencia mecánica a vibraciones, presiones y altas temperaturas de algunas membranas (Conidi et al., 2017).

2.4.2. Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido, también conocida como extracción con solventes, es aquella en la que se produce la separación de los componentes de una mezcla líquida (extracto acuoso) mediante la adicción de un disolvente (normalmente orgánico) en el cual uno o más componentes son preferentemente solubles (Yahya et al., 2018).

En este tipo de extracciones las dos fases se agitan juntas durante un tiempo determinado para asegurar el contacto entre sí. A continuación, estas fases forman dos capas de líquido completamente distintas tras dejarlas en reposo y se separan, por ejemplo, en un embudo de decantación (laboratorio) (Figura 38), en reactores de mezclado y sedimentación (industria) (De Dietrich) o en tanques de sedimentación por gravedad (industria), así

como se pueden emplear coalescedores (industria) que aceleran la separación de las fases (SULZER).

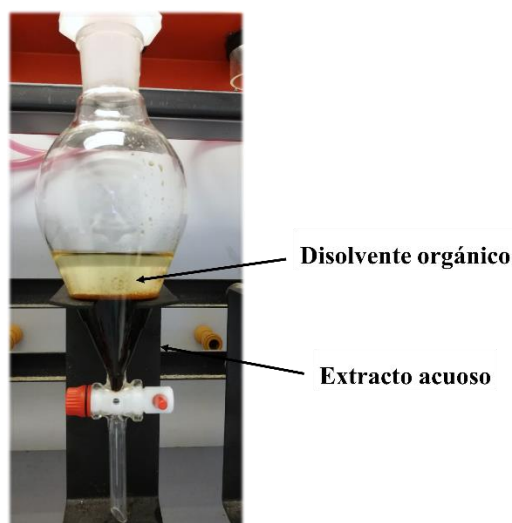


Figura 38. Esquema de extracción líquido-líquido a escala laboratorio. Fuente: elaboración propia.

Existen tres tipos generales de técnicas de extracción líquido-líquido: simple, continua y en contracorriente. La técnica simple consiste en poner en contacto una sola vez las dos fases (Figura 39), en la continua existe un flujo continuo de disolvente orgánico a través de la disolución acuosa que contiene la mezcla a separar y en la extracción a contracorriente las fases se encuentran en contacto continuo y se mueven en direcciones opuestas (TESEO, 2012).

El principal parámetro que afecta a esta técnica es el disolvente de extracción empleado. Así, se debe asegurar que los dos disolventes sean inmiscibles entre sí, que los compuestos a extraer presenten una máxima solubilidad en el disolvente y fácil separación del producto del extracto/disolvente (De Dietrich; Yahya et al., 2018).

En la industria química, este tipo de extracción es empleada en contracorriente en varias etapas, aunque, en el caso de laboratorios o producción a pequeña escala es muy difícil llevarla a la práctica ya que las unidades de trabajo empleadas requieren un gran volumen de disolvente y son impulsados por gravedad (Weeranoppanant et al., 2017). Esta técnica tiene inconvenientes como la formación de emulsiones y el uso de elevadas cantidades de disolventes orgánicos (Yahya et al., 2018).

2.4.3. Empleo de materiales adsorbentes y resinas

La adsorción es una operación unitaria mediante la que se separa uno o más componentes de una fase fluída quedando concentrados sobre la superficie de otra fase sólida (como carbón activo o resinas poliméricas). La fase sólida que retiene el compuesto se llama “adsorbente” y el soluto que se absorbe se denomina “adsorbato”.

El factor más importante para determinar la intensidad de la fuerza impulsora es el grado de solubilidad que presenta la sustancia disuelta. Cuanta mayor sea la atracción de una sustancia por el disolvente, menos posibilidad tiene de trasladarse a la interfase para ser adsorbida.

Se pueden diferenciar tres tipos de adsorción dependiendo de qué tipo de fuerzas existan entre el adsorbato y el adsorbente: i) de tipo eléctrico, ii) de Van der Waals o iii) de tipo químico.

La adsorción del primer tipo, conocida como adsorción por intercambio, es aquella en la que el soluto y el adsorbente se atraen por fuerzas electrostáticas. Es decir, los iones del adsorbato se concentran en la superficie del adsorbente, que se halla cargado eléctricamente con signo contrario a los iones del adsorbato. En el caso de dos adsorbatos iónicos iguales en varios factores (pH, temperatura, etc.), pero uno con mayor carga que otro, el de mayor carga será el que sea adsorbido. Para adsorbatos con igual carga, el tamaño molecular es el que determina cuál será adsorbido. La adsorción por fuerzas de Van der Waals conocida como adsorción física o fisisorción es aquella en la que el adsorbato no está fijo en un lugar específico de la superficie del adsorbente, sino que presenta movilidad en la interfase. Finalmente, cuando se produce una interacción química entre el adsorbato y el adsorbente, el fenómeno se llama adsorción química o quimisorción. Las fuerzas de interacción entre el adsorbato y el adsorbente son elevadas, casi como un enlace químico. En este tipo de adsorción el adsorbato sufre una transformación, más o menos intensa, dependiendo de su naturaleza química (Calderon-Bodevin, 2005).

La mayoría de los fenómenos de adsorción producidos son combinaciones de las tres formas de adsorción y, además, no es fácil distinguir entre adsorción física y química. La adsorción depende fundamentalmente de la naturaleza, la estructura y porosidad del adsorbente, de las propiedades físico-químicas del adsorbato y del medio en el cual la

adsorción debe efectuarse, y de la temperatura de trabajo (Cuerda-Correa, 2016). Los materiales adsorbentes pueden ser polares (p. ej. sílice, amino y ciano), apolares (C_8 , C_{18} , etc.) o relacionados con el intercambio aniónico o catiónico (Nerin et al., 2012). Esta operación de adsorción se ha empleado para la purificación de compuestos fenólicos de diferente naturaleza (Jahromi, 2019).

El empleo de materiales adsorbentes para purificar extractos a escala laboratorio se puede llevar a cabo con un sistema de extracción en fase sólida, que permite concentrar y separar un analito (o compuesto bioactivo de interés) del resto de compuestos de una muestra. Esta operación se realiza en cartuchos desechables que consisten en columnas cortas que contiene el material adsorbente (fase estacionaria). La fase móvil o eluyente circula a través del material adsorbente con la ayuda de un colector de vacío o presión positiva llevando consigo la mezcla de analitos que quedan retenidos en la fase sólida y que luego serán extraídos con nuevo eluyente (Bertol y Vaiano, 2016; Yahya et al., 2018). Se pueden aplicar varios eluyentes si se va a fraccionar los compuestos de interés en dos o más fracciones (Figura 39).

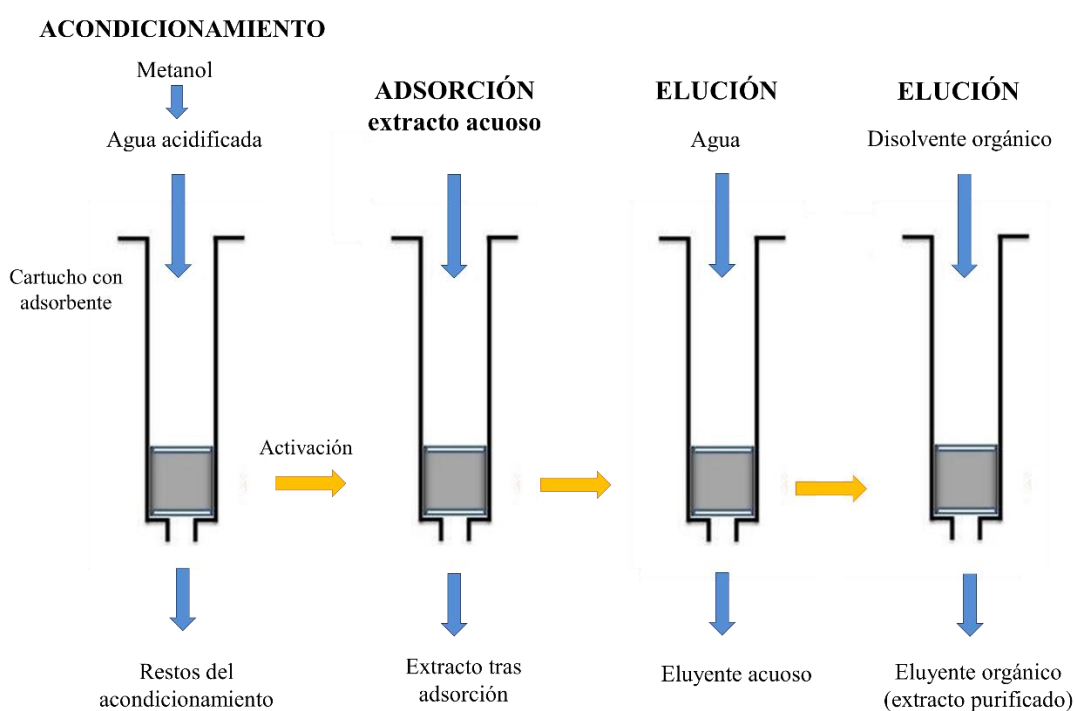


Figura 39. Aplicación de la operación de adsorción para separación de biocompuestos: purificación de extracto acuoso de orujillo. Fuente: Elaboración propia.

Las principales ventajas de la extracción en fase sólida es el bajo consumo de disolvente, reducido número de pasos, se puede trabajar con diferentes muestras al mismo tiempo y

presenta buenas tasas de recuperación. El principal inconveniente es el elevado coste de los cartuchos (Bertol y Vaiano, 2016).

2.4.4. Aplicación en extractos de residuos del sector oleícola

Los métodos de purificación citados en este apartado se han empleado para obtener extractos purificados de oleuropeína, tirosol e hidroxitirosol a partir de extractos de hoja, de orujo y aguas residuales de almazara, principalmente (Britton et al., 2019; Fernández-Prior et al., 2020; Liu et al., 2021; Sánchez-Arévalo et al., 2021). En el caso de las aguas residuales de almazara, algunos estudios han combinado varios tipos de separación por membranas para la purificación de compuestos fenólicos (García-Castello et al., 2010; Tundis et al., 2020). Otra opción es el empleo de resinas de intercambio iónico tras el empleo de membranas, ya que los carbohidratos presentes en los extractos pueden tener una distribución comparable a la de los compuestos fenólicos debido a que presentan pesos moleculares similares (Zagklis y Paraskeva, 2019).

La Figura 40 muestra esquemas que se podrían seguir para la purificación de compuestos fenólicos a partir de extractos de hoja, orujo y efluentes líquidos de almazara.

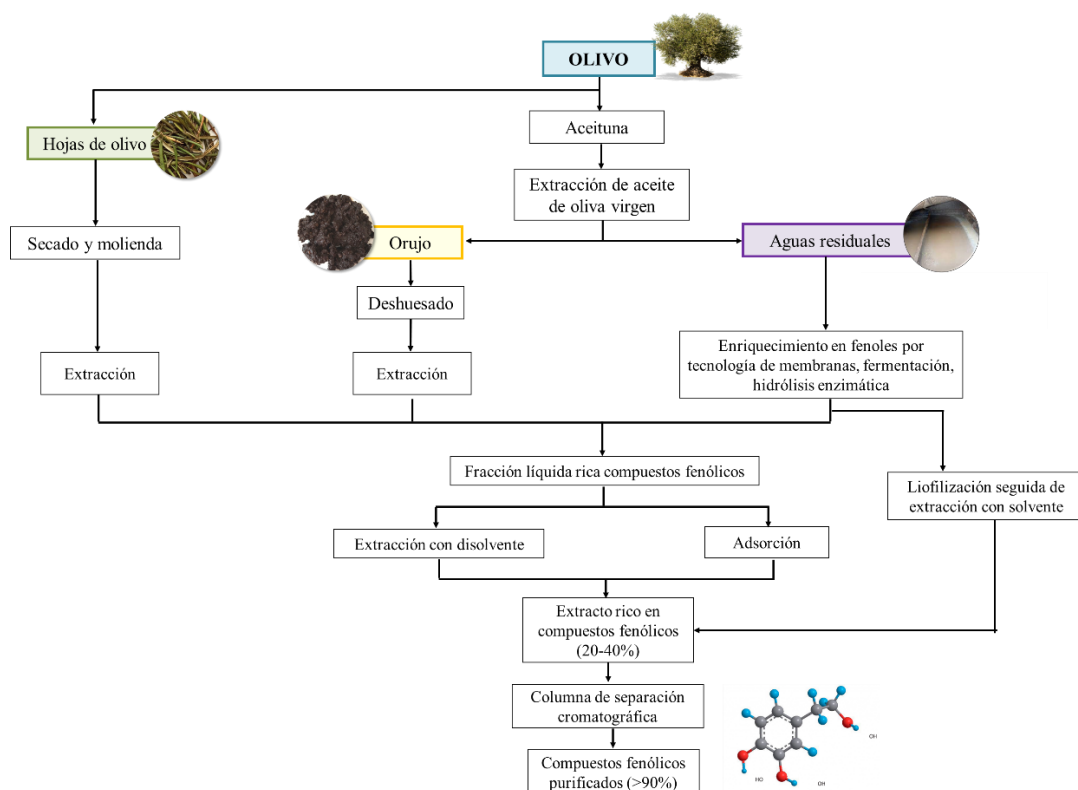


Figura 40. Esquema del proceso de purificación de compuestos fenólicos de residuos/subproductos de la industria del olivar. Fuente: adaptado de Britton et al. (2019).

La extracción líquido-líquido se puede emplear para la extracción de lignina de materiales lignocelulósicos (Stiefel et al., 2017) y para la recuperación de la compuestos antioxidantes y antimicrobianos en la fase orgánica (Gullón et al., 2017; Zagklis y Paraskeva, 2019) mientras se obtiene una fase acuosa enriquecida en oligosacáridos si se emplean pretratamientos hidrotérmicos, por ejemplo (Gullón et al., 2017). Así, a partir de poda y de orujo de dos fases tratados con agua caliente (170-230°C) y explosión por vapor (200-240°C) se han extraído extractos fenólicos ricos en hidroxitirosol y oleuropeína, empleando acetato de etilo como disolvente orgánico, con recuperaciones de un 80%, aproximadamente (Conde et al., 2009). Allouche et al. (2004) emplearon este tipo de extracción con acetato de etilo en corriente continua de 3 etapas para separar fenoles de las aguas residuales de almazara. La Tabla 12 muestra diferentes tecnologías aplicadas a la purificación de compuestos bioactivos de los residuos/subproductos de la industria del olivar.

Tabla 12. Tecnologías de purificación de compuestos bioactivos de la biomasa del olivar.

Biomasa	Extracto	Descripción	Compuesto separado	Referencia
Tecnología de membranas				
Hojas de olivo	Acuoso	Microfiltración (0,2 µm poro) + ultrafiltración 5 KDa (PVDF) + nanofiltración 300 Da (poliamida)	Oleuropeína (16,8 mg/g extracto)	Khemakhem et al., 2017
Aguas residuales	Acuoso	Ultrafiltración + nanofiltración + ósmosis inversa	Ácido gálico (43 mg/L) Hidroxitirosol (56 mg/L) Tiroso (13,6 mg/L)	Zagklis y Paraskeva, 2019
	Acuoso	Ultrafiltración HFS (PVDF) + nanofiltración 90 Da (capa delgada)	Polifenoles de bajo peso molecular (85 mg/L)	Cassano et al., 2013
	Acuoso	Ultrafiltración 50 KDa (polisulfona)	Hidroxitirosol (70% recuperación)	El-Abbassi et al., 2014
	Acuoso	Microfiltración (0,2 µm poro) + nanofiltración (polietersulfona) + ósmosis inversa	Hidroxitirosol (280 mg/L)	Garcia-Castello et al., 2010
	Acuoso	Microfiltración (0,1 µm poro; cerámica multicanal) + nanofiltración 150-300 Da (poliamida)	Hidroxitirosol, tiroso y oleuropeína (3 g/L)	Tundis et al., 2020
Aguas residuales	Acuoso	Nanofiltración 270 Da (película compuesta de poliamida)	Tiroso (76% extraído) y sacarosa	Sánchez-Arévalo et al., 2021
Extracción líquido-líquido				
Aguas residuales	Acuoso	Con acetato de etilo en corriente continua de 3 etapas	Hidroxitirosol (1225 mg/L) Tiroso (345 mg/L) Ácido caféico (256 mg/L) Ácido ferúlico (70 mg/L) Ácido cumárico (1695 mg/L)	Allouche et al., 2004
Adsorción				
Hojas de olivo	Acuoso	Material BNKX-5-BA; elución: etanol:agua (10:1:9 (v/v))	Oleuropeína (82% recuperación)	Liu et al., 2021
Orujo de tres fases	Etanol:agua (50%, v/v)	Material: XAD16; elución:etanol:agua (50%, v/v)	Hidroxitirosol (19% recuperación) Tiroso (45,7% recuperación)	Niknam et al., 2021
Aguas residuales	Acuoso	Material: XAD4; elución:etanol	Ácido gálico (76 mg/L) Hidroxitirosol (974 mg/L) Tiroso (152 mg/L)	Zagklis y Paraskeva, 2019
	Acuoso	Material: Isolute ENV; elución: etanol	Hidroxitirosol	Bertin et al., 2011

2.5. Biorrefinería a partir de biomasa del olivar y de la industria oleícola

Como se ha indicado en el Apartado 2.1.1, una biorrefinería es una “industria integrada que, usando biomasa como materia prima y una variedad de tecnologías diferentes, produce energía y/o biocombustibles, a la par que productos químicos, materiales, alimentos y piensos” (MITECO). La biomasa es conocida como “todo material de origen biológico excluyendo aquellos que han sido englobados en formaciones geológicas sufriendo un proceso de mineralización” (AENOR). En una biorrefinería la biomasa lignocelulósica tiene que sufrir una serie de transformaciones (Figura 41):

- 1) Fraccionamiento de la biomasa en sus principales componentes: extractivos, celulosa, hemicelulosa y lignina.
- 2) Hidrólisis de los polisacáridos celulosa y hemicelulosa a monómeros como glucosa y la xilosa.
- 3) Transformación de la glucosa a compuestos químicos como el etanol, butanol y ácidos orgánicos, empleando la fermentación y otras conversiones químicas.
- 4) Transformación de la xilosa a productos como el etanol, xilitol o furfural, empleando fermentación u otros procesos.
- 5) Empleo de la fracción de lignina para obtención de otros bioproductos o como biocombustible.

Actualmente, existe un gran interés por la conversión biológica de la biomasa lignocelulósica derivada del olivo y sus industrias asociadas con el fin de desarrollar una biorrefinería a partir de estos materiales. Esto supondría la valorización de estas biomásas, de carácter residual en su mayoría, contribuyendo al cumplimiento de los ODS planteados por Naciones Unidas para el año 2030, especialmente a los objetivos nº 7 “Energía asequible y no contaminante” y nº 12 “Producción y consumos responsables”

2.5.1. Pretratamiento

Una de las etapas cruciales para hacer viable una plataforma a partir de biomasa para aprovechar la matriz polimérica es el pretratamiento. Este consiste en un fraccionamiento de la biomasa mediante tratamientos físicos, químicos, físico-químicos y/o biológicos facilitando su posterior transformación química o biológica (Mesa et al., 2016) (Figura 41). En una biorrefinería, la etapa de pretratamiento puede suponer un 20% de los costes totales de producción (Yang y Wyman, 2008).

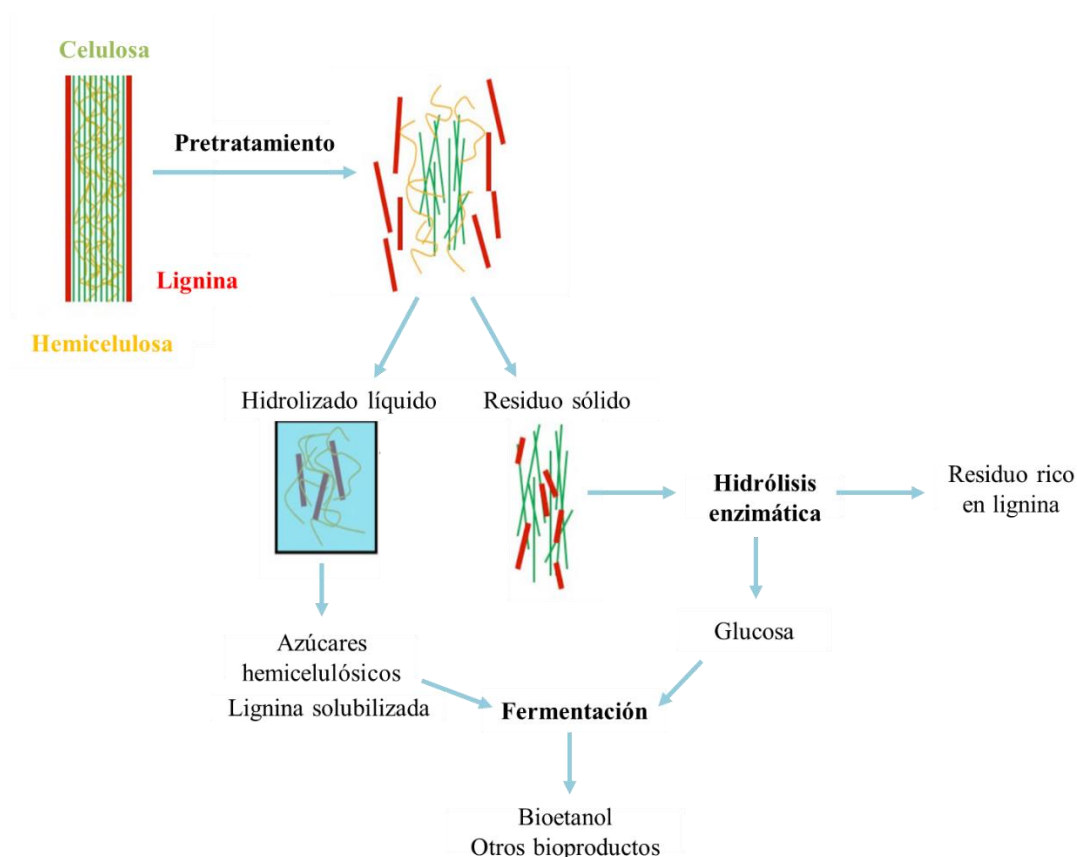


Figura 41. Esquema de la acción del pretratamiento sobre materiales lignocelulósicos.

Fuente: Elaboración propia.

Un pretratamiento adecuado implica: (1) disminuir la cristalinidad de la celulosa aumentando su porosidad y superficie para la posterior etapa de hidrólisis enzimática; (2) romper los enlaces lignina-celulosa; (3) mejorar la recuperación de azúcares fermentables; (4) reducir la pérdida de carbohidratos; (5) minimizar la generación de compuestos inhibidores, ya que supondrían un problema para las enzimas y microorganismos que actúan sobre el material en procesos posteriores de hidrólisis y fermentación; y (5) ser rentable (Barroso, 2010).

Los principales pretratamientos empleados sobre materiales lignocelulósicos se clasifican en la Figura 42, en función del principal agente que ejerce la acción para reducir la naturaleza recalcitrante de la biomasa.

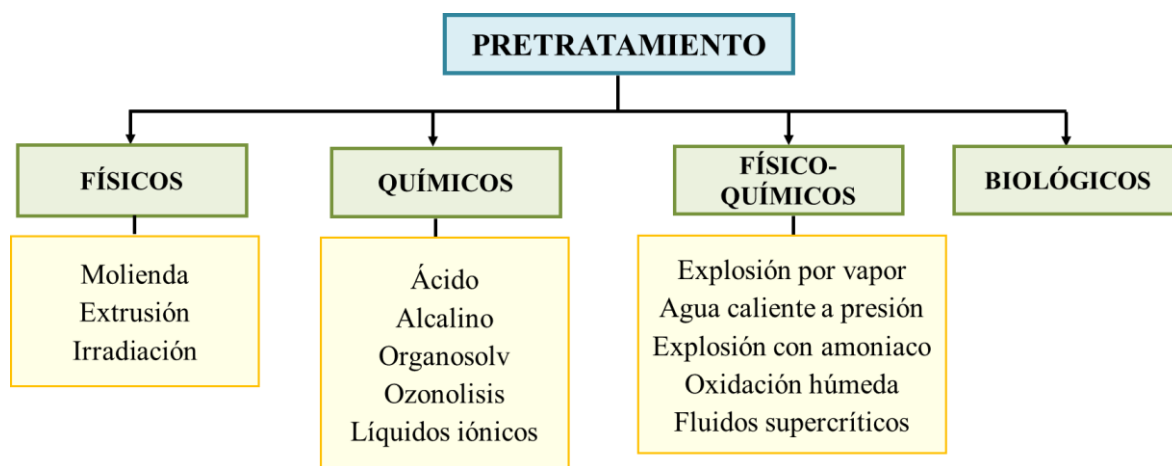


Figura 42. Clasificación de los pretratamientos aplicados sobre materiales lignocelulósicos. Fuente: elaboración propia.

2.5.1.1. Pretratamientos físicos

Este tipo de pretratamiento suele realizarse antes de cualquier otro tipo de pretratamiento para hacer que el proceso posterior sea más fácil y eficaz (Chen y Gänzle, 2017). Se emplea para ampliar el área superficial accesible y el calibre de los poros de la biomasa y disminuir la cristalinidad y la despolimerización de la celulosa (Baruah et al., 2018). Su principal desventaja es un alto consumo de energía (Shirkavand et al., 2016). Los principales pretratamientos de este tipo son:

- **Molienda**

La molienda permite reducir el tamaño de partícula del material y el grado de cristalinidad de los materiales lignocelulósicos, produciendo así un aumento del área

superficial (Chen y Gänzle, 2017). Estos factores se ven afectados por el tipo de molienda empleado y el tipo de biomasa (Baruah et al., 2018). Los principales equipos empleados son molinos de bolas, de rodillos, de martillos, coloidal y de energía vibratoria (Sun et al., 2016).

- **Extrusión**

La extrusión es un pretratamiento termofísico en el que los materiales se mezclan, calientan y cortan, produciéndose alteraciones físicas y químicas que producen la disminución del tamaño de la lignocelulosa y la despolimerización del material (Shirkavand et al., 2016). Este método presenta ventajas como alto efecto de cizallamiento sobre la biomasa, mezcla rápida, se puede operar en condiciones suaves con tiempos de residencia cortos y temperaturas moderadas que evitan la formación de sustancias tóxicas como furfural e hidroximetilfurfural. Como principales inconvenientes, presenta un elevado consumo de energía y como consecuencia un elevado coste (Yu et al., 2019).

- **Irradiación**

La irradiación suele emplearse como una ayuda previa a otros tratamientos, ya que este método no puede eliminar las hemicelulosas o la lignina de los materiales lignocelulósicos, ni reducir su tamaño de partícula. Este pretratamiento permite una mejora de la posterior hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos (Hassan et al., 2018).

2.5.1.2. Pretratamientos químicos

En este tipo de pretratamiento se usa un agente químico o solvente orgánico para descomponer la estructura de los materiales lignocelulósicos y promover la rotura de los enlaces internos presentes entre lignina y hemicelulosa: agentes oxidantes (álcalis, ácidos y sales), ácidos orgánicos (ácido oxálico, el ácido acetilsalicílico y el ácido salicílico) como catalizadores, mezcla de disolventes orgánicos u orgánicos acuosos con ácidos inorgánicos como HCl y H₂SO₄ (Behera et al., 2014).

Se trata de un método eficaz debido a su capacidad para degradar la celulosa a través de la solubilización de lignina e hidrólisis de hemicelulosas y para despolimerizar y reducir la cristalinidad de la biomasa (Shirkavand et al., 2016). Aunque, presenta inconvenientes como la generación de compuestos tóxicos, la pérdida de carbohidratos y el alto costo del

proceso (Shirkavand et al., 2016). Este pretratamiento es usado en la industria de la pulpa y del papel para la deslignificación del material celulósico (Sandberg et al., 2017) y en diversos procesos industriales para mejorar la digestibilidad de la biomasa (Wyman et al., 2005).

2.5.1.2.1. Pretratamientos ácidos

El pretratamiento con ácido se aplica para solubilizar parcialmente las hemicelulosas de los materiales lignocelulósicos y promover el acceso de las enzimas a la estructura celulósica, debido a que los enlaces glucosídicos de las hemicelulosas y la celulosa son susceptibles al ácido (Sun et al., 2016). Para este tipo de pretratamientos se pueden emplear ácidos inorgánicos diluidos ($\leq 10\%$ m/v) trabajando a 100-240°C y presión superior a 10 atm; y concentrados ($\sim 30\%$ m/v) a una temperatura de 100°C durante 2-10 horas a 1 atm de presión (Chen y Gänzle, 2017). Hay que prestar especial atención al uso de estos últimos ya que pueden provocar degradación de la celulosa, una alta concentración de inhibidores y corrosión del equipo (Shirkavand et al., 2016).

Los **ácidos inorgánicos** más comúnmente utilizados son: ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido fosfórico (H_3PO_4), ácido clorhídrico (HCl) y ácido nítrico (HNO_3) (Shirkavand et al., 2016). El ácido sulfúrico es uno de los más empleados ya que presenta un coste bajo y amplia disponibilidad. Sin embargo, es corrosivo y peligroso, y entre otras desventajas conlleva la formación de compuestos inhibidores a bajos pH y la necesidad de neutralización y eliminación de sal (Rezania et al., 2017). Alternativamente, el ácido fosfórico presenta ventajas como ser menos corrosivo y tóxico y es considerado una fuente de fósforo que se emplea como nutriente para los microorganismos en la etapa de fermentación (Castro et al., 2014). Además, el uso de este ácido puede tener un impacto medioambiental menor, ya que gran cantidad de productos químicos de valor añadido (fosfatos, N, K, Mg y metales traza) pueden ser recuperados y utilizados como fertilizantes (Haykiri-Acma y Yaman, 2019).

Algunos ácidos orgánicos (ácidos fórmico, acético y propiónico) también pueden mejorar la hidrólisis de la celulosa. Estos presentan una alta eficiencia de pretratamiento y suponen una menor degradación de xilosa y por tanto, se obtiene menor cantidad de furfural que en el pretratamiento con ácido sulfúrico (Chen y Gänzle, 2017).

2.5.1.2.2. Pretratamientos alcalinos

El pretratamiento alcalino también puede provocar la solubilización de la lignina y la hemicelulosa, provocando un incremento del área superficial, despolimerización y disminución de la cristalinidad. Las principales ventajas que presenta este pretratamiento es la eliminación de lignina y grupos acetilos y la menor degradación de azúcares comparado con el pretratamiento ácido (Haghighi et al., 2013). Uno de los principales inconvenientes son las elevadas presiones, largos tiempos de proceso y la formación de sales difíciles de recuperar (Chen y Gänzle, 2017; Shirkavand et al., 2016).

El hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH), hidróxido de calcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$, hidróxido de amonio (NH_4OH) y carbonato de sodio (Na_2CO_3) son los agentes alcalinos más empleados en este tipo de pretratamiento. De entre ellos, el pretratamiento con hidróxido de sodio es muy empleado debido a que es más barato que el hidróxido de potasio, presenta mayor solubilidad que el hidróxido de calcio y mayor alcalinidad que el hidróxido de amonio (Seok et al., 2016). Alternativamente, el hidróxido de calcio es asequible económicamente y seguro y puede ser recuperado y reciclado, pero su capacidad de deslignificación es mucho menor en plantas leñosas que en plantas herbáceas y agrícolas que otros agentes alcalinos (Sindhu et al., 2015).

2.5.1.2.3. Pretratamientos con organosolvente

En estos pretratamientos se emplean mezclas de agua y disolventes orgánicos, a veces en presencia de un catalizador, a una temperatura de entre 100 y 200°C y durante tiempos de reacción de 30 a 150 min. La temperatura y el tiempo de reacción son dependientes, es decir, una duración de exposición corta exige una temperatura alta y viceversa (Chin et al., 2020).

En este tipo de pretratamiento se utilizan normalmente disolventes orgánicos (metanol, etanol y acetona) y catalizadores ácidos orgánicos o inorgánicos (ácidos clorhídrico y sulfúrico) y bases (hidróxido de sodio, amoníaco y cal) (Zhou et al., 2018). El disolvente orgánico más empleado para la deslignificación es el etanol debido a que es uno de los solventes verdes más baratos disponibles, a su bajo punto de ebullición y a su facilidad de recuperación mediante destilación (Zhao et al., 2009). Este pretratamiento da como resultado un licor de pretratamiento rico en azúcares hemicelulósicos y una fracción sólida de lignina de alta calidad, dando lugar así a la producción de compuestos de alto

valor añadido (Salapa et al., 2017). El sólido rico en celulosa podría emplearse para obtener azúcares por lo que esta técnica permite el uso integral de la biomasa lo que se considera un punto importante dentro del esquema de una biorrefinería.

Cuando se agregan catalizadores ácidos, la tasa de deslignificación aumenta y se obtienen mayores rendimientos de xilosa comparada con otros catalizadores como el ácido fórmico o el ácido acetilsalicílico (Zhao et al., 2009).

2.5.1.2.4. Ozonolisis

La ozonólisis es uno de los pretratamientos oxidativos de biomasa lignocelulósica más eficaz para lograr la degradación de la lignina afectando mínimamente al contenido de hemicelulosa y celulosa (Travaini et al., 2016). El ozono es un fuerte agente oxidante y soluble en agua (110 mg/L, 25°C), aunque su coste es muy elevado (Patil et al., 2021). La mayor ventaja de este proceso es la baja generación de compuestos de degradación (Bhatt y Shilpa, 2015).

Aunque la mayoría de las investigaciones sobre este pretratamiento están centradas en el blanqueo en la industria del papel de pulpa y en el tratamiento de aguas residuales industriales y subterráneas, la ozonolisis también se ha aplicado en materiales lignocelulósicos (Li et al., 2015).

2.5.1.2.5. Líquidos iónicos

Los líquidos iónicos, sales orgánicas compuestas de cationes y aniones como el 1-alil-3-metilimidazolio, el formiato de 2-hidroxietilamonio, el cloruro de 1- butil-, 1-etil- o 1-alil-3-metilimidazolio y el acetato de 1-etil- o 1-butil-3-metilimidazolio son considerados como disolventes verdes adecuados para la solubilización simultánea de carbohidratos y lignina de la biomasa lignocelulósica. En general, la viscosidad es un parámetro muy importante cuando se aplican líquidos iónicos, ya que la baja viscosidad provoca que la celulosa se disuelva a baja temperatura, reduciendo así el consumo de energía. Aunque los líquidos iónicos presentan bajo punto de fusión (>100°C), se emplean en procesos de hasta 300°C, ya que son térmica y químicamente estables a altas temperaturas (Taylor et al., 2019).

Entre las ventajas de este tipo de pretratamiento destaca que no generan residuos peligrosos y es posible recuperar aproximadamente el 100% del líquido empleado

(Usmani et al., 2020). No obstante, presenta tres limitaciones que impiden su empleo a escala industrial: (i) se necesitan grandes cantidades de líquidos iónicos y actualmente su coste es elevado, (ii) su reciclaje consume mucha energía y, (iii) durante el pretratamiento, la solución se vuelve viscosa por lo que su manejo se hace difícil (Haghighi et al., 2013). Fu y Mazza (2011) mostraron una estrategia para solventar estos problemas empleando disoluciones acuosas de líquidos iónicos. Con ello, se consiguió reducir la cantidad de líquido iónico, lo que produjo una disminución de la viscosidad y, finalmente, los líquidos iónicos se reciclaron fácilmente ya que la evaporación u ósmosis inversa no fueron necesarias.

Para el tratamiento de biomasa lignocelulósica, a nivel industrial, una de las mejores opciones ha sido el empleo de los líquidos iónicos libres de halógenos basados en acetato, como por ejemplo el acetato de 1-etil-3-metilimidazolio (EMIM OAc), ya que tienen menor viscosidad y son más estables térmicamente que aquellos con grupos cloruros (Zhao et al., 2009).

2.5.1.3. Pretratamientos físico-químicos

Son tratamientos que combinan la acción física de unas condiciones de presión y temperatura con la adición de un agente químico. Estos pretratamientos son eficaces para solubilizar la hemicelulosa y alterar la estructura de la lignina, provocando que las enzimas hidrolíticas accedan más fácilmente a la celulosa. Estos pretratamientos dependen de las condiciones experimentales y de los reactivos químicos utilizados que afectan a las propiedades físicas y químicas de la biomasa (Behera et al., 2014).

2.5.1.3.1. Explosión por vapor

Este método se basa en la combinación de efectos térmicos, químicos y mecánicos que actúan sobre la biomasa. El calentamiento con vapor (proceso termoquímico) produce la descomposición de los componentes estructurales, suele ocurrir a alta presión (20-50 bar) y temperaturas de 160-260°C y se mantiene durante un período corto de tiempo. El cizallamiento (proceso mecánico) se produce debido a la descompresión instantánea provocando la rotura mecánica de la matriz lignocelulósica y la disminución del tamaño de la biomasa pretratada. Y finalmente, tiene lugar la evaporación de la humedad y la autohidrólisis (proceso químico) de los enlaces glucosídicos. Estos procesos dan como resultado un licor de pretratamiento, que contiene los azúcares hemicelulósicos disueltos

y compuestos de degradación de los mismos, y una fracción sólida insoluble en la que se recuperan las cantidades restantes de celulosa, hemicelulosa y lignina (Jedrzejczyk et al., 2019).

Este tipo de pretratamiento presenta múltiples ventajas como bajo impacto ambiental, baja inversión de capital, ausencia de uso de productos químicos peligrosos y consumos menores de energía que los pretratamientos anteriores. Los principales inconvenientes de esta técnica son la incompleta desestructuración de la matriz lignocelulósica y la destrucción de una parte de la hemicelulosa. Se ha propuesto combinar este tipo de pretratamiento con otros como líquidos iónicos, organosolventes y biológicos para solventar estos problemas (Bhatt y Shilpa, 2015).

2.5.1.3.2. Agua caliente a presión

El pretratamiento con agua caliente, también conocido como autohidrólisis, es un pretratamiento hidrotérmico que utiliza altas temperaturas (160-220°C) y presiones en un reactor para conservar el agua en fase líquida y en contacto con la biomasa durante tiempos de residencias cortos y sin adición de productos químicos y catalizadores (Tomás-Pejó et al., 2011). En esta técnica, cuando el agua reacciona con la biomasa lignocelulósica (proceso de autohidrólisis), se produce la hidrólisis de las hemicelulosas, quedando así la celulosa más accesible para el ataque enzimático. Esta técnica es capaz de solubilizar más del 80% de la hemicelulosa presente en la biomasa.

Este pretratamiento permite la obtención de una fracción sólida compuesta por celulosa y materiales insolubles en agua, y otra líquida constituida por agua y por la mayoría de las hemicelulosas solubilizadas (Taylor et al., 2019). Para evitar la generación de inhibidores y la degradación de los azúcares, el pH debe controlarse entre 4 y 7 (Jedrzejczyk et al., 2019).

Las principales ventajas de esta técnica son la alta recuperación de azúcares derivados de la hemicelulosa, la baja formación de productos de degradación y el hecho de no requerir adición de catalizador o productos químicos. No obstante, presenta una alta demanda de energía y agua, y la solubilización de la lignina es parcial (Manzanares et al., 2020).

2.5.1.3.3. Explosión con amoníaco

El pretratamiento de biomasa lignocelulósica con amoníaco presenta altos rendimientos de recuperación de azúcares, mejora la digestibilidad enzimática y produce un bajo contenido de compuestos inhibidores (Yang y Wyman, 2008). Además, se trata de una alternativa económica al uso de agentes alcalinos debido a su alta volatilidad que favorece la recuperación de los mismos.

En el proceso AFEX, la biomasa es pretratada con amoníaco anhidro líquido y se basa en el concepto de proceso de explosión de vapor. Se produce a alta presión (1,72–2,06 MPa), temperaturas de 60-120°C y tiempos de reacción inferiores a 30 min. En este pretratamiento solo se obtiene un material sólido debido al bajo punto de ebullición del amoníaco. La liberación de azúcares no se produce directamente debido a la baja solubilización de las hemicelulosas, pero produce un aumento de la superficie de los polímeros y como consecuencia mejora la digestibilidad enzimática (Haghighi et al., 2013). Optimizando las condiciones del pretratamiento AFEX se puede conseguir más del 90% de conversión de celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables (Alvira et al., 2010).

Otros procesos basados en el empleo de amoníaco son: percolación reciclada de amoníaco y remojo en amoníaco acuoso (Alvira et al., 2010). En el primer caso, se emplea amoníaco acuoso (5-15% en peso) a una temperatura de entre 140 y 210°C, un tiempo máximo de residencia de 90 min y una velocidad de percolación de 5 mL/min. Esto permite solubilizar la hemicelulosa, pero la celulosa permanece intacta. Este pretratamiento no resulta tan competitivo como el AFEX pero es de interés prestar atención a la lignina que se genera debido a su valor añadido (Bouxin et al., 2014).

El proceso de remojo en amoníaco acuoso aparece como una alternativa interesante debido a que se realiza a menor temperatura (30-75°C). Se trata de un pretratamiento que solubiliza o modifica la lignina reteniendo al mismo tiempo en la fracción sólida tanto glucanos como xilanos y genera una mínima cantidad de compuestos inhibidores liberados de la degradación del azúcar (Alvira et al., 2010).

2.5.1.3.4. Oxidación húmeda

Se trata de un pretratamiento hidrotérmico a alta presión (0,5-2 MPa) y temperatura (superior a 120°C) y a un tiempo de reacción inferior a 30 min, que emplea oxígeno o aire como catalizador, y agua. El mecanismo de este proceso radica en los radicales hidroxilos formados y la autocatálisis de los ácidos orgánicos formados. En esta técnica se consigue una eficaz solubilización e hidrólisis de las hemicelulosas y una buena deslignificación provocada por el ácido orgánico que se genera durante el pretratamiento y reacciones oxidativas. La formación de compuestos inhibidores como furfural e hidroximetilfurfural es menor en esta técnica en comparación con la explosión con vapor y agua caliente a presión (Haghighi et al., 2013).

Los costes del oxígeno y del catalizador son considerados los principales inconvenientes para el desarrollo de esta tecnología de oxidación húmeda (Tomás-Pejó et al., 2011).

2.5.1.3.5. Fluidos supercríticos

Como se indicó anteriormente, los fluidos que se encuentran a presiones y temperaturas que exceden la presión y la temperatura crítica se conocen como fluidos supercríticos (Subramaniam, 2017). Los fluidos supercríticos utilizados para pretratar la biomasa lignocelulósica incluyen CO₂ supercrítico, agua supercrítica, etanol supercrítico o mezclas de CO₂ supercrítico con codisolventes (Liu et al., 2019).

Al igual que para la extracción de compuestos bioactivos, el fluido supercrítico más empleado es el CO₂. En este pretratamiento, el CO₂ se comporta como un solvente. Para ello, el CO₂ pasa a través de un recipiente de alta presión que contiene la biomasa. El recipiente se calienta a la temperatura requerida y se mantiene durante varios minutos a altas temperaturas. El CO₂ entra en la biomasa a alta presión y forma ácido carbónico que hidroliza la hemicelulosa. El gas presurizado, cuando se libera, altera la estructura de la biomasa, lo que aumenta la superficie accesible (Kumar y Sharma, 2017). Este método de pretratamiento no es adecuado para biomasa que no tiene humedad. Por ello, cuando se emplea un fluido supercrítico en el pretratamiento, normalmente, se requiere una etapa de acondicionamiento del material sólido en la que se adiciona entre 10-40% de carga de agua para facilitar la hidrólisis de las hemicelulosas y, ocasionalmente, se debe ajustar el pH.

Las principales ventajas de este pretratamiento son el bajo coste del CO₂, la baja formación de compuestos tóxicos. Además, al ser un gas se puede eliminar de forma gaseosa sin dejar restos o se puede recuperar y recircular fácilmente. Por todo esto, la extracción supercrítica se puede considerar un proceso sostenible. Sin embargo, el alto costo del reactor que pueda tolerar condiciones de alta presión es un obstáculo en su aplicación a escala industrial (Kumar y Sharma, 2017).

2.5.1.4. Pretratamientos biológicos

El pretratamiento biológico consiste en la acción de hongos que dan lugar a la generación de enzimas para degradar la lignina y hemicelulosas presentes en la biomasa (Sindhu et al., 2016). Los hongos que pueden degradar la biomasa lignocelulósica se pueden clasificar en hongos de pudrición blanda, marrón y blanca. Los hongos de pudrición blanda reducen la lignina Klason y erosionan la pared celular secundaria (p. ej. *Inonotus Hypsidus*). Los hongos de pudrición parda (conocidos como basidiomicetos) modifican la lignina y atacan la celulosa y hemicelulosa (p. ej. *Laetiporus Sulphureus*). Los hongos de pudrición blanca producen la biodegradación de la lignina (p. ej. *Phanerochaete chrysosporium*) (Rouches et al., 2016).

Diferentes estudios han mostrado una alta eficiencia de deslignificación cuando se aplican microorganismos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerate*, *Cyathus stercolerus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Pleurotus ostreatus* a diversas biomásas lignocelulósicas. La deslignificación de la lignina por estos hongos lleva de 10 a 14 días para lograr resultados significativos, pero se ha encontrado que es muy selectiva y eficiente (Behera et al., 2014).

Las principales ventajas de este tipo de pretratamiento son la especificidad del sustrato y la reacción, bajo consumo de energía, la no formación de productos nocivos y el elevado rendimiento de los productos deseados. Por todo ello, en comparación con algunos de los pretratamientos descritos previamente, el pretratamiento biológico se considera un proceso ambientalmente seguro (Kumar y Sharma, 2017). No obstante, se trata de un procedimiento lento que requiere un control minucioso durante la etapa de crecimiento y necesita de un gran espacio para poder llevarlo a cabo (Bhatt y Shilpa, 2015). En la Tabla 13 se resumen las principales ventajas y desventajas de los pretratamientos descritos.

Tabla 13. Principales ventajas y desventajas de los pretratamientos que se pueden aplicar a las biomásas lignocelulósicas (basada en Alvira et al., 2010; Bhatt y Shilpa, 2015).

Pretratamiento	Ventajas	Desventajas
Físicos		
Molienda	- Disminuye la cristalinidad de la celulosa	- Requiere una potencia muy alta de procesamiento - No es factible a escala industrial
Extrusión	- Elevado cizallamiento - Condiciones suaves de operación - Evita la formación de sustancias tóxicas	- Elevado consumo de energía - Elevados coste de operación
Irradiación	- Alta uniformidad y selectividad - Tiempo de procesamiento cortos	- Costes elevados
Químicos		
Ácidos	- Disolución de hemicelulosas - Alto rendimiento de azúcar	- Altos coste de ácido y necesidad de neutralización - Se requiere equipo resistente a la corrosión - Formación de inhibidores
Alcalinos	- Causan menor degradación de azúcares que el pretratamiento ácido	- Formación de inhibidores
Organosolv	- Hidrólisis eficaz de lignina y hemicelulosa - Útil para la recuperación de lignina	- Alto coste - Requieren equipos de alta presión
Ozonólisis	- Eliminación de lignina - No genera compuestos tóxicos	- Requerimientos de grandes cantidades de ozono - Técnica costosa
Líquidos iónicos	- Disolución de grandes cantidades de celulosa - Trabaja en condiciones de reacción suave	- Técnica costosa - Industrialmente inviable
Físico-Químicos		
Explosión por vapor	- No se requiere equipo de corrosión - Liberación de lignina y solubilización de gran parte de las hemicelulosas	- Formación de inhibidores - Requiere lavado de la biomasa tratada o acondicionamiento del hidrolizado para eliminar inhibidores
Agua caliente a presión	- Eliminación de lignina, lo que favorece a la posterior hidrólisis enzimática	- Alto consumo de agua y aporte energético
Explosión con amoníaco	- Deslignificación y solubilización de hemicelulosa - Baja formación de inhibidores	- Es necesario reciclar el amoníaco
Oxidación húmeda	- Eliminación eficiente de lignina - Baja formación de inhibidores - Mínima demanda de energía	- Se requiere un alto coste de oxígeno - Necesidad de condiciones alcalinas para una acción eficaz
Fluidos supercríticos	- Uso de solvente verde - No causa degradación de azúcares	- Costes muy elevados
Biológicos		
	- Eficaz en la degradación de lignina y hemicelulosa - Reducido consumo de energía	- Tasa de hidrólisis muy baja - Proceso lento

2.5.2. Hidrólisis enzimática

Tras el pretratamiento, la biomasa es filtrada obteniéndose una fracción sólida insoluble compuesta principalmente por celulosa y lignina y un hidrolizado compuesto por azúcares hemicelulósicos y lignina que han sido solubilizados. La composición de estas dos fracciones puede variar en función del tipo de pretratamiento, de las condiciones aplicadas y del material lignocelulósico (Sun et al., 2016).

La hidrólisis enzimática se basa en la interacción química de una enzima con los polímeros (celulosa y hemicelulosa) de la fracción insoluble dando lugar a su transformación en monómeros (glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa y manosa), que posteriormente pueden convertirse en otros compuestos de valor mediante fermentación (Wang y Lu, 2021).

Este tipo de hidrólisis es considerado un proceso eficaz debido a la especificidad de la enzima hacia el sustrato, a las bajas temperaturas de trabajo (entre 40 y 45°C), el pH aplicado es cercano al neutro, la presión es cercana a las condiciones ambientales y hay una mínima formación de compuestos inhibidores (Zabed et al., 2016). Estas condiciones suaves resultan ventajosas debido a que no presenta problemas de corrosión para los equipos y, por tanto, no se requieren materiales especiales de construcción. Sin embargo, debido a la naturaleza recalcitrante de gran parte de las biomásas, la hidrólisis enzimática puede ser lenta y requiere de un pretratamiento de la biomasa para alcanzar altos rendimientos de azúcar (Galbe y Zacchi, 2012).

Los principales sistemas enzimáticos emplean celulasas y hemicelulasas (Zabed et al., 2016). La hidrólisis enzimática, utilizando celulasas, se considera la forma más atractiva de convertir la celulosa en glucosa. Las celulasas, de acuerdo con su actividad enzimática, se clasifican en: endoglucanasas (hidrólisis de enlaces beta-1,4-glicosídicos internos), exoglucanasas (eliminación de monómeros y dímeros del final de la cadena de glucosa) y glicosilasas (hidroliza los dímeros de glucosa) (Kucharska et al., 2018).

La mayor parte de los microorganismos productores de celulasas producen también, aunque en una menor proporción, hemicelulasas (Travaini et al., 2013). La hemicelulosa es una estructura compleja desde el punto de vista químico y su degradación requiere sistemas enzimáticos más específicos y múltiples. Un sistema típico de hemicelulasas incluye endo-1,4- β -xilanasas o endo-xilanasas, xilano 1,4- β -xilano esterasas, feruloil y *p*-

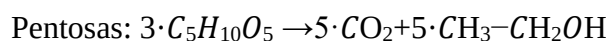
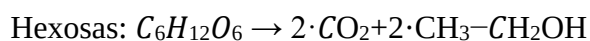
cumaroil esterasas, α -1-arabinofuranosidasas, α -glucuronidasas, α -arabinofuranosidasas, acetilxilano esterasa y α -4-O-metil glucuronosidasas xilosidasas.

Además de hidrolizar la hemicelulosa, las hemicelulasas favorecen la hidrólisis de la celulosa aumentando la accesibilidad del sistema enzimático celulolítico a las fibras de celulosa (Alvira et al., 2010).

2.5.3. Fermentación. Aplicación para la obtención de bioetanol

Se trata de la última etapa del proceso de conversión de biomasa en bioetanol, xilitol u otro bioproducto de interés y antes de la separación final del mismo. También, se puede aplicar este proceso para la producción de compuestos bioactivos (Kamal Amit et al., 2017).

En el caso del bioetanol, la fermentación alcohólica es una bioreacción que permite transformar azúcares monoméricos en alcohol mediante microorganismos, principalmente levaduras y algunas bacterias (Vázquez y Dacosta, 2007). Durante la fermentación, los microorganismos convierten las pentosas y hexosas derivadas de la celulosa y la hemicelulosa en etanol según las siguientes reacciones:



Estas reacciones permiten calcular el rendimiento teórico estequiométrico máximo de 0,511 gramos de etanol por cada gramo de azúcar, tanto para hexosas como pentosas. Aunque, en la práctica es complicado obtener este rendimiento debido a que los microorganismos utilizan una parte de los azúcares consumidos en su propio metabolismo celular, crecimiento y reproducción. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0,469 a 0,485 g/g. Los rendimientos en la industria varían entre 87 y 93% del rendimiento teórico (Vázquez y Dacosta, 2007). Sin embargo, la fermentación se considera una tecnología limpia para la producción de etanol, sencilla y fácil de desarrollar (Bu et al., 2019), aunque a nivel industrial el empleo de biomasa lignocelulósica es todavía limitado ya que se requiere de equipamientos costosos para su conversión (Balbás de la Fuente, 2017).

En cualquier caso, las levaduras (hongos unicelulares), en particular, *Saccharomyces cerevisiae*, son los microorganismos más usados para la producción de etanol a nivel

comercial ya que presentan tasas de crecimiento rápidas, producción eficaz de etanol y elevada tolerancia a factores ambientales de estrés (Binod et al., 2011). Como desventaja, esta levadura solo puede fermentar hexosas (glucosa, galactosa y manosa), lo que representa una gran limitación cuando se quiere utilizar en la fermentación de pentosas, como la xilosa, que provienen de la hemicelulosa (Talebnia et al., 2010). Muchas biomásas, como las derivadas de la industria oleícola (Tabla 3), contiene altos porcentajes de hemicelulosa, que está constituida principalmente por xilosa.

Para conseguir que el proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica sea viable es necesario un incremento de la recuperación de azúcares de la biomasa inicial. Para lograr este propósito son necesarios microorganismos capaces de fermentar pentosas y hexosa. *Scheffersomyces stipitis* (o *Pichia stipitis*), *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* y *Kluyveromyces marxianus* son algunos de los microorganismos capaces de fermentar ambos tipos de azúcares (Zabed et al., 2016).

Teniendo en cuenta la fermentación de pentosas, las etapas de hidrólisis y fermentación para la obtención de etanol (y otros bioproductos) se pueden realizar mediante cinco configuraciones diferentes (Figura 43). El empleo de una u otra configuración permitirá optimizar el uso de las enzimas para conseguir reducir los efectos de inhibición por producto, de obtener mayores rendimientos y concentraciones de producto, así como disminuir el consumo de energía, la inversión inicial y los tiempos de operación (Zabed et al., 2016). Las principales ventajas e inconvenientes se muestran en la Tabla 14.

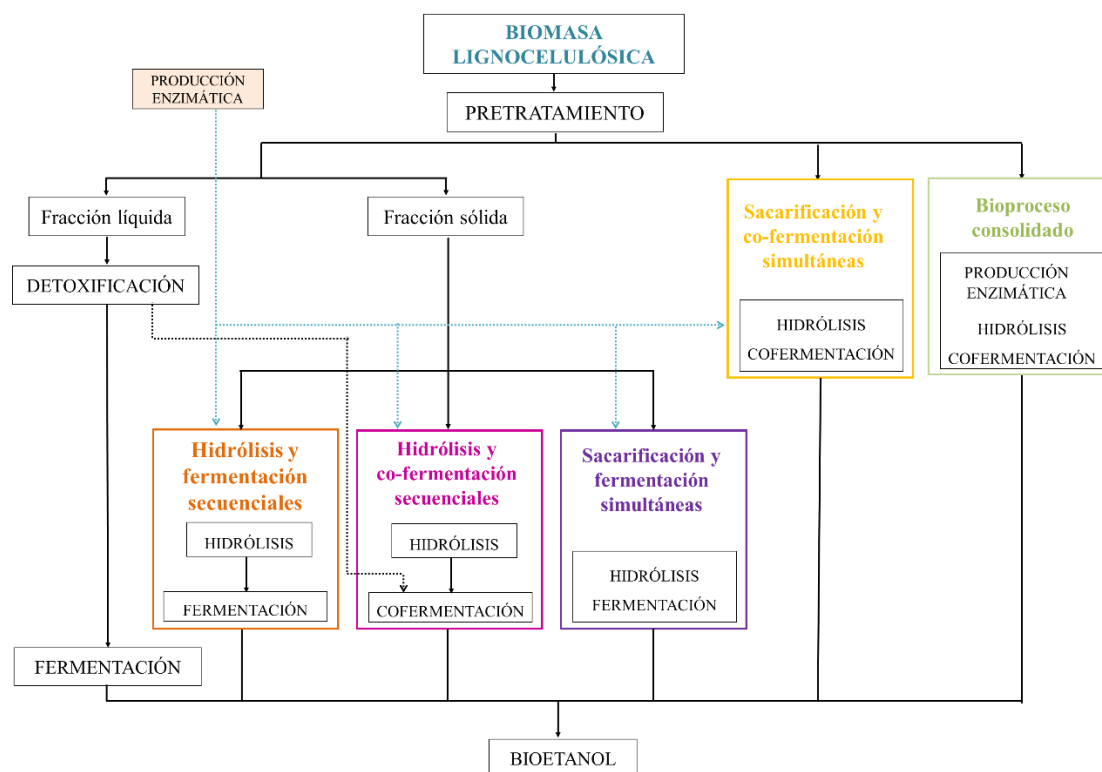


Figura 43. Esquema general de la obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica. Fuente: elaboración propia.

- **Hidrólisis y fermentación secuenciales (HFS)**

Este es el esquema más empleado y convencional para el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica. Tras el pretratamiento, la fracción sólida obtenida es sometida a una hidrólisis enzimática con el fin de hidrolizar la celulosa a glucosa. Una vez finalizada esta etapa y separado el residuo rico en lignina, la glucosa del hidrolizado enzimático es fermentada a etanol.

- **Hidrólisis y co-fermentación secuenciales (HCFS)**

Este proceso es una variante de la HFS donde, una vez finalizada la hidrólisis enzimática del sólido pretratado, el hidrolizado enzimático se mezcla con el licor de pretratamiento (rico en azúcares hemicelulósicos), para ser fermentado conjuntamente por microorganismos capaces de fermentar pentosas y hexosas (Gírio et al., 2010).

- **Sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)**

Con el fin de mejorar la producción de bioetanol, la fracción sólida resultante del pretratamiento es sometida a una hidrólisis enzimática y fermentación en el mismo reactor y de forma simultánea. Esto evita la inhibición de las enzimas por altas concentraciones

de glucosa, reduce el riesgo de contaminación microbiana y disminuye los costes de equipamiento y los tiempos de proceso (Chohan et al., 2020).

- **Sacarificación y co-fermentación simultáneas (SCFS)**

Con el objetivo de mejorar aún más la eficiencia de conversión del sustrato, se desarrolló esta configuración. Se basa en que la materia prima pretratada, genera un hidrolizado hemicelulósico y un residuo sólido rico en celulosa y lignina que son hidrolizados y fermentados simultáneamente. En este proceso las pentosas procedentes de la hemicelulosa se fermentan a la vez que se produce la hidrólisis de la celulosa y fermentación de las hexosas obtenidas a etanol.

Sin embargo, la hidrólisis enzimática, así como el crecimiento y el metabolismo de las levaduras, se pueden ver afectados significativamente bajo una carga de sólidos alta debido a dos factores: el aumento de las concentraciones de compuestos inhibidores, como el ácido acético y derivados de la lignina, y la baja eficiencia de la mezcla y transferencia de materia como resultado de una alta viscosidad. Para minimizar estos impactos negativos y maximizar el rendimiento de etanol, la alimentación por lotes puede ser un esquema favorable (Bu et al., 2019).

2.5.3.1. Bioproceso consolidado

Esta configuración integra la máxima biotransformación de biomasa en etanol por una sola comunidad de microorganismos. En un mismo reactor tienen lugar las tres etapas biológicas del proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica: la producción de enzimas (celulasas y hemicelulasas), la hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada y la fermentación de los azúcares celulósicos y hemicelulósicos.

A pesar de las ventajas de esta configuración de proceso (Tabla 14), actualmente no ha sido desarrollado debido a que no existen microorganismos capaces de realizar todas las etapas simultáneamente, por lo que se investiga la posibilidad de mejorarlos mediante modificación genética (Parisutham et al., 2014). Hasta ahora, los microorganismos explorados son bacterias anaerobias celulolíticas termófilas utilizadas convencionalmente para la producción de bioetanol por su capacidad de conversión directa de biomasa para la producción de bioetanol a temperaturas extremadamente altas (Saggi y Dey, 2019).

Tabla 14. Principales ventajas y desventajas de las diferentes configuraciones de proceso que integran las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación (Binod et al., 2011; Bu et al., 2019; Zabed et al., 2016).

Configuración	Ventajas	Desventajas
HFS	- La hidrólisis y la fermentación se realizan en sus condiciones óptimas de pH y temperatura. - La fermentación se puede realizar en continuo con posibilidad de reciclaje de células.	- Alto coste de inversión y tiempo de procesamiento. - Riesgo de inhibición de enzimas por producto final en la hidrólisis enzimática (glucosa y celobiosa). - Riesgo de estrés osmótico del microorganismo a altas concentraciones de azúcares. - No hay fermentación de pentosas. Se soluciona si se utiliza HCFS.
HCFS	- Las mismas de la configuración HFS. - Conversión simultánea de hexosas y pentosas en una única etapa. - Posibilidad de obtener mayores concentraciones de etanol.	- Las mismas de la configuración HFS. - Necesidad de usar microorganismos que fermenten pentosas, que no son ampliamente utilizados a nivel industrial.
SFS	- Permite el empleo de altas concentraciones de sustrato, que permite obtener altas concentraciones de etanol. - Se evita la inhibición enzimática por producto final. - Disminución de costes de inversión y menor tiempo de procesamiento. - Empleo de menores concentraciones de enzima. - Altos rendimientos de etanol. - Menor posibilidad de contaminación microbiana. - Amplia disponibilidad de microorganismo eficientes. - Viable económicamente.	- Requiere un compromiso entre las condiciones óptimas de la HE y la fermentación. - Imposibilidad de reciclar células. - Alta viscosidad que provoca una mala mezcla en el reactor cuando se trabaja con altas cargas de sólidos. - No hay fermentación de pentosas.
SCFS	- Las mismas que la SFS. - Aprovechamiento de la mayoría de los azúcares presentes en la materia prima. - Puede aumentar el rendimiento de hidrólisis enzimática.	- Las mismas de la SFS. - Necesidad de usar microorganismos que fermenten pentosas, actualmente no están ampliamente desarrollados. - Imposibilidad de reciclar las células.
BPC	- Reducción de costes y simplicidad de operación. - No se necesitan enzimas externas para realizar la HE. - Reducción de reactivos.	- Actualmente se encuentra en fase de investigación. - No existen actualmente microorganismos con todas las características requeridas para un proceso eficiente - Bajos rendimientos en etanol y crecimiento limitado. - Formación de otros bioproductos (ácido acético, glicerol y ácido láctico).

HE: hidrólisis enzimática; HFS: hidrólisis y fermentación secuenciales; HCFS: hidrólisis y co-fermentación secuenciales; SFS: sacarificación y fermentación simultáneas; SCFS: sacarificación y co-fermentación simultáneas; BPC: bioproceso consolidado.

2.5.4. Pretratamientos y fermentación aplicados a las biomásas del olivo

La Tabla 15 muestra bioproductos que se pueden obtener de la biomasa del olivar y la industria oleícola mediante diferentes configuraciones de proceso. Por ejemplo, se ha obtenido bioetanol a partir de poda, hueso, orujo y orujillo, mediante diferentes configuraciones de proceso. Algunos de los rendimientos en etanol más elevados se han alcanzado al pretratar poda de olivo con ácido sulfúrico diluido (190°C, 10 min) y fermentar el prehidrolizado con *Pichia stipitis* (Díaz et al., 2009) o con hueso pretratado en medio alcalino (121°C, 45 min) y fermentado el prehidrolizado con *Pachysolen tannophilus* (Ntaikou et al., 2021).

A partir de poda, hueso y orujillo se puede producir xilitol con diferentes levaduras. Además, el orujillo también se ha empleado para obtener ácido galacturónico con la microalga *Cryptocodinium cohnii*, siendo previamente pretratado con ácido sulfúrico diluido (98°C, 23 min) (Paz et al., 2020). Por otra parte, empleando aguas residuales y *Yarrowia lipolytica* se ha podido obtener ácido cítrico sin una etapa previa de pretratamiento (Sarris et al., 2011).

Tabla 15. Bioproductos obtenidos a partir de residuos/subproductos del olivar y de la industria oleícola mediante pretratamiento y fermentación.

Biomasa derivadas del olivar	Tipo pretratamiento	Condiciones de operación pretratamiento	Microorganismo	Configuración	Producto y concentración	Referencia
Poda de olivo	Prehidrólisis ácida	230°C, 1% H ₂ SO ₄ (m/m)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SFS	Etanol 159 mg/g ^a	Cara et al., 2008
	Prehidrólisis ácida	190°C, 1% H ₂ SO ₄ (m/m), 10 min	<i>Pichia stipitis</i>	Fermentación	Etanol 350-450 mg/g ^b	Díaz et al., 2009
	Prehidrólisis ácida	195°C, 1% H ₃ PO ₄ (m/m), 10 min	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	PSFS	Etanol 109 L/ton ^a Xilitol 27 mg/g ^a	Susmozas et al., 2019
	Prehidrólisis ácida	195°C, 1% H ₃ PO ₄ (m/m), 10 min	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SFS	Etanol 180 mg/g ^c	Oliva et al., 2020
	Agua caliente a presión	210°C, 10 min	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PSFS	Etanol 31,1 g/L	Manzanares et al., 2011
	Prehidrólisis ácida	180°C, 1% H ₂ SO ₄ (m/m), 10 min	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SFS	Etanol 24,9 g/L	Manzanares et al., 2011
	Agua caliente a presión	200°C, 0 min	<i>Candida tropicalis</i>	HFS	Etanol 270-380 mg/g ^a Xilitol 120 a 230 mg/g ^a	Mateo et al., 2015
	Prehidrólisis ácida	170°C, 1% H ₃ PO ₄ (m/m), 10 min, 30% (m/v) sólidos	<i>Escherichia coli</i>	HFS	Etanol 23 g/L	Martínez-Patiño et al., 2015
	Prehidrólisis ácida + alcalino-peróxido	130°C, 2,4% H ₂ SO ₄ (m/m), 84 min, 20% (m/v) + 80°C, 7% H ₂ O ₂ (m/m), 90 min, 10% (m/v) sólidos	<i>Escherichia coli</i>	HFS	Etanol 150 mg/g ^a 190 mg/g ^c	Martínez-Patiño et al., 2017a
Orujo de dos fases	Agua caliente a presión	200°C, 30 min	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HFS	Etanol 3,5 g/L	Kazan et al., 2015

	Prehidrólisis ácida	160°C, 1,75% H ₂ SO ₄ (w/v), 10 min	<i>Escherichia coli</i>	SFS	Etanol 8,1 g/L	El Asli y Qatibi, 2009
	Prehidrólisis ácida	98°C, 0,5% H ₂ SO ₄ (m/v), 23 min	<i>Candida boidinii</i>	Fermentación	Ácido galacturónico 7,05 g/L	Paz et al., 2020
Orujillo	Prehidrólisis ácida + Alcalino	130°C, 3,5% H ₂ SO ₄ (m/m), 130 min + 2% NaOH (m/v), 15 min, Tª ambiente	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	HFS	Etanol 5,2 g/L	Fernandes et al., 2016
	Ácido sulfúrico diluido	170°C, 2% H ₂ SO ₄ (m/v), 20% (m/v) sólidos	<i>Escherichia coli</i>	Fermentación	Etanol 14 g/L	López-Linares et al., 2020a
	Ácido sulfúrico diluido	170°C, 2% H ₂ SO ₄ (m/v)	<i>Candida boidinii</i>	Fermentación	Xilitol 430 mg/g ^b	López-Linares et al., 2020b
	Prehidrólisis ácida	130°C, 2% H ₂ SO ₄ (m/v), 60 min	<i>Escherichia coli</i>	Fermentación	Etanol 50 mg/g ^a Ácido acético 20 g/L	Romero-García et al., 2016b
	Agua caliente a presión	225°C, 0 min	<i>Pachysolen tannophilus</i>	HFS	Etanol 6,4 dm ³ /100 g ^a	Cuevas et al., 2021
Hueso de aceituna	Prehidrólisis ácida en dos etapas	128°C, 10,5% H ₂ SO ₄ (m/m), 60 min, 33% (m/v) + 195°C, 2,4% H ₂ SO ₄ (m/m), 5 min	-	Hidrólisis enzimática	Glucosa 159 mg/g ^a Xilosa 231 mg/g ^a	Padilla-Rascón et al., 2020
	Alcalino	121°C, 45 min, 5% NaOH (m/v)	<i>Pachysolen tannophilus</i>	HFS	Etanol 790 mg/g ^a	Ntaikou et al., 2021
	Prehidrólisis ácida	121°C, 45 min, 5% (m/v)	<i>Pachysolen tannophilus</i>	HFS	Xilitol 49 mg/g ^a	Ntaikou et al., 2021
	Prehidrólisis ácida	130°C, 2% H ₂ SO ₄ (m/v), 90 min	-	Hidrólisis enzimática	Xilosa 270 mg/g ^a	Lama-Muñoz et al., 2014
Aguas residuales	-	-	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Fermentación	Ácido cítrico 18,1 g/L Lípidos 1,9 g/L	Sarris et al., 2011

^aReferido a biomasa; ^bReferido al azúcar; ^cReferido a biomasa extraída. PSSF: presacarificación seguida de sacarificación y fermentación simultáneas.

2.6. Biomosas del olivar para un modelo de biorrefinería

La Figura 44 muestra diferentes productos que se pueden obtener a partir de biomosas lignocelulósicas. Diferentes investigadores han estudiado la posibilidad de integrar algunos de estos procesos para desarrollar modelos de biorrefinería basados en la biomasa derivada del sector del aceite de oliva y de orujo de oliva. Además, se podría aprovechar la fracción de extractivos que es abundante en la mayoría de estas biomosas. Esto permitiría el aprovechamiento integral de estas biomosas. El desarrollo de estas biorrefinerías sería un instrumento clave para el desarrollo de un modelo de bioeconomía circular, en el ámbito rural, que supone la valorización de estos recursos biomásicos, de carácter residual en su mayoría.

En el caso de los residuos y subproductos del olivar y sus industrias asociadas, al tratarse de biomosas que se generan de forma estacional la idea de una estrategia de biorrefinería basada en todas ellas cobra un especial interés ya que esto permitiría asegurar el suministro de materias primas a la biorrefinería durante todo el año. Además, se trata de materias primas con composiciones diferentes lo que las convierte en complementarias. Así, en estas instalaciones, de forma integrada, se podría producir etanol de la poda de olivo (Martínez-Patiño et al., 2018), xilitol o furfural a partir del hueso de aceituna (Padilla-Rascón et al., 2021) y antioxidantes a partir de poda (Martínez-Patiño et al., 2019b), hojas (Lama-Muñoz et al., 2019a) u orujillo (Doménech et al., 2021). Y, los residuos finales se podrían emplear para la generación de energía térmica de utilización

en la propia biorrefinería. No obstante, de acuerdo con las investigaciones publicadas, a continuación, se exponen ejemplos de biorrefinerías basadas en las diferentes biomásas de olivar, de forma particular, para obtención de diferentes bioproductos.

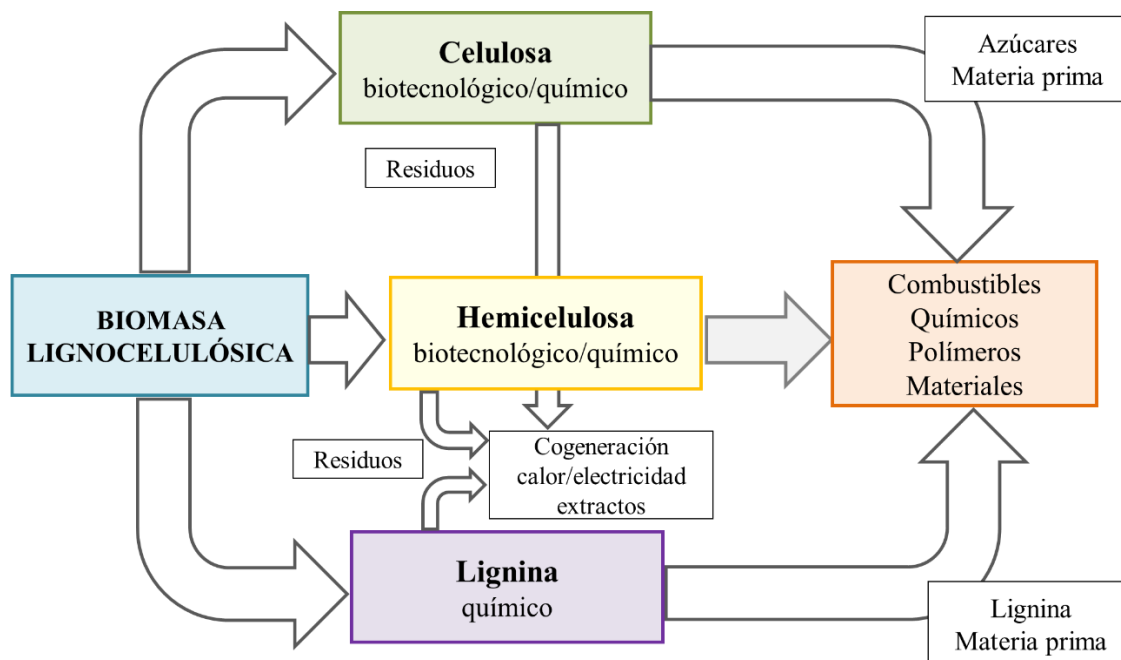


Figura 44. Esquema general de una biorrefinería lignocelulósica. Fuente: elaboración propia.

2.6.1. Poda de olivo

El empleo de la poda de olivo como materia prima ha sido la propuesta más estudiada para el desarrollo de biorrefinerías para producción de bioetanol de segunda generación y otros bioproductos (Ballesteros et al., 2011; Oliva et al., 2020; Toledano et al., 2013).

En el estudio de Ballesteros et al. (2011) (Figura 45a), la primera etapa de la biorrefinería es una extracción acuosa (120°C, 60 min), con el fin de reducir el contenido en extractivos de esta biomasa ya que puede provocar interferencias y dificultar etapas posteriores. Estos autores proponen que el extracto resultante se puede procesar para el aprovechamiento de los azúcares solubles y la recuperación de compuestos antioxidantes naturales. Por otro lado, el sólido extraído se sometió a una etapa de pretratamiento con ácido sulfúrico diluido (187°C, 30 min), obteniéndose una fracción sólida, formada principalmente por una mezcla de celulosa y lignina, y otra líquida, en la que se encuentran azúcares, principalmente, xilosa, que puede transformarse en xilitol o bioetanol. A continuación, se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de la fracción sólida para producir azúcares

fermentables (principalmente, glucosa) para producir etanol u otros productos a través de esta vía. El sólido producido después de la fermentación es rico en lignina y por ello puede emplearse como biocombustible para la generación de energía o para la producción de polímeros, antioxidantes naturales, resinas, etc, mediante procesos químicos.

En otra propuesta similar, Oliva et al. (2020) estudiaron la producción de bioetanol mediante extracción con agua de la poda de olivo y un pretratamiento de explosión por vapor catalizado con ácido fosfórico seguido de una etapa de fermentación con una cepa modificada de *Saccharomyces cerevisiae*, capaz de fermentar xilosa. La mejor configuración de proceso ensayada en este estudio fue bajo pre-sacarificación y sacarificación y fermentación simultáneas, obteniendo 12,1 g de etanol/100 g de biomasa (Figura 45b). En otra estrategia, Romero-García et al. (2016c) propusieron la combinación de diversas tecnologías para la producción de antioxidantes de alto valor añadido y etanol.

Toledano et al. (2013) propusieron la producción de bioetanol a partir de la fracción sólida de la poda de olivo pretratada (70% etanol (v/v), 200°C, 90 min), mediante hidrólisis enzimática y fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que el prehidrolizado se puede utilizar para la producción de productos bioquímicos a partir de la lignina solubilizada. Alternativamente, Requejo et al. (2012) aplicaron un tratamiento hidrotérmico (205°C, 12,5% (m/v) a la fracción de poda, mayor de 1 cm para obtener, azúcares monoméricos y oligosacáridos de la fracción líquida y producir pasta de papel o etanol con el sólido pretratado. Para la parte residual de la poda (hojas y ramas finas) proponen un uso térmico.

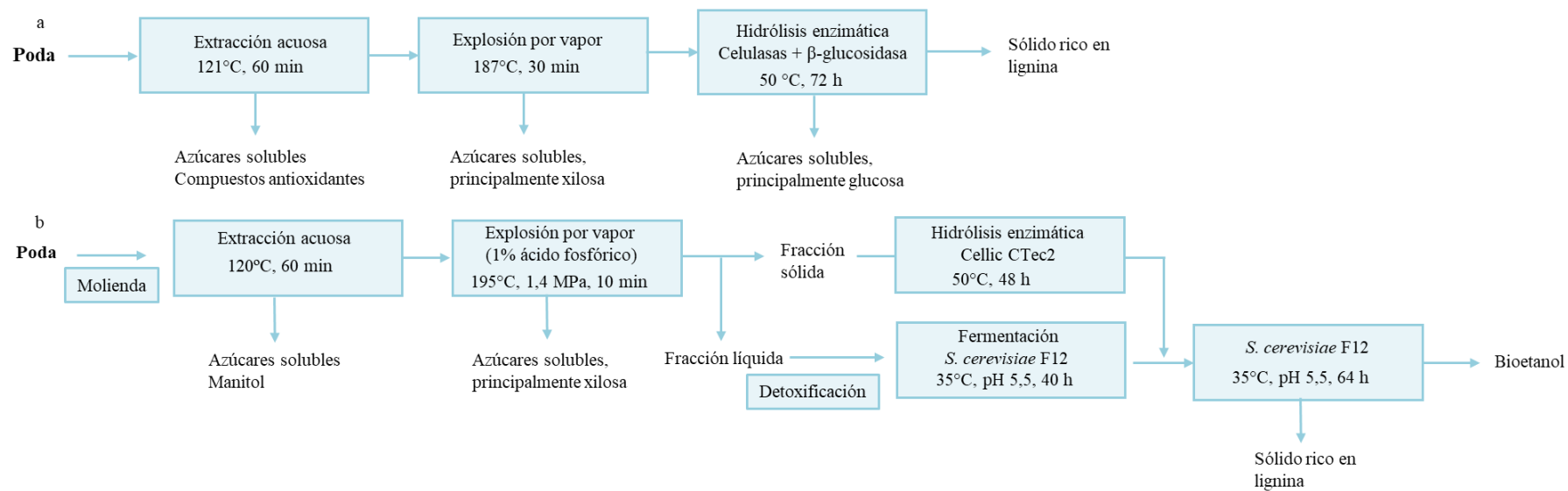


Figura 45. Esquemas de biorrefinerías propuestas a partir de poda de olivo. Fuente: elaboración propia.

2.6.2. Hueso de aceituna

Hernández et al. (2014) estudiaron la evaluación tecnoeconómica y ambiental de dos esquemas de biorrefinería a partir del hueso de aceituna. En un primer esquema de biorrefinería propusieron la producción integrada de xilitol, furfural, etanol y poli-3-hidroxibutirato (PHB). En un segundo esquema se consideró la producción de xilitol, furfural, etanol y PHB integrados a un sistema de cogeneración para producir bioenergía a partir de los residuos de los procesos a los que ha sido sometida la biomasa previamente. Este último enfoque, actualmente no se considera factible debido a que supone un coste adicional dentro de la biorrefinería, pero medioambientalmente sería adecuado debido a que el sistema de cogeneración presenta niveles mínimos de contaminación.

Lama-Muñoz et al. (2014) propusieron una estrategia de fraccionamiento del hueso de aceituna para producir, en una primera etapa, un extracto antioxidante y en una segunda etapa, azúcares fermentables. Para ello se realizó una extracción acuosa (130°C, 90 min) obteniéndose un extracto rico en antioxidantes y a continuación, un pretratamiento con ácido diluido (130°C, 90 min y 2% H₂SO₄) que dio lugar a un hidrolizado rico en pentosas. Además, el sólido resultante del pretratamiento se sometió a una hidrólisis enzimática dando como resultado un hidrolizado rico en glucosa y un sólido residual rico en lignina (Figura 46a). Cada una de estas corrientes presenta una gran variedad de aplicaciones como la obtención de un combustible renovable y otros bioproductos.

Un esquema de proceso alternativo fue desarrollado por Doménech et al. (2021) para producir azúcares a partir de esta biomasa. Para ello se pretrató el hueso mediante extrusión catalizada con NaOH (125°C, 15% NaOH (m/v) que favoreció la liberación de azúcares. Estos autores consiguen con este proceso una mejora de la accesibilidad de las enzimas celulolíticas a los carbohidratos y evitan la degradación de los azúcares durante el pretratamiento.

2.6.3. Orujo de aceituna y orujillo

Empleando como biomasa el orujo de aceituna y orujillo, se han propuesto varios esquemas de biorrefinería para obtener bioetanol junto con otros bioproductos.

Una primera propuesta de biorrefinería engloba, en una primera etapa, la extracción del aceite de orujo y, en una segunda etapa, la obtención de diferentes fracciones de valor añadido a partir del orujillo resultante. Así, se recuperaron 231 mg de proteínas/L mediante extracción a alta presión (88°C, 30 min y 2,26 mL/min de velocidad de flujo) y 3,15 g azúcares/L mediante un tratamiento con agua caliente a presión (200°C, 30 min) y una posterior hidrólisis enzimática en condiciones estándar. Al final del proceso en cascada, se recuperó un 11% de las proteínas totales, un 94% de los azúcares totales y un 94% de la lignina presente en la biomasa. Posteriormente, el hidrolizado rico en azúcares se utilizó para la producción de bioetanol, obteniendo un rendimiento teórico de fermentación de 15,25% (Kazan et al., 2015) (Figura 46b).

En una segunda propuesta de biorrefinería, Schievano et al. (2015) recuperaron ácidos grasos mono y poliinsaturados, antioxidantes naturales junto con otro bioproducto de alto valor como el escualeno mediante una extracción con dióxido de carbono supercrítico (SCO₂) y una extracción con SCO₂ junto con etanol como codisolvente (250 bar, 70°C). En una siguiente etapa termoquímica, se plantearon dos posibilidades para el sólido extraído, aplicar una combustión que produjo energía (vapor y calor) y una pirólisis que dio lugar a la generación de biocombustibles (bio-aceite y gas de síntesis) y biomateriales (biocarbón).

Goldfarb et al. (2016) emplearon el orujo de aceituna como materia prima para una biorrefinería en la que obtuvieron compuestos fenólicos mediante extracción supercrítica con CO₂ (250 bar, 70°C). Además, el residuo extraído se sometió a pirólisis (600°C, 30 min) para producir un biocombustible. Otro ejemplo es el esquema de biorrefinería seguido por Gálvez-Pérez et al. (2019) en el que optimizaron un pretratamiento hidrotérmico a 30°C y 1 h con el fin de separar los extractos solubles en agua. A continuación, el sólido resultante se sometió a una autohidrólisis (120°C, 60 min) para extraer azúcares (principalmente, glucosa y oligosacáridos de xilosa) y un sólido con un poder calorífico superior a 5000 kcal/kg.

Actualmente, en el proyecto Alpeocel (AGROISA, 2021) se está trabajando en el desarrollo de biorrefinerías a pequeña escala para la transformación sostenible del alperujo generado en almazaras y orujeras, generando microfibras y nanofibras de celulosa y compuestos bioactivos para la elaboración de cosméticos, entre otros productos.

En cuanto al orujillo, un reciente estudio propone su valorización para producir azúcares fermentables y otros compuestos de valor añadido. En una primera etapa se llevaría a cabo una extracción con agua (100°C, 30 min), seguida de un pretratamiento con agua caliente líquida (170-210°C, 0 min) o prehidrólisis ácida (170-210°C, 1-2% (m/v) H₂SO₄) y finalmente, una hidrólisis enzimática del sólido pretratado. La extracción acuosa permite extraer compuestos de valor como manitol y fenoles, y los pretratamientos fraccionan la biomasa obteniéndose azúcares fermentables (glucosa y xilosa), moléculas plataforma para la obtención de biocarburantes u otros compuestos de interés (Manzanares et al., 2020).

2.6.4. Aguas residuales de almazara

Scoma et al. (2011) propusieron un esquema de biorrefinería a partir de aguas residuales de almazara mediante procesos fisicoquímicos y biotecnológicos. Como primera etapa de proceso se realizó una extracción en fase sólida para la recuperación de compuestos fenólicos (60%) seguida de una segunda etapa de digestión anaerobia acidogénica para producir ácidos grasos volátiles (70% de rendimiento) (Figura 46c). Más tarde, estos investigadores ampliaron este esquema de biorrefinería a partir de estas aguas residuales aplicando un proceso de separación por electrodiálisis para generar una corriente enriquecida en fenoles y ácidos grasos. Esta corriente se empleó para producir polihidroxialcanoato mediante fermentación aeróbica y, por último, biometano a partir del líquido agotado producido en la electrodiálisis mediante una digestión anaerobia (Scoma et al., 2016). El Mekawy et al. (2013) estudiaron diferentes procesos biológicos para la valorización de las aguas residuales de almazara. Esto permitió la obtención de una gran variedad de productos como ácidos grasos volátiles, biohidrógeno, biogás, etanol o lipasas.

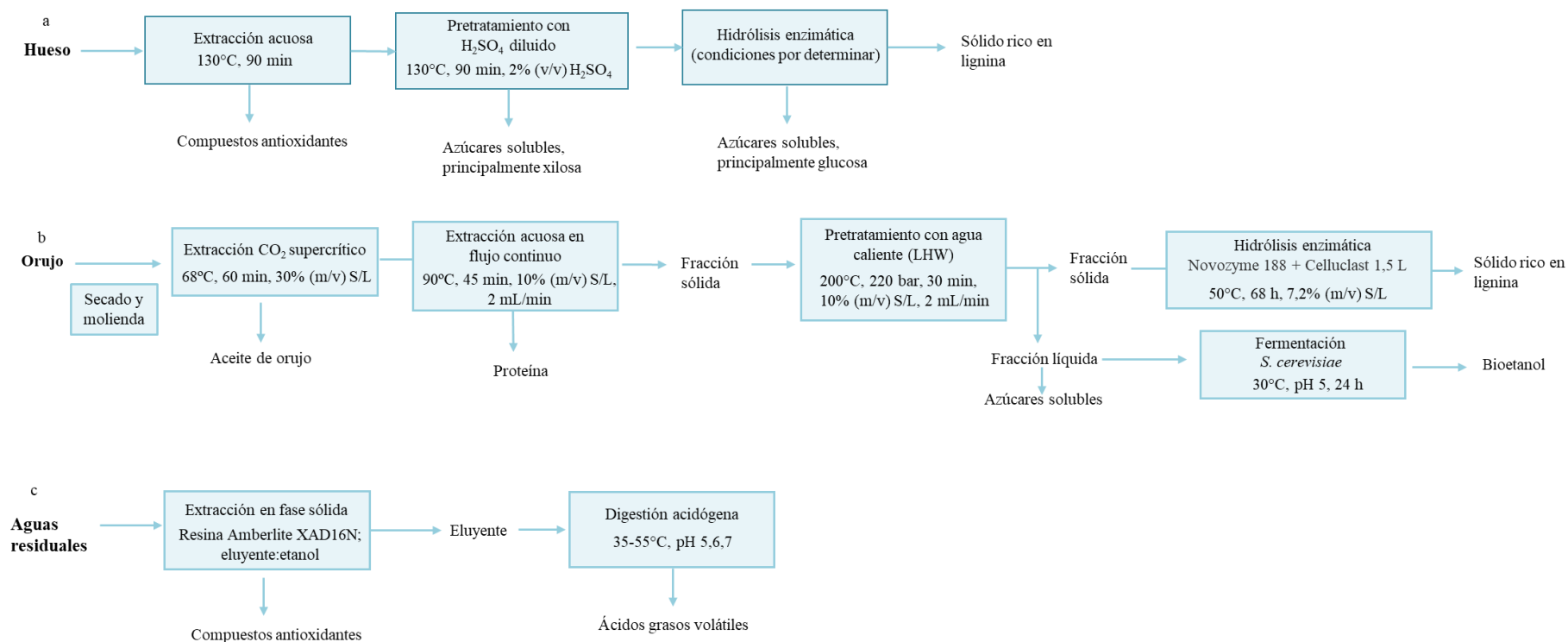


Figura 46. Esquemas de biorrefinerías propuestas a partir de hueso de aceituna, orujo y aguas de almazara. Fuente: elaboración propia.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Cada año se generan grandes cantidades de orujillo en España. Se trata de un residuo generado en las plantas de extracción de aceite de orujo de oliva que, actualmente sólo es utilizado como combustible en sus propias instalaciones, en pequeñas industrias y en calderas domésticas para la generación de calor. Se trata de un combustible barato pero, la presencia de compuestos orgánicos contaminantes en los gases generados durante su combustión limita su empleo y motiva la búsqueda de alternativas para esta biomasa residual. Así, gracias a su composición química, el orujillo puede constituir una materia prima de interés para la obtención de compuestos bioactivos con efectos beneficiosos para la salud.

La extracción de compuestos bioactivos a partir de orujillo se puede desarrollar en una primera etapa del proceso de valorización en un esquema de biorrefinería que integre la obtención de energía y otros compuestos químicos de interés industrial. De esta manera, la valorización por conversión bioquímica y el aprovechamiento de este residuo daría lugar a numerosos beneficios económicos, sociales y ambientales. Esto contribuiría a la consecución de los ODS establecidos por Naciones Unidas para el año 2030, concretamente al objetivo nº 12 “Producción y consumo responsables”.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es valorizar el orujillo mediante la obtención de compuestos bioactivos como hidroxitirosol, manitol y ácidos triterpénicos, junto con azúcares, evaluando para ello diferentes técnicas de extracción y deslignificación con organosolvente.

Para alcanzar este objetivo general, se requiere la consecución de los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar químicamente el orujillo.
2. Seleccionar los mejores disolventes para extraer compuestos bioactivos del orujillo.
3. Estudiar la extracción acuosa del orujillo evaluando la influencia de la temperatura, tiempo y carga de sólidos sobre la extracción de compuestos bioactivos.
4. Evaluar la extracción de compuestos bioactivos del orujillo con ultrasonidos de tipo baño y de tipo sonda de baja potencia, estudiando el efecto de la concentración de acetona, tiempo, carga de sólidos y amplitud.

5. Estudiar la extracción de compuestos bioactivos del orujillo con agua y con ultrasonidos de tipo sonda de alta potencia, evaluando el efecto de la amplitud, tiempo y carga de sólidos.
6. Estudiar la extracción de compuestos bioactivos a partir de orujillo mediante la tecnología de microondas empleando agua y evaluando el efecto de la temperatura, tiempo y carga de sólidos.
7. Determinar las condiciones óptimas para las diferentes técnicas de extracción ensayadas mediante la metodología de superficie de respuesta.
8. Identificar los compuestos fenólicos presentes en los extractos de orujillo obtenidos en las condiciones optimizadas para cada una de las técnicas de extracción ensayadas.
9. Estudiar la extracción de ácidos triterpénicos del orujillo mediante maceración con etanol tras la extracción previa de hidroxitirosol y manitol.
10. Evaluar la deslignificación del orujillo con organosolvente, tras la etapa de extracción, a fin de recuperar antioxidantes de la fracción de lignina, y glucosa.
11. Caracterizar químicamente las ligninas solubilizadas durante la deslignificación del orujillo con organosolvente y los sólidos ricos en lignina resultantes de la hidrólisis enzimática.
12. Purificar los compuestos bioactivos identificados en el extracto de orujillo obtenido por extracción acuosa convencional mediante separación por membranas, extracción líquido-líquido y separación con adsorbentes y resinas.

4. RESUMEN DE RESULTADOS

La presente Tesis Doctoral está constituida por las siguientes publicaciones que se reconocen en el Anexo de esta memoria:

1. Autores: Irene Gómez-Cruz, Cristóbal Cara, Inmaculada Romero, Eulogio Castro, Beatriz Gullón.
Título: Valorisation of exhausted olive pomace by an eco-friendly solvent extraction process of natural antioxidants.
Publicación: *Antioxidants*, 9, 1010 (2020).
2. Autores: Irene Gómez-Cruz, María del Mar Contreras, Florbela Carvalheiro, Luís C. Duarte, Luisa B. Roseiro, Inmaculada Romero, Eulogio Castro.
Título: Recovery of bioactive compounds from industrial exhausted olive pomace through ultrasound-assisted extraction.
Publicación: *Biology*, 10, 514 (2021).
3. Autores: Irene Gómez-Cruz, María del Mar Contreras, Inmaculada Romero, Eulogio Castro.
Título: Sequential extraction of hydroxytyrosol, mannitol and triterpenic acids using a green optimized procedure based on ultrasound.
Publicación: *Antioxidants*, 10, 1781 (2021).
4. Autores: Irene Gómez-Cruz, María del Mar Contreras, Inmaculada Romero, Eulogio Castro.
Título: Microwave-assisted water extraction of bioactive compounds and protein from exhausted olive pomace in a biorefinery context.
Publicación: enviado a *Food Science and Technology* (en revisión).
5. Autores: Irene Gómez-Cruz, María del Mar Contreras, Inmaculada Romero, Eulogio Castro.
Título: A biorefinery approach to obtain antioxidants, lignin and sugars from exhausted olive pomace.
Publicación: *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 96, 356-36 (2021).

6. Autores: Irene Gómez-Cruz, Inmaculada Romero, María del Mar Contreras, Jalel Labidi, Luisa B. Roseiro, Luís C. Duarte, Eulogio Castro, Florbela Carvalheiro.
Título: Fractionation of exhausted olive pomace by ethanol organosolv process for bioactive compounds.
Publicación: Advanced Sustainable Systems, 2100361 (2022).
7. Autores: Irene Gómez-Cruz, María del Mar Contreras, Inmaculada Romero, Luisa B. Roseiro, Luís C. Duarte, Eulogio Castro, Florbela Carvalheiro.
Título: Purification strategies of bioactive compounds from exhausted olive pomace, with a special focus on hydroxytyrosol and its separation from glucose and mannitol.
Manuscrito

La Figura 47 muestra un esquema general simplificado del trabajo experimental realizado en la presente Tesis Doctoral. Se han estudiado y comparado diferentes técnicas de extracción (convencionales y no convencionales), y deslignificación así como diferentes técnicas para la purificación de compuestos bioactivos extraídos del orujillo.

En primer lugar, se caracterizó químicamente el orujillo mediante la metodología estandarizada del NREL. Posteriormente, se evaluó el efecto de diferentes disolventes sobre orujillo peletizado a 55°C: agua, agua acidificada con ácido acético, etanol y acetona. Los resultados obtenidos mostraron que el agua era un excelente solvente de extracción para el orujillo, con resultados comparables a los conseguidos con etanol o acetona. Por ello, se profundizó en el estudio de la extracción acuosa del orujillo, y se optimizaron las principales variables de operación aplicando un diseño de experimentos Box Behnken y la metodología de superficie de respuesta (MSR) (Artículo 1).

A continuación, se estudiaron otras “tecnologías verdes” para la extracción de compuestos bioactivos del orujillo, de acuerdo con diseños de experimentos, evaluando, en cada caso, la influencia de las principales variables experimentales que fueron optimizadas por MSR. Se emplearon diferentes equipos de ultrasonidos (baño ultrasónico y ultrasonidos de tipo sonda) y disolventes (agua y disoluciones acuosas de acetona) y se ensayó con orujillo peletizado y molido. En primer lugar, se realizó una extracción sólido-líquido con orujillo molido en un baño de ultrasonidos (100 W) con mezclas acetona:agua. Seguidamente, con el objetivo de acortar el tiempo de extracción, y

partiendo de las condiciones optimizadas para la extracción con ultrasonidos de tipo baño, se empleó acetona y un equipo de ultrasonidos de tipo sonda de baja potencia (150 W) (Artículo 2). Igualmente, se llevó a cabo una extracción del orujillo peletizado mediante ultrasonidos de tipo sonda de alta potencia (550 W) empleando agua como disolvente. En este caso, el sólido obtenido tras la extracción se sometió a una maceración con etanol con el fin de recuperar otros compuestos bioactivos como son los ácidos triterpénicos (ácido maslínico y ácido oleanólico) (Artículo 3). En un posterior estudio, y empleando agua como disolvente, se realizó una extracción del orujillo molido mediante la tecnología de microondas seguida de una maceración con etanol para recuperar ácidos triterpénicos (Artículo 4). Todos los extractos obtenidos se caracterizaron mediante diferentes técnicas analíticas, y los sólidos de orujillo extraídos se caracterizaron químicamente y, en algunos casos, mediante microscopía electrónica de barrido.

En posteriores estudios, se completó el proceso de valorización del orujillo ensayando diferentes estrategias de extracción convencional e implementando una etapa de deslignificación posterior a fin de recuperar compuestos bioactivos de la fracción de lignina y facilitar la sacarificación enzimática de la celulosa. Así, para una valorización integral del orujillo mediante un esquema de biorrefinería se ensayaron dos estrategias de proceso. Ambas estrategias se basaron en una extracción de compuestos fenólicos (en una o dos etapas), seguida de una etapa de deslignificación del orujillo extraído, y una posterior hidrólisis enzimática del orujillo deslignificado.

En una primera estrategia (Estrategia 1), se aplicó una extracción acuosa, en condiciones previamente optimizadas, al orujillo peletizado (Artículo 1), y se ensayaron diferentes técnicas de deslignificación sobre el sólido extraído resultante (organosolvente con etanol al 50% y 60% a distintas temperaturas) (Artículo 5) (Figura 48). A la vista de los resultados obtenidos en dicho estudio, se planteó una segunda estrategia (Estrategia 2) para valorizar el orujillo mediante una extracción en dos etapas seguida de una deslignificación con etanol al 50% a distintas temperaturas. Como primera etapa de extracción, se mantuvo la extracción acuosa previamente optimizada y en la segunda etapa de extracción, se evaluó el empleo de agua o una disolución de acetona al 70% (v/v) (Artículo 6) (Figura 49). En ambas estrategias, el orujillo extraído y deslignificado fue hidrolizado enzimáticamente, y tanto las ligninas resultantes de dicha hidrólisis como las solubilizadas en los tratamientos con organosolvente fueron caracterizadas mediante diversas técnicas analíticas.

En un último estudio, el extracto acuoso obtenido tras la extracción acuosa convencional en condiciones optimizadas fue seleccionado para evaluar la purificación de compuestos fenólicos, fundamentalmente hidroxitirosol, y manitol. Para ello se ensayaron técnicas de separación con membranas, extracción líquido-líquido y separación con adsorbentes y resinas de diferente naturaleza (Artículo 7).

Cabe destacar que, parte del trabajo experimental correspondiente a la extracción del orujillo con ultrasonidos y acetona (Artículo 2), así como la Estrategia 2 de proceso (Artículo 6) y la purificación de extractos (Artículo 7), se llevó a cabo durante la estancia de investigación realizada en el Laboratorio Nacional de Energía y Geología (LNEG) en Lisboa (Portugal), efectuada desde el día 10 de enero 2020 al 18 de marzo de 2020 y desde el 10 de octubre de 2020 hasta el 15 de noviembre de 2020. Dichas actividades fueron supervisadas por la Dra. Florbela Carvalheiro, el Dr. Luís C. Duarte, y la Dra. Luisa B. Roseiro.

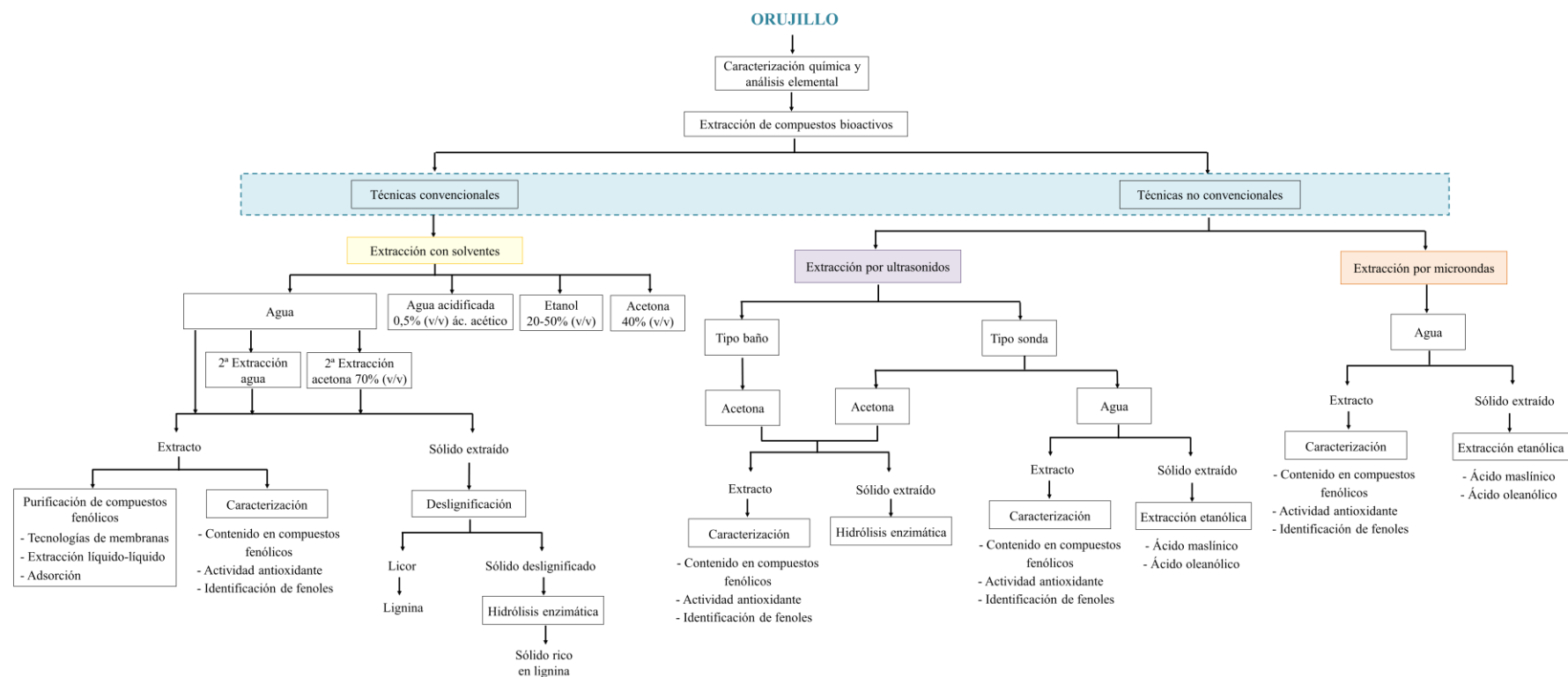


Figura 47. Esquema simplificado del procedimiento experimental.

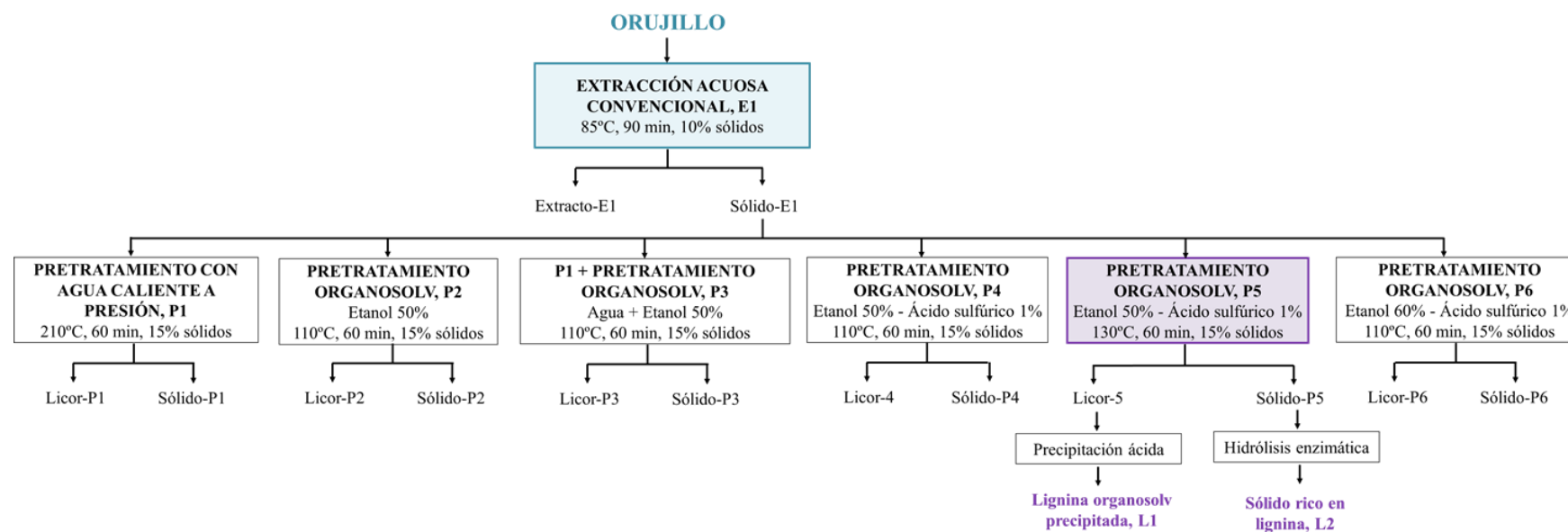


Figura 48. Estrategia 1 de proceso: extracción acuosa del orujillo, en una etapa, seguida de pretratamientos de deslignificación, recuperación de lignina solubilizada e hidrólisis enzimática del sólido pretratado.

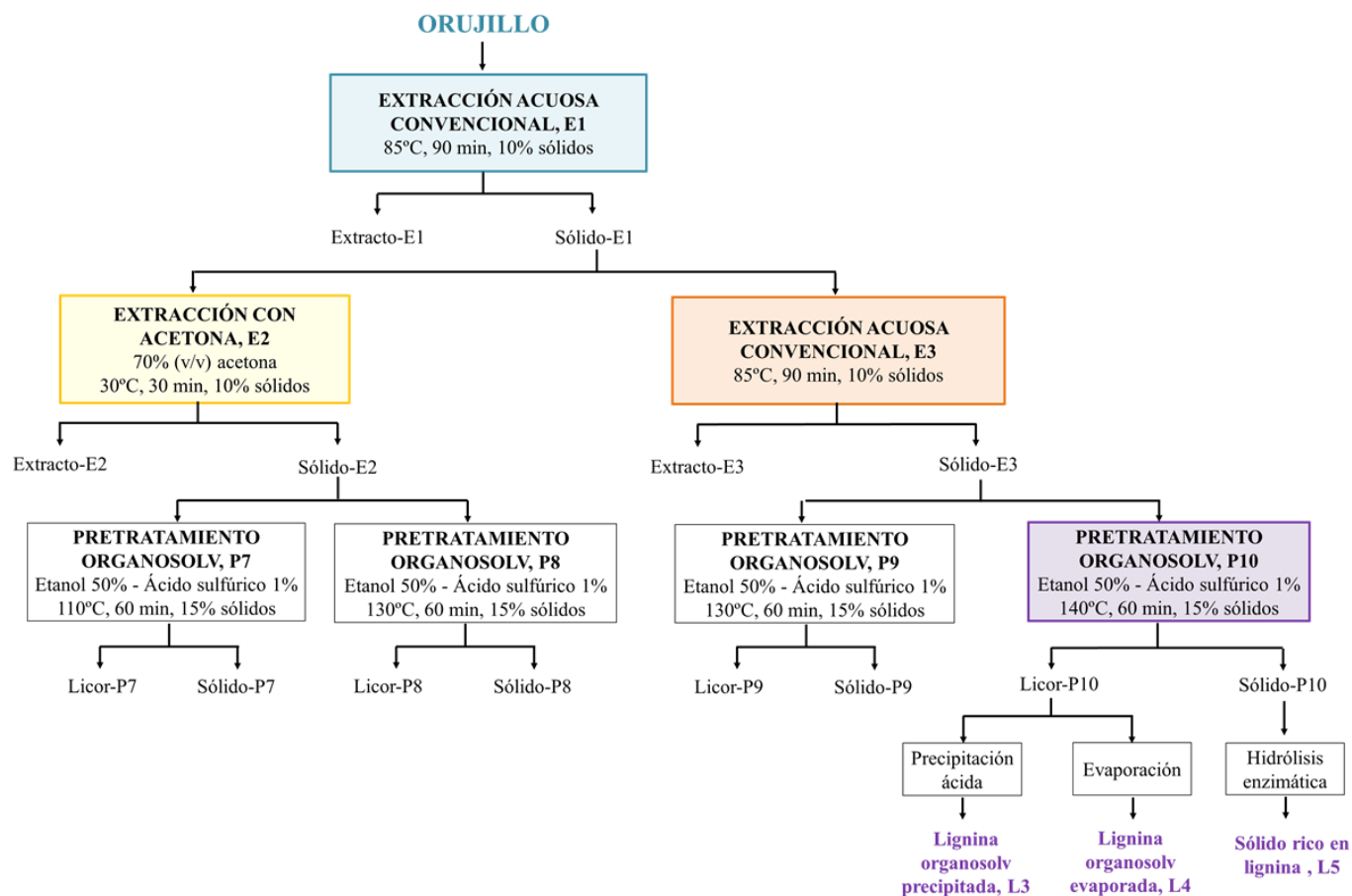


Figura 49. Estrategia 2 de proceso: extracción acuosa del orujillo, en dos etapas, seguida de pretratamientos de deslignificación, recuperación de lignina solubilizada e hidrólisis enzimática del sólido pretratado.

4.1. Caracterización química de la materia prima

El orujillo se adquirió peletizado en una planta de extracción de aceite de orujo de aceituna, “Espuny SA” (Castellar, Jaén, España). Los pellets de orujillo presentaban una longitud media de 14,5 mm, un diámetro medio de 4,6 mm y un contenido en humedad de alrededor de 6,5% (m/m, en base húmeda). Para llevar a cabo la caracterización y algunas extracciones, una parte de la biomasa se molturó a un tamaño inferior a 1 mm con un molino ultracentrífugo ZM 200 (Retsch, Haan, Alemania).

La caracterización del orujillo se realizó siguiendo el procedimiento de análisis de biomasa propuesto por NREL descrito en la Figura 50, y también se llevó a cabo el análisis elemental determinando su contenido en hidrógeno, carbono, nitrógeno y azufre.

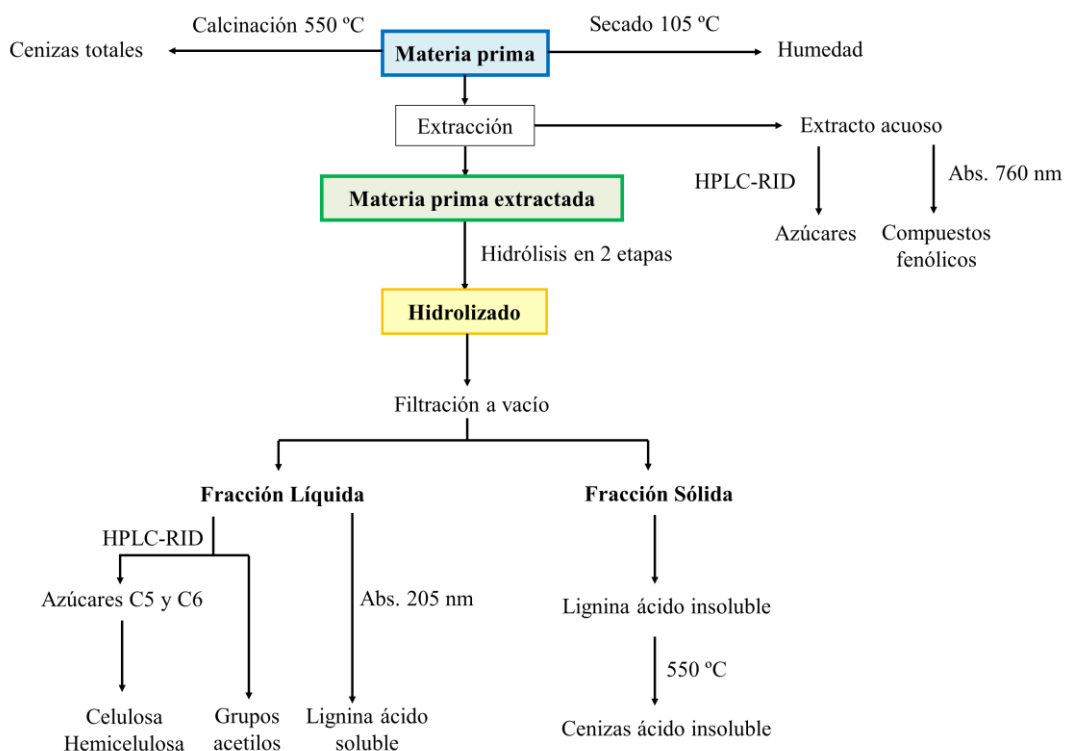


Figura 50. Procedimiento de caracterización del orujillo de acuerdo al protocolo NREL.

De acuerdo con esta metodología, en primer lugar, se determinó el contenido de humedad (a 105°C, 24 h) y cenizas (a 550°C, 4 h) de la biomasa. Posteriormente, el contenido en extractivos (componentes no estructurales y solubles de la biomasa) se determinó mediante el análisis gravimétrico de la biomasa obtenida tras una extracción Soxhlet en dos etapas; una primera etapa con agua y una segunda extracción con etanol al 96%. Esta doble extracción, previa al análisis del resto de los componentes de la materia prima, tiene como objetivo evitar interferencias cuando la biomasa tiene un elevado contenido en extractivos, como ocurre en el caso del orujillo. El contenido de compuestos fenólicos totales se cuantificó en el extracto acuoso mediante el método colorimétrico Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965).

El sólido extraído se hidrolizó mediante una hidrólisis ácida en dos etapas, primero con ácido concentrado (72%, v/v, H₂SO₄) y después diluido (3-4%, v/v, H₂SO₄), con el fin de solubilizar todos los carbohidratos estructurales y determinar su contenido. Los hidrolizados obtenidos se analizaron por HPLC con un detector de índice de refracción (RID), determinando así las concentraciones de monómeros (glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa). La glucosa obtenida se considera celulosa y los demás azúcares se cuantifican como hemicelulosa. También se cuantificó el contenido de azúcares solubles

en el extracto acuoso y de grupos acetilos en el hidrolizado mediante HPLC-RID. El contenido en lignina ácido soluble se determinó mediante espectrofotometría a 205 nm. Finalmente, a partir del sólido resultante de la hidrólisis ácida en dos etapas y por gravimetría, se determinó el contenido en lignina ácido insoluble y, tras la calcinación a 550°C, las cenizas ácido insolubles.

En la Tabla 16 se muestra la composición del orujillo empleado como materia prima en la presente Tesis Doctoral.

Tabla 16. Composición química y análisis elemental (% peso seco) del orujillo.

Componentes	% peso seco
Extractivos	41,78 ± 1,85
Extractivos acuosos	37,94 ± 1,89
Glucosa	1,77 ± 0,06
Manitol	4,49 ± 0,10
Fenoles	5,15 ± 1,07
Extractivos etanólicos	3,83 ± 0,16
Celulosa	9,67 ± 0,84
Hemicelulosa	10,94 ± 0,53
Xilosa	9,79 ± 0,53
Galactosa	0,31 ± 0,01
Arabinosa	1,82 ± 0,03
Manosa	0,42 ± 0,02
Grupos acetilos	1,51 ± 0,17
Lignina	21,82 ± 0,89
Lignina ácido insoluble	20,29 ± 0,68
Lignina ácido soluble	1,54 ± 0,47
Cenizas	6,41 ± 0,21
Análisis elemental	
Carbono	42,42 ± 0,24
Nitrógeno	1,31 ± 0,06
Hidrógeno	5,55 ± 0,08
Azufre	ND

N.D., no detectado.

El componente mayoritario en el orujillo son los extractivos, 41,8% (m/m), de los cuales, más del 90% corresponden a compuestos extraíbles con agua y el resto son solubles en etanol. El contenido en extractivos del orujillo resulta elevado si se compara con otras biomásas de naturaleza lignocelulósica, como la paja de trigo con un contenido de 14,7% (m/m) (Pérez et al., 2007), el bagazo de caña de azúcar con 9,2% (m/m) (Krishnan et al., 2010) o la madera de eucalipto con 2,9% (m/m) (Romaní et al., 2019). No obstante, otras biomásas del olivo como el hojín (Gullón et al., 2018) o la poda de olivo (Martínez-Patiño et al., 2017b) presentan también un alto porcentaje de extractivos, superior al 23% (m/m).

Además, el orujillo se compone de 20,6% de carbohidratos estructurales, 21,8% de lignina y 6,4% de cenizas. La xilosa es el principal monómero de la fracción de hemicelulosa, con un porcentaje similar al de glucosa, 9,8% y 9,7%, respectivamente. El porcentaje relativamente alto de lignina es consistente con los resultados descritos para otras biomasas del olivo, tal y como se aprecia en la Figura 51, que muestra una comparativa de la composición química de diferentes residuos y subproductos del olivo y sus industrias asociadas.

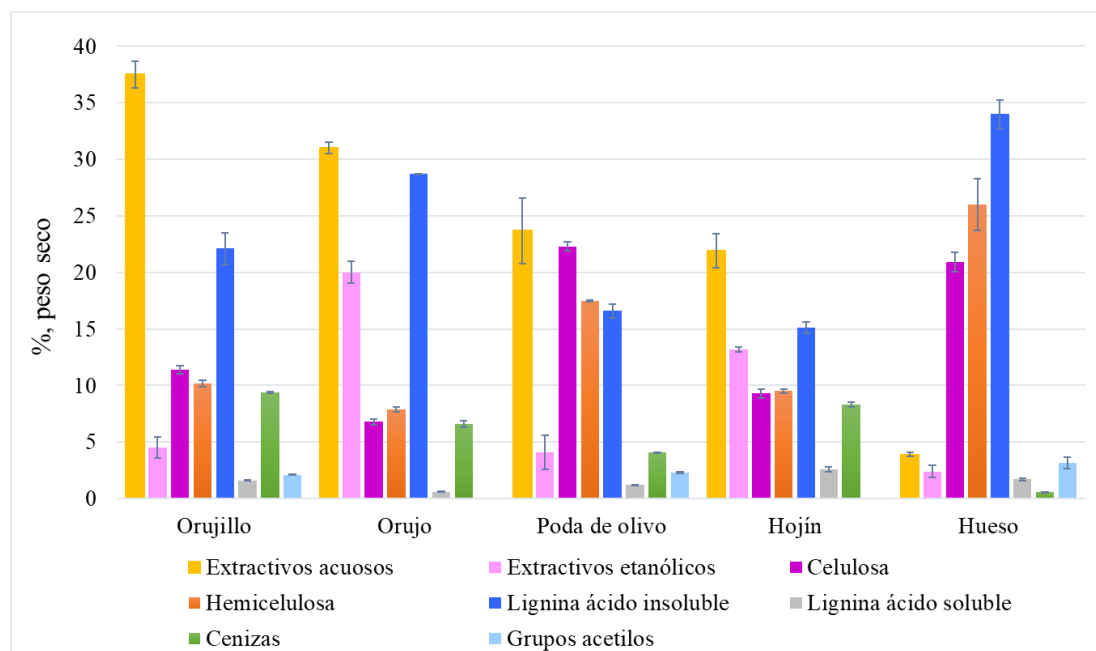


Figura 51. Composición química del orujillo, orujo, poda de olivo, hojín y hueso (adaptado de Manzanares et al., 2017; Manzanares et al., 2020; Negro et al., 2017; Padilla-Rascón et al., 2021; Rodríguez et al., 2007).

Estos datos ponen de manifiesto que, en el caso del orujillo el aprovechamiento de la fracción de extractivos es de interés dado su alto porcentaje y porque contienen compuestos bioactivos como el hidroxitirosol y el manitol. Además, su extracción es compatible con otras estrategias de aprovechamiento como la bioconversión de la fracción lignocelulósica en biocombustibles y bioproductos (Doménech et al., 2021).

4.2. Extracción de compuestos bioactivos: técnicas convencionales y no convencionales

En los extractivos de orujillo se ha descrito la presencia de compuestos fenólicos principalmente hidroxitirosol, y también manitol (Domenech et al., 2021). La extracción de compuestos bioactivos a partir del orujillo se puede plantear como una etapa previa a otras dirigidas a obtención de azúcares y derivados de valor añadido o para su uso como combustible. En la presente Tesis Doctoral, se han ensayado diferentes disolventes en una extracción convencional, y posteriormente se han evaluado diferentes tecnologías de extracción, convencionales y no convencionales. Además, se ha estudiado la influencia de los principales parámetros de operación, en cada una de ellas, optimizándolos mediante la metodología de superficie de respuesta.

4.2.1. Selección de disolvente

Uno de los factores más importantes a la hora de recuperar compuestos bioactivos es el disolvente empleado ya que su polaridad influye directamente en los solutos extraídos (Bonifácio-Lopes et al., 2019; Lefebvre et al., 2021). Así, la obtención de compuestos fenólicos del orujillo peletizado comenzó evaluando la extracción con diferentes disolventes. En un primer estudio se comparó el agua con agua acidificada con ácido acético 0,5% (v/v), y con otros disolventes orgánicos como acetona 50% (v/v) y disoluciones de etanol al 20% y 50% (v/v) (Artículo 1). Los resultados de rendimiento, contenido en compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los diferentes extractos se recogen en la Tabla 17. Se observa que tanto el rendimiento como las propiedades antioxidantes del extracto acuoso fueron similares a las de los extractos orgánicos. Así,

la extracción del orujillo con agua a 55°C, con un rendimiento del 37,5%, permitió obtener un extracto con un contenido en compuestos fenólicos totales de 38,1 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g orujillo y una actividad antioxidante por FRAP y ABTS de 39,9 y 70,7 mg equivalentes de trolox (TE)/g orujillo, respectivamente. Así, este estudio preliminar puso de manifiesto que la extracción con agua se puede emplear como una alternativa verde a la extracción con disolventes orgánicos para recuperar compuestos antioxidantes del orujillo, con resultados similares.

Tabla 17. Rendimiento de extracción, contenido total de compuestos fenólicos (TPC) y capacidad antioxidante a 55°C durante 90 min y 15% de sólidos.

Disolvente	Rendimiento de extracción (%)	TPC (mg GAE/g orujillo)	FRAP ^a (mg TE/g orujillo)	ABTS ^a (mg TE/g orujillo)
Agua	37,5 ± 0,2	38,1 ± 1,3	39,9 ± 1,4	70,7 ± 3,9
Agua acidificada	40,3 ± 1,5	29,7 ± 0,9	33,9 ± 1,8	57,1 ± 7,5
Etanol 50%	39,3 ± 0,5	39,5 ± 2,4	41,5 ± 1,5	62,9 ± 5,4
Etanol 20%	35,0 ± 1,0	34,6 ± 1,9	38,1 ± 1,0	64,2 ± 4,7
Acetona 50%	41,0 ± 0,3	41,6 ± 1,8	46,2 ± 1,8	63,5 ± 4,1

GAE, Equivalentes de ácido gálico; TE, Equivalentes de trolox; ^aActividad antioxidante.

No obstante, dado que con acetona 50% también se obtuvieron buenos resultados, en un estudio posterior se empleó este disolvente en la extracción con ultrasonidos y se optimizó su concentración para maximizar la extracción de compuestos fenólicos con esta tecnología (Artículo 2). La acetona se seleccionó debido a su baja toxicidad y por estar autorizada por la EFSA para la formulación de alimentos funcionales y por el Real Decreto 1101/2011 por el que se aprueba la lista de disolventes de extracción aptos para la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes.

4.2.2. Optimización de las condiciones de extracción

A la vista de los resultados satisfactorios conseguidos con la extracción acuosa del orujillo, se profundizó en su estudio junto con otras tecnologías verdes. Así, con el objetivo de llevar a cabo un proceso sostenible con el menor impacto posible para el medio ambiente y la salud, la presente Tesis Doctoral se centró, principalmente, en el empleo de agua como disolvente “verde” (Artículos 1, 3 y 4) y disoluciones acuosas de acetona (Artículo 2). En la Tabla 18 se resumen las tecnologías de extracción aplicadas

al orujillo, las variables estudiadas, sus rangos, las condiciones optimizadas para cada técnica y el artículo que recoge cada tipo de extracción.

Tabla 18. Variables de operación empleadas en las diferentes técnicas de extracción y condiciones optimizadas.

Equipo	Tipo de orujillo	Disolvente (% v/v)	Condiciones de operación	Condiciones optimizadas	Artículo
Extracción convencional					
Baño de agua	Peletizado	Agua	<i>Diseño Box-Behnken</i> T: 25-85°C t: 30-90 min 5-25% (m/v) sólidos	85°C, 90 min, 10% (m/v) sólidos	1
Extracción asistida por ultrasonidos					
Baño (100 W)	Molido	Acetona	<i>Diseño Box-Behnken</i> C _A : 20-80% (v/v) t: 10-60 min 2-15% (m/v) sólidos	40% acetona, 43 min, 8,6% (m/v) sólidos	2
Sonda (150 W)	Molido	Acetona	40% acetona, 8,6% (m/v) sólidos <i>Diseño Factorial 2×2</i> t: 2-12 min Amplitud: 30-70%	12 min, 70% amplitud	2
Sonda (550 W)	Peletizado	Agua	<i>Diseño Box-Behnken</i> t: 2-18 min 2-15% (m/v) sólidos Amplitud: 20-80%	16 min, 11,5% (m/v) sólidos, 80% amplitud	3
Extracción asistida por microondas					
Monomodo	Molido	Agua	<i>Diseño Box-Behnken</i> T: 40-100°C t: 4-40 min 3-15% (m/v) sólidos	100°C, 16 min, 12% (m/v) sólidos	4

C_A: concentración de acetona; T: Temperatura; t: tiempo.

En primer lugar, se estudió la extracción acuosa del orujillo peletizado evaluando la influencia de la temperatura (25-85°C), el tiempo (30-90 min) y la carga de sólidos (5-25% sólidos) (Artículo 1). Seguidamente, se llevó a cabo una extracción en baño de ultrasonidos con mezclas agua:acetona (20-80%) y se estudió también el efecto del tiempo de extracción (10-60 min) y la carga de sólidos (2-15%), y se observó que la molienda de los pellets de orujillo (1 mm) favorecía la extracción de compuestos fenólicos. La carga de sólido y la concentración de acetona optimizadas en la extracción con baño ultrasónico se fijaron en 8,6% (m/v) y 40% (v/v), respectivamente, al llevar a cabo la extracción en un equipo de ultrasonidos tipo sonda de baja potencia (150 W) en la que se evaluó la influencia del tiempo (2-12 min) y la amplitud (30-70%) (Artículo 2).

A continuación, se realizó una extracción secuencial del orujillo para obtener compuestos fenólicos, manitol y ácidos triterpénicos. En primer lugar, se extrajeron compuestos fenólicos y manitol mediante una extracción por ultrasonidos de tipo sonda de alta potencia (550 W) (Artículo 3) y por microondas (Artículo 4) a orujillo peletizado y molido, respectivamente, empleando en ambos casos agua como agente de extracción. A continuación, se realizó una maceración con etanol para recuperar ácidos triterpénicos bioactivos del sólido de orujillo extraído previamente.

Para llevar a cabo estos estudios, tras cada ensayo de extracción, la mezcla obtenida se filtró a vacío obteniéndose una fracción líquida (extracto) y una fracción sólida (sólido de orujillo extraído) (Figura 52). Los extractos se filtraron a través de filtros de jeringa (nylon, tamaño de poro de 0,45 μm) y se conservaron a -18°C hasta su posterior análisis.

Todas estas técnicas se llevaron a cabo de acuerdo a un diseño de experimentos aplicando la metodología de superficie de respuesta. Esto permite evaluar cómo afectan las variables de operación mediante modelos matemáticos y permite determinar las condiciones de optimización (Tabla 18), con un número reducido de experimentos. Las variables de respuesta estudiadas fueron: rendimiento de extracción, concentración y contenido fenólico, concentración y contenido en hidroxitirosol y/o actividad antioxidante del extracto. En el estudio de la extracción con ultrasonidos de tipo sonda de alta potencia (Artículo 3) y la extracción con microondas (Artículo 4), empleando agua como disolvente en ambos casos, se consideró también la concentración y el contenido en manitol del extracto como variables de respuesta. Así, se obtuvieron modelos lineales y polinómicos de segundo orden para establecer la relación entre dichas respuestas y las variables de operación estudiadas: carga de sólido, tiempo de extracción, temperatura, potencia de ultrasonidos y/o concentración de acetona, dependiendo de la tecnología empleada (Artículo 4). Las ecuaciones obtenidas fueron:

Modelo lineal

$$y_j = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum \sum_{i < j=1}^3 \beta_{ij} x_i x_j \quad ,$$

Modelo polinómico:

$$y_j = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum \sum_{i < j=1}^3 \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 \quad ,$$

donde y es la variable de respuesta, x_i y x_j son las variables operativas en valores codificados que van de -1 a 1, β_0 , β_i , β_{ij} y β_{ii} son los coeficientes de regresión calculados a partir de los resultados experimentales por el método de mínimos cuadrados. La validez de los modelos de superficie de respuesta se determinó evaluando que no hubiera falta de ajuste ($p > 0,05$), que tuvieran un coeficiente de determinación $R^2 > 0,85$ y un valor de $p < 0,05$ en el análisis de varianza.

A continuación, se analizó el perfil fenólico de los extractos obtenidos en condiciones optimizadas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector de Diodo Array (DAD) que permitió la caracterización del hidroxitirosol por comparación con su estándar comercial a través del tiempo de retención y del espectro de absorción UV-Vis en el rango de 190-600 nm. También, se caracterizaron los compuestos fenólicos por electroforesis en zona capilar (CZE)-DAD mediante la comparación del tiempo de migración y los espectros UV con estándares disponibles en la base de datos del equipo. Los compuestos fenólicos minoritarios se caracterizaron mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas (MS). Finalmente, mediante HPLC acoplada a un detector de índice de refracción (RID) se determinó el contenido en glucosa y manitol de los extractos.

Los extractos obtenidos tras la maceración con etanol también se filtraron con filtros de 0,45 μm para determinar el rendimiento de extracción, identificar y cuantificar su contenido en los principales ácidos triterpénicos (ácido maslínico y ácido oleanólico) mediante HPLC-DAD (a 210 nm) y el método de estandarización externa.

Finalmente, se determinó la composición química y elemental de los sólidos de orujillo extraído en las condiciones optimizadas para cada técnica de extracción, siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 4.1. Esto permitió determinar el contenido de estos sólidos en azúcares poliméricos y lignina para su valorización en etapas posteriores a la extracción en un esquema de biorrefinería basado en el orujillo como materia prima. Estos sólidos extraídos también se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para visualizar los cambios estructurales que las técnicas de ultrasonidos y microondas producen en el material vegetal.

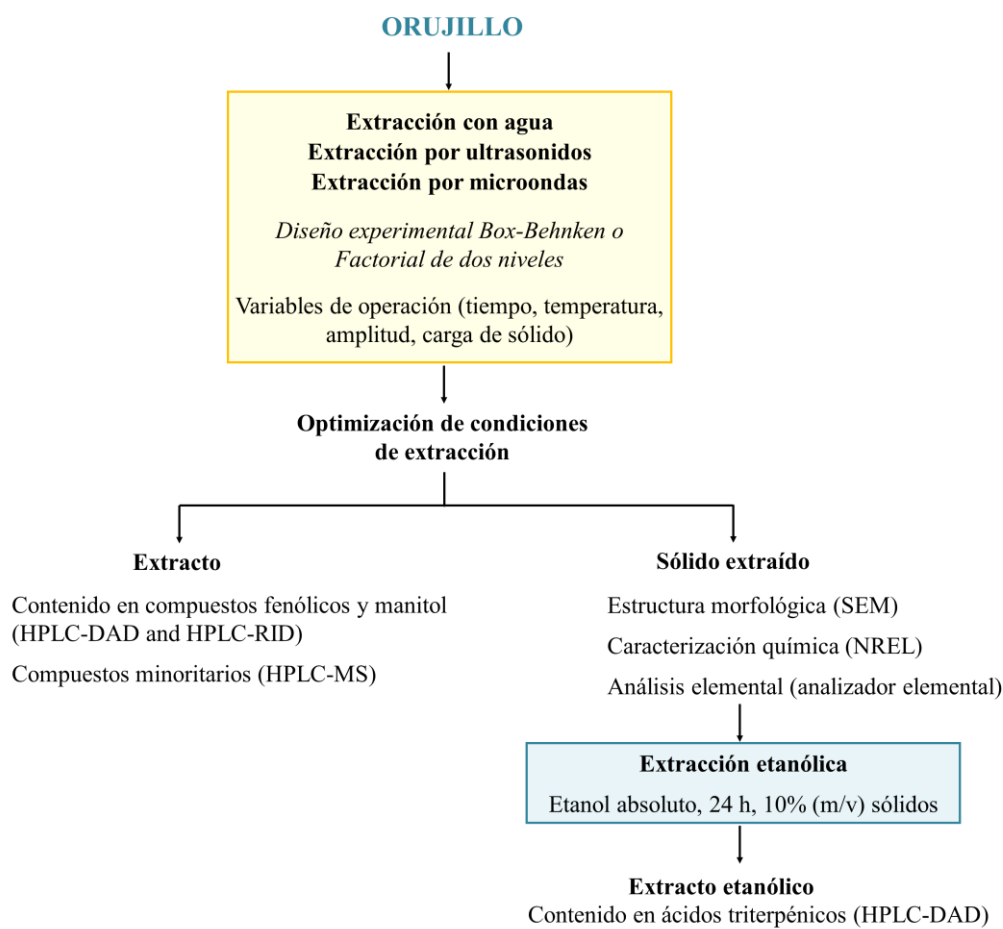


Figura 52. Esquema del procedimiento experimental y técnicas de caracterización.

4.2.3. Extractos de orujillo

4.2.3.1. Rendimiento de extracción y contenido en compuestos fenólicos

Los extractos líquidos obtenidos en las diferentes técnicas y condiciones aplicadas al orujillo fueron caracterizados. La Tabla 19 muestra los valores de rendimiento de extracción, contenido total de compuestos fenólicos y el contenido en hidroxitirosol determinados en los diferentes extractos obtenidos en cada tecnología (Tabla 18).

El rendimiento de extracción representa el porcentaje de orujillo que se ha solubilizado en el disolvente durante la extracción. En este trabajo, cuando se realizó una etapa única de extracción, los rendimientos oscilaron entre 39,2% (microondas) y 56,8% (ultrasonidos de tipo sonda) (Tabla 19). El valor más elevado se obtuvo cuando se extrajo el orujillo en ultrasonidos de tipo sonda de baja potencia y empleando acetona como disolvente. Según Lavilla y Bendicho (2017) el empleo de sondas provoca una mejora en el rendimiento con respecto a los baños ultrasónicos, debido a que la radiación se

transmite directamente al medio. En este caso, el mayor rendimiento de extracción comparado con las otras tecnologías también puede atribuirse al efecto combinado de varios factores como puede ser el disolvente empleado (acetona 40%), el efecto del ultrasonido y la temperatura, la carga de sólido, etc. (Wen et al., 2018). Según Chemat et al. (2017) los rendimientos de extracción con esta tecnología pueden llegar a incrementarse un 5% con respecto a una maceración convencional. Alternativamente, el valor más bajo de rendimiento se obtuvo con la extracción por microondas (39,2%), indicando que esta tecnología fue menos eficiente. Por otra parte, cuando se realizaron dos etapas de extracción con solvente, la segunda etapa, con agua o con acetona, ofreció un menor rendimiento de extracción en ambos casos, 11%, mientras que, en la primera etapa, se extrajo la mayor parte del material soluble del orujillo (40,9%).

Los valores de TPC oscilaron entre 34,5 mg GAE/g orujillo en la extracción por microondas y alrededor de 45 mg GAE/g orujillo en una etapa de extracción acuosa y en la extracción con ultrasonidos de baja potencia con acetona. (Tabla 19). Cabe decir, que esta última técnica de extracción, además de alcanzar el valor máximo, permitió acortar el tiempo de extracción (12 min) si se compara con la extracción acuosa convencional (90 min). La extracción por microondas también acortó el tiempo de extracción (16 min), pero la eficiencia fue menor que la extracción acuosa, al igual que ocurría con el rendimiento de extracción.

Por otra parte, como era de esperar, se obtuvieron valores más bajos de TPC en la segunda etapa de extracción acuosa y con acetona, ya que la mayor recuperación de los compuestos fenólicos ocurre en la primera etapa (44,5 mg GAE/g orujillo).

En cuanto al contenido en hidroxitirosol, se solubilizó una mayor cantidad cuando se empleó agua como disolvente, aplicando la extracción acuosa convencional (6,3 mg/g orujillo) y ultrasonidos de sonda de alta potencia (6,4 mg/g orujillo). Esto puede deberse al carácter polar del hidroxitirosol cuya extracción se ve favorecida cuando se emplea agua en vez de disoluciones de acetona, que son menos polares (Musa et al., 2010). Cabe destacar, que en este caso se pudo extraer directamente el orujillo peletizado obtenido industrialmente sin necesidad de una molienda previa, evitando así el coste energético/económico que supone dicha etapa (Sharayei et al., 2019). Además, esos extractos presentaron una elevada pureza (15,4 y 13,6 mg/g extracto, respectivamente).

Comparando con otras biomasas del olivar, los valores de hidroxitirosol determinados en los extractos de orujillo en la presente Tesis Doctoral fueron comparables a los obtenidos para el orujo de aceituna (5,1-6,3 mg/g extracto seco) (Ribeiro et al., 2020) y la poda de olivo (8,0 mg/g peso seco extracto) (Doménech et al., 2021), y superiores a los obtenidos con el hueso de aceituna (3,1 mg/g extracto seco) (Tabla 10).

En resumen, empleando ultrasonidos de sonda de alta potencia y agua como disolvente, se pueden obtener extractos ricos en hidroxitirosol con tiempos cortos de extracción empleando directamente orujillo peletizado como materia prima. En cualquier caso, la extracción acuosa con calentamiento en baño, con resultados similares, también es una alternativa de interés que además se podría escalar fácilmente.

Tabla 19. Rendimiento de extracción, contenido en compuestos fenólicos (TPC) e hidroxitirosol (HT) de los extractos de orujillo obtenidos con diferentes tecnologías.

Método de extracción	Rendimiento (%)	TPC		HT	
		(mg GAE/g orujillo)	(mg GAE/g extracto)	(mg/g orujillo)	(mg/g extracto)
Extracción con solventes					
Extracción acuosa ^a (1ª etapa)	40,9 ± 0,5	44,5 ± 0,3	108,8 ± 0,6	6,3 ± 0,2	15,4 ± 0,5
Extracción acuosa ^a (2ª etapa)	11,0 ± 0,2	11,8 ± 0,2	108,3 ± 1,5	1,7 ± 0,9	15,4 ± 0,9
Extracción con acetona 70% ^a (2ª etapa)	10,8 ± 0,3	13,1 ± 0,8	121,4 ± 1,9	N.D.	N.D.
Ultrasonidos baño/acetona 40% ^b	47,3 ± 0,8	42,1 ± 0,6	88,9 ± 1,2	5,2 ± 0,1	10,9 ± 0,2
Ultrasonidos sonda (baja potencia)/acetona 40% ^b	56,8 ± 3,6	45,4 ± 3,2	79,9 ± 5,6	4,9 ± 0,0	8,7 ± 0,1
Ultrasonidos sonda (alta potencia)/agua ^a	47,1 ± 0,5	40,0 ± 0,3	84,9 ± 0,7	6,4 ± 0,3	13,6 ± 0,6
Ultrasonidos sonda (alta potencia)/agua ^b	43,6 ± 0,0	38,4 ± 0,5	88,1 ± 1,2	6,2 ± 0,1	14,2 ± 0,2
Microondas/agua ^b	39,2 ± 2,4	34,5 ± 1,4	88,1 ± 3,5	5,9 ± 0,3	15,0 ± 0,7

N.D., no determinado; GAE, Equivalentes de ácido gálico; ^aOrujillo peletizado; ^bOrujillo molido.

4.2.3.2. Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos de orujillo obtenidos en las mejores condiciones para cada técnica se muestra en la Tabla 20. A diferencia de lo que ocurre con la extracción de TPC e hidroxitirosol, los valores más altos de actividad antioxidante, determinados tanto por el método FRAP como ABTS, referidos a orujillo, se alcanzaron en las extracciones con ultrasonidos cuando se empleó acetona como disolvente, en las dos modalidades ensayadas (baño ultrasónico y sonda de baja potencia). El resto de métodos presentaron valores ligeramente más bajos cuando se refirió a peso de orujillo, aunque similares entre ellos. Vale la pena destacar, cómo en el caso de las extracciones secuenciales, las segundas etapas, tanto con agua como con acetona, alcanzaron valores elevados de capacidad antioxidante, referidos a extracto, lo que indica que son extractos de mayor pureza, que era el objetivo de la segunda etapa de extracción.

Aunque el hidroxitirosol es el principal compuesto antioxidante presente en los extractos de orujillo, los resultados obtenidos sugieren que su composición fenólica minoritaria también contribuye a sus propiedades antioxidantes ya que pueden presentar efectos sinérgicos, como se ha observado en extractos de hoja de olivo (Benavente-García et al., 2002). Así, los valores de correlación entre el contenido de hidroxitirosol solubilizado y la actividad antioxidante fue de 0,668 cuando se aplicó el test de correlación de Pearson. Sin embargo, el valor de r obtenido para el TPC y la actividad antioxidante era mayor de 0,905. Para conocer con detalle la composición de los extractos, estos se caracterizaron mediante diversas técnicas analíticas.

Tabla 20. Capacidad antioxidante de los extractos de orujillo obtenidos en las diferentes extracciones.

Método de extracción	FRAP		ABTS	
	(mg TE/ g orujillo)	(mg TE/ g extracto)	(mg TE/ g orujillo)	(mg TE/ g extracto)
Extracción con solventes				
Extracción acuosa ^a (1ª etapa)	47,6 ± 0,2	116,4 ± 0,6	95,4 ± 0,7	233,3 ± 1,8
Extracción acuosa ^a (2ª etapa)	16,7 ± 0,1	153,5 ± 1,1	24,9 ± 0,4	228,4 ± 3,2
Extracción con acetona 70% ^a (2ª etapa)	14,3 ± 0,3	130,4 ± 1,8	25,1 ± 1,8	232,4 ± 2,2
Ultrasonidos baño/ acetona 40% ^b	61,1 ± 2,2	129,1 ± 4,7	135,0 ± 1,4	285,3 ± 2,9
Ultrasonidos sonda (baja potencia)/acetona 40% ^b	68,1 ± 4,3	119,9 ± 7,6	140,7 ± 4,6	247,7 ± 6,4
Ultrasonidos sonda (alta potencia)/agua ^a	50,9 ± 2,6	108,1 ± 5,4	100,6 ± 1,4	224,5 ± 2,9
Ultrasonidos sonda (alta potencia)/agua ^b	49,9 ± 1,3	114,4 ± 2,9	95,6 ± 1,3	219,0 ± 3,0
Microondas/agua ^b	45,4 ± 2,1	115,8 ± 5,3	98,8 ± 1,5	252,3 ± 3,9

TE, Equivalentes de trolox. ^aOrujillo peletizado; ^bOrujillo molido.

4.2.3.3. Perfil fenólico de los extractos

Los extractos de orujillo obtenidos para las diferentes técnicas empleadas también se caracterizaron para determinar su perfil fenólico mediante HPLC-DAD a 280 nm. Como ejemplo, la Figura 53a muestra el cromatograma del extracto acuoso de orujillo obtenido mediante extracción convencional a 85°C, 90 min y 10% de sólidos. En el perfil fenólico determinado se observa que este extracto, al igual que el resto de extractos obtenidos, presentaba principalmente hidroxitirosol y otros compuestos minoritarios.

Este mismo extracto fue analizado por CZE y el electroferograma obtenido a 200 nm muestra también la presencia destacada del hidroxitirosol como compuesto principal del extracto. Entre 4 y 10 minutos, se encontró la mayor correspondencia con los estándares disponibles en la base de datos, siendo posible caracterizar, además de hidroxitirosol: tirosol, catecol, pinosinol, ácido vainillico y 3-fenilfenol con una coincidencia superior al 91% (Figura 53b). Estos dos análisis complementarios revelan el gran potencial de los extractos de orujillo como fuente natural, renovable y de bajo coste, de hidroxitirosol, alternativa a las hojas de olivo y el orujo.

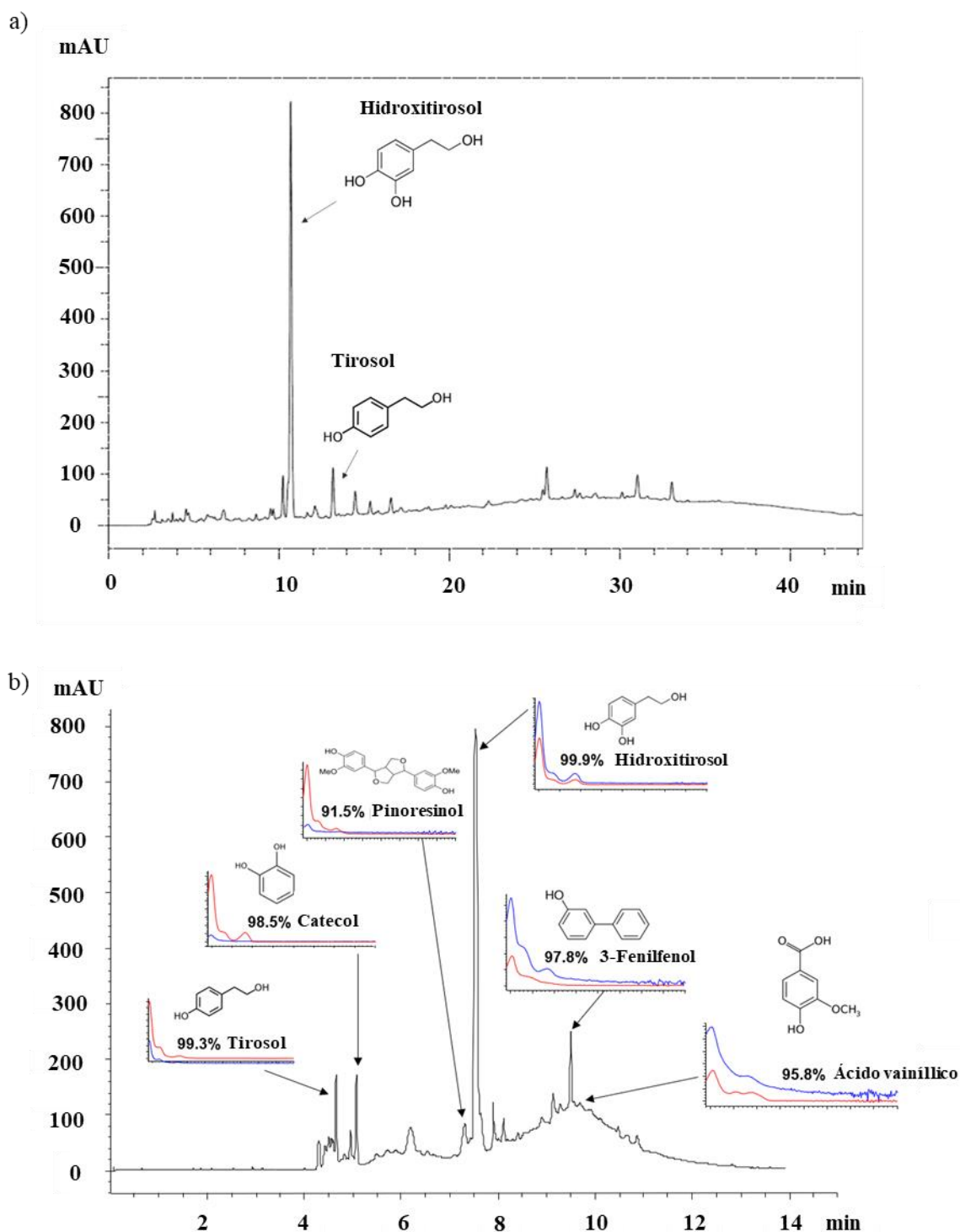


Figura 53. Cromatograma (280 nm) (a) y electroferograma (200 nm) (b) del extracto acuoso obtenido a partir de la primera extracción acuosa de orujillo peletizado (85°C, 90 min, 10% sólidos).

También, se empleó HPLC-MS para la determinación de compuestos minoritarios en los extractos ya que presenta una alta sensibilidad y permite la elucidación estructural tentativa a partir de la determinación de sus masas moleculares y de los patrones de

fragmentación que presentan fragmentos característicos de su estructura. Es importante remarcar que la información proporcionada por la literatura (Ammar et al., 2017; Contreras et al., 2021; Rubio-Senent et al., 2015) y las bases de datos de estructuras químicas fue crucial para la identificación de estos compuestos.

Todos los extractos presentaron perfiles de HPLC-MS similares, detectándose los compuestos identificados en la Tabla 21, con la excepción de los compuestos hidroxitirosol-desoxi ácido elenólico y luteolina, que sólo se detectaron en los extractos de acetona (40%). Probablemente, el carácter más apolar de la acetona, permitió la extracción de estos compuestos. También se observaron algunas diferencias en el perfil fenólico de los extractos de acetona respecto a los compuestos minoritarios, lo que podría explicar la mayor actividad antioxidante determinada en estos extractos. Por ejemplo, cabe destacar que la luteolina, presente en los extractos de acetona es un flavonoide que presenta casi el doble de actividad antioxidante, por el método ABTS, que el hidroxitirosol (Benavente-García et al., 2002). Además, se identificaron 23 compuestos derivados del hidroxitirosol, incluidos los compuestos bioactivos oleaceína, verbascosido y oleuropeína, que también presentan propiedades farmacológicas de interés (Nediani et al., 2019).

Tabla 21. Compuestos fenólicos identificados por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en extractos de orujillo.

RT (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fórmula molecular	Patrón de fragmentación (m/z)	Compuestos sugeridos
Derivados de hidroxitirosol				
1,1	153	C ₈ H ₁₀ O ₃	123	Hidroxitirosol ¹
1,2	315	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	153, 135, 123	Hidroxitirosol glucosido
1,7	461	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	315, 161, 135	Verbasosido
1,9	299	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	179, 161, 119, 101	Tirosol glucosido
3,0	461	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	299, 179, 161	Verbasosido isómero
6,5	195	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	153, 151, 59	Hidroxitirosol acetato
9,3	483	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₁	347, 123	Derivado de oleaceína (+ hexosa + H ₂)
9,9	543	C ₂₅ H ₃₆ O ₁₃	513, 377, 357, 313	Dihidro oleuropeína
10,1	623	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	461, 315	Verbasosido
10,3	701	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₈	539, 437, 377, 307, 275	Oleuropeína hexosido isómero 1
10,7	335	C ₁₇ H ₂₀ O ₇	317, 199, 153	Hidroxí oleaceína isómero 1
10,8	701	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₈	539, 377, 307, 275	Oleuropeína hexosido isómero 2
10,9	623	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	461	Isoverbasosido
11,0	335	C ₁₇ H ₂₀ O ₇	317, 199, 153, 111	Hidroxí oleaceína isómero 2
11,3	541	C ₂₅ H ₃₄ O ₁₃	361, 225, 181	Derivado de oleuropeína (+H ₂)

11,5	539	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	403, 223	Oleuropeína isómero 1
11,9	539	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	403, 377, 307, 275, 223	Oleuropeína ¹
11,9	701	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₈	377, 307, 275	Oleuropeína hexosido isómero 3
12,5	539	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	377, 307, 275, 223	Oleuropeína isómero 2
12,9	539	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	403, 377, 307, 275, 223	Oleuropeína isómero 3
13,0	319	C ₁₇ H ₂₀ O ₆	183, 181, 153, 111	Oleaceína
13,6	523	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂	361, 291, 259, 223	Ligustrosido
18,7	361	C ₁₉ H ₂₂ O ₇	329, 291, 225, 193, 181	Hidroxitirosol unido a desoxi ácido elenólico
Otros compuestos fenólicos				
6,2	137	C ₇ H ₆ O ₃	No fragmentado	Ácido 3-hidroxibenzoico
9,7	463	C ₂₀ H ₃₂ O ₁₂	347, 301	Quercetina glucosido
10,3	447	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	285	Luteolina 7-O-glucosido ¹
10,3	593	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	285	Luteolinz O-deoxihexosil- hexosido
10,7	593	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	447, 285	Luteolina O-deoxihexosido O- hexosido
11,7	551	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₄	507, 389, 341, 281, 251, 179, 161	Caffeoil-6'-secologanosido
13,0	535	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₃	491, 389, 345, 265, 163	p-Coumaroil-6'-secologanosido
14,2	285	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	175, 151	Luteolina

¹Comparado con estándares ²Oleaceína o 3,4-DHPEA-EDA

4.2.3.4. Evaluación del contenido de manitol y glucosa en los extractos

El contenido en manitol de los extractos de orujillo también se determinó y se optimizó su extracción ya que se trata de un compuesto bioactivo de interés, con aplicaciones en las industrias alimentaria y farmacéutica. La mayor solubilización de manitol se consiguió aplicando acetona 40% como disolvente en ultrasonidos de tipo sonda de baja potencia (69,7 mg/g orujillo). Sin embargo, el extracto con mayor contenido de este compuesto se obtuvo mediante extracción acuosa convencional (134,9 mg/g extracto), siendo este extracto también el de mayor contenido en TPC e hidroxitirosol (Tabla 22).

La concentración de manitol obtenida a partir del orujillo mediante las distintas tecnologías de extracción ensayadas en esta Tesis Doctoral fue más alta que la obtenida por otros autores empleando un extractor Soxhlet durante la noche y agua como disolvente (40 mg/g de orujillo) (Doménech et al., 2021) o una extracción hidrotérmica a 100°C durante 30 min (39 mg/g orujillo) (Manzanares et al., 2020) (Tabla 5). Comparando con las hojas de olivo, se puede afirmar que las cantidades de manitol determinadas en los extractos de orujillo son similares a las obtenidas para esta biomasa del olivar, que se considera una fuente rica en este compuesto (Lama-Muñoz et al., 2020a). En cambio, el orujo de aceituna presenta un contenido en manitol muy superior (210-320 mg/g peso seco) (Ribeiro et al., 2020) al obtenido para el orujillo en la presente Tesis.

Además de manitol, en todos los extractos se detectó la presencia de glucosa, en un rango que varió entre 43,5 mg/g orujillo (o 76,7 mg/g extracto) y 56,9 mg/g orujillo (o 120,2 mg/g extracto), dependiendo de las condiciones de extracción (Tabla 22). Dicha glucosa puede derivar de la glucosa presente en la fracción de extractivos, 1,77%, junto con glucosa presente en estructuras lábiles como la hemicelulosa o incluso celulosa amorfa (Tabla 16).

Tabla 22. Cantidad de manitol y glucosa en los extractos de orujillo obtenidos en las diferentes extracciones aplicadas.

Método de extracción	Manitol		Glucosa	
	(mg/g orujillo)	(mg/g extracto)	(mg/g orujillo)	(mg/g extracto)
Extracción con solventes				
Extracción acuosa ^a (1 ^a etapa)	55,2 ± 0,3	134,9 ± 0,8	45,7 ± 0,3	111,7 ± 0,7
Extracción acuosa ^a (2 ^a etapa)	4,3 ± 0,0	39,4 ± 0,0	3,07 ± 0,2	33,9 ± 1,6
Extracción con acetona 70% ^a (2 ^a etapa)	4,4 ± 0,0	40,7 ± 0,0	9,0 ± 0,5	83,3 ± 2,0
Ultrasonidos baño/ acetona 40% ^b	59,5 ± 1,1	125,7 ± 2,3	56,9 ± 0,5	120,2 ± 0,9
Ultrasonidos sonda (baja potencia)/ acetona 40% ^b	69,7 ± 0,2	122,7 ± 0,4	43,5 ± 1,3	76,7 ± 2,2
Ultrasonidos sonda (alta potencia)/agua ^a	50,9 ± 50,9	108,0 ± 3,7	53,0 ± 1,1	112,5 ± 2,4
Ultrasonidos sonda (alta potencia)/agua ^b	47,3 ± 1,4	108,4 ± 3,1	46,9 ± 0,8	107,5 ± 1,9
Microondas/agua ^b	46,7 ± 1,1	119,3 ± 2,8	46,7 ± 0,6	119,3 ± 1,4

^aOrujillo peletizado; ^bOrujillo molido.

4.2.4. Sólido de orujillo extraído

4.2.4.1. Composición química y elemental

La aplicación de una etapa de extracción en una biorrefinería tiene dos funciones, una es la posibilidad de obtener compuestos bioactivos, como se ha indicado en los apartados previos, así como favorecer la posterior conversión de celulosa en la etapa de sacarificación enzimática (Ballesteros et al., 2011). Así, la caracterización de la biomasa pretratada es necesaria para su valorización en etapas posteriores de una biorrefinería. De igual forma, resulta fundamental la caracterización del sólido resultante de la etapa de extracción. Por ello, se evaluó la composición química de los sólidos de orujillo extraído obtenidos tras la aplicación de las diferentes técnicas en condiciones optimizadas o seleccionadas (Tabla 23) mediante la metodología descrita en el Apartado 4.1. Todas las técnicas de extracción ensayadas eliminaron gran parte de los extractivos presentes en el

orujillo (componentes no estructurales), principalmente extractivos acuosos. Particularmente, la extracción acuosa convencional y la extracción con ultrasonidos de tipo baño consiguieron una mayor reducción del contenido en extractivos del orujillo, resultandos sólidos que presentaron alrededor de un 15% de extractivos frente al orujillo inicial que tenía un 41,8% (Tabla 16). Esto concuerda con el estudio de Manzanares et al. (2020) en el que se aplicó una etapa de extracción con agua caliente al orujillo (100°C durante 30 min) para reducir el porcentaje de esta fracción y obtuvieron un sólido con un 15% de extractivos.

Cuando se realizó una segunda etapa de extracción, con agua o con acetona 70%, sobre el sólido resultante de una primera extracción acuosa, el porcentaje de extractivos se redujo aún más, obteniendo sólidos con un 2,3 y 4,4% de extractivos acuosos, respectivamente. Como consecuencia de la solubilización de extractivos, principalmente acuosos, se produjo un aumento considerable de los porcentajes del resto de fracciones del orujillo: extractivos etanólicos, celulosa, hemicelulosa y lignina. Por tanto, el sólido de orujillo extraído puede ser aprovechado para obtener azúcares libres de la fracción polimérica y derivados de valor añadido lo que maximizaría la valorización de este biorecurso.

En cuanto a la composición elemental, se produjo un aumento en el contenido de nitrógeno en los sólidos extraídos (Tabla 23) con respecto al orujillo inicial (Tabla 16), excepto en el caso de la extracción por microondas lo que podría deberse a una mayor solubilización del material nitrogenado en el extracto acuoso. También, se incrementó ligeramente el porcentaje de carbono y esto podría incrementar su poder calorífico (Huang y Lo, 2020).

Tabla 23. Composición química y análisis elemental (% peso seco) de los residuos de extracción (sólidos de orujillo extraídos).

Componente	1ª extracción acuosa ^a	2ª extracción acuosa ^a	2ª extracción con 70 % acetona ^a	Ultrasonidos baño/40% acetona ^{b,c}	Ultrasonidos sonda/40% acetona ^{b,d}	Ultrasonidos sonda/agua ^{a,e}	Ultrasonidos sonda/agua ^{b,e}	Microondas/agua ^b
Composición química								
Extractos	15,24 ± 0,27	9,00 ± 0,10	10,10 ± 0,3	15,51 ± 0,43	20,29 ± 1,04	20,98 ± 1,07	21,45 ± 0,26	17,52 ± 0,91
Extractos acuosos	8,24 ± 0,23	2,30 ± 0,10	4,40 ± 0,0	4,88 ± 0,22	7,81 ± 1,04	14,89 ± 0,74	14,65 ± 0,40	9,46 ± 0,97
Extractos etanólicos	7,00 ± 0,18	6,70 ± 0,00	5,80 ± 0,4	10,82 ± 0,37	12,02 ± 1,04	6,09 ± 0,19	6,79 ± 0,66	8,05 ± 0,06
Celulosa	12,81 ± 0,55	13,00 ± 1,40	13,90 ± 1,3	11,49 ± 0,65	15,09 ± 0,80	14,33 ± 0,64	15,71 ± 1,63	10,81 ± 1,31
Hemicelulosa	17,98 ± 0,82	18,60 ± 1,20	14,70 ± 0,9	15,77 ± 0,77	20,08 ± 0,93	15,16 ± 0,18	17,31 ± 1,51	13,46 ± 1,43
Xilosa	13,00 ± 0,54	14,10 ± 1,10	10,50 ± 0,7	11,31 ± 0,77	15,84 ± 0,93	14,70 ± 0,15	16,75 ± 1,48	13,11 ± 1,39
Galactosa	3,27 ± 0,61	3,10 ± 0,20	2,40 ± 0,2	2,84 ± 0,09	2,57 ± 0,62	1,24 ± 0,09	1,50 ± 0,31	1,05 ± 0,32
Arabinosa	2,12 ± 0,07	2,30 ± 0,10	2,40 ± 0,2	2,27 ± 0,02	2,76 ± 0,01	1,16 ± 0,03	1,27 ± 0,06	1,02 ± 0,13
Manosa	1,21 ± 0,06	1,40 ± 0,10	1,30 ± 0,1	1,29 ± 0,16	1,41 ± 0,03	N.D.	N.D.	N.D.
Grupos acetilos	1,00 ± 0,06	1,70 ± 0,20	1,90 ± 0,4	1,35 ± 0,16	1,84 ± 0,05	1,30 ± 0,09	1,64 ± 0,19	1,31 ± 0,28
Lignina	34,21 ± 0,38	40,60 ± 0,50	38,60 ± 0,8	30,14 ± 0,31	29,79 ± 0,07	32,32 ± 0,49	32,34 ± 0,73	31,49 ± 0,55
LAI	33,62 ± 0,28	39,70 ± 0,30	37,30 ± 0,3	29,59 ± 0,31	28,52 ± 0,69	31,54 ± 0,48	31,08 ± 0,72	30,77 ± 0,51
LAS	0,93 ± 0,41	0,90 ± 0,50	1,30 ± 0,8	0,55 ± 0,06	1,27 ± 0,07	0,78 ± 0,07	1,26 ± 0,01	0,71 ± 0,22
Cenizas	0,18 ± 0,01	0,20 ± 0,00	0,20 ± 0,0	1,67 ± 0,06	1,60 ± 0,21	1,62 ± 0,04	1,68 ± 0,12	1,41 ± 0,02
Análisis elemental								
Nitrógeno	1,85 ± 0,08	1,73 ± 0,14	1,80 ± 0,0	1,45 ± 0,19	-	1,57 ± 0,07	1,43 ± 0,07	1,09 ± 0,25
Carbono	45,41 ± 0,68	50,59 ± 1,27	48,70 ± 0,3	48,95 ± 0,33	-	49,52 ± 0,39	49,38 ± 0,37	49,69 ± 0,16
Hidrógeno	5,88 ± 0,05	6,06 ± 0,20	5,80 ± 0,1	5,96 ± 0,08	-	6,21 ± 0,04	6,16 ± 0,04	6,08 ± 0,03

N.D., no detectado; -, no caracterizado; LAI: Lignina ácido insoluble; LAS; Lignina ácido soluble.

^aOrujillo peletizado; ^bOrujillo molido; ^cPotencia del equipo: 100W; ^dPotencia del equipo: 150W; ^ePotencia del equipo: 550W.

4.2.4.2. Evaluación de la fracción sólida extraída mediante microscopía electrónica de barrido

Para estudiar los cambios estructurales originados en el orujillo tras la extracción con ultrasonidos y microondas se empleó SEM. La Figura 54 muestra las imágenes panorámicas (escala 50 μm) obtenidas mediante SEM. En las Figuras 54a y 54b, correspondientes a orujillo peletizado y molido, respectivamente, se observa un predominio del material vegetal. El orujillo molido presenta una superficie más lisa ya que debido a la etapa de molienda las partículas son más pequeñas y se encuentran apiladas, aunque realmente el material esté más disgregado.

El orujillo peletizado, tras ser sometido a la extracción con ultrasonidos de tipo sonda de alta potencia, muestra una superficie del material vegetal más erosionada que la superficie de orujillo inicial peletizado y, además, su aspecto es deshilachado (Figuras 54a y 54c). No obstante, cuando esta misma tecnología se aplicó al orujillo molido, se observa una estructura más fraccionada y deteriorada, con presencia de oquedades (Figura 54d). A pesar de estas diferencias estructurales, los resultados de TPC, hidroxitirosol, actividad antioxidante, manitol y glucosa fueron similares en ambos extractos (Tablas 19, 20 y 22). Cabe decir que, el daño estructural provocado en el tejido vegetal por los ultrasonidos fue suficiente para facilitar la extracción de compuestos bioactivos sin necesidad de molienda previa. En el caso de la extracción con microondas (Figura 54e), también, se puede observar una gran desestructuración del material vegetal, apareciendo oquedades y dejando un material muy fraccionado.

Tanto el empleo de ultrasonidos como de microondas indujeron daños estructurales del material vegetal, favoreciendo la liberación de compuestos bioactivos. En el primer caso, las ondas de ultrasonidos y el efecto de cavitación pueden alterar los materiales biológicos dando lugar a descamación y erosión de la superficie, y pueden aparecer pequeños hilos o aberturas huecas (Altemimi et al., 2016). En el caso de la extracción por microondas, su eficacia se atribuye al calentamiento localizado producido por dicha radiación que afecta a la estructura de la célula debido al aumento repentino de la temperatura y la presión interna y, en consecuencia, se rompe la célula (Kaderides et al., 2019). Por tanto, estos cambios estructurales favorecen la accesibilidad del solvente al material vegetal facilitando la liberación de compuestos bioactivos y mejorando el transporte de masa al alterar las paredes celulares (Altemimi et al., 2016).

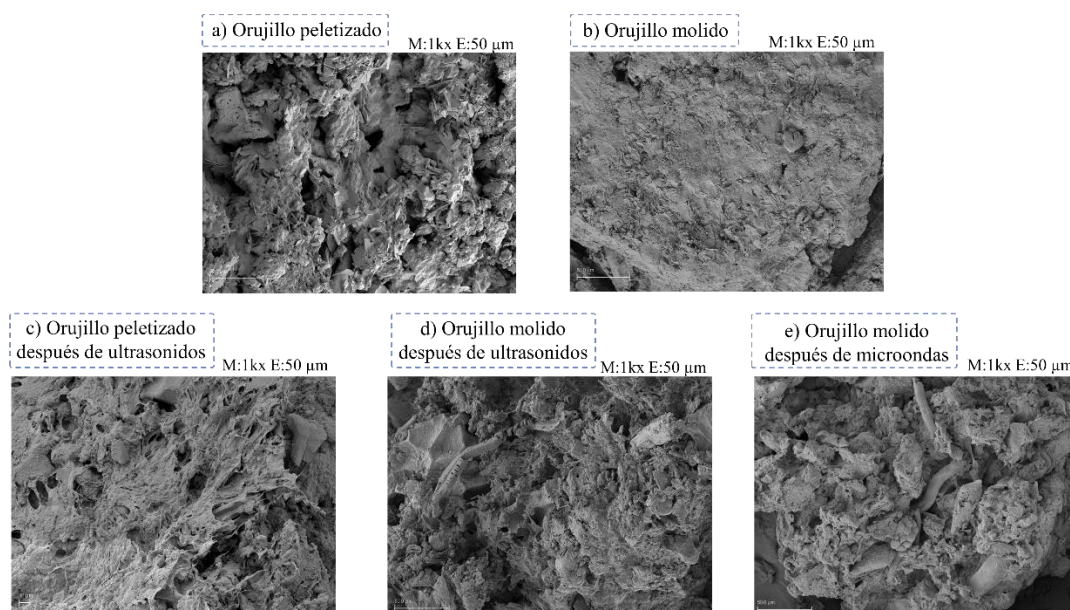


Figura 54. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de orujillo original peletizado (a) y molido (b), y del orujillo extraído por ultrasonidos tipo sonda de alta potencia (c) y (d) y microondas (e).

4.2.4.3. Extracción de triterpenos del sólido de orujillo extraído

Los ácidos triterpénicos son compuestos interesantes debido a sus propiedades bioactivas y a sus potenciales aplicaciones en la industria alimentaria, de piensos y farmacéutica (Contreras et al., 2020a). Estos compuestos presentan características más apolares que el hidroxitirosol y el manitol y, generalmente, se emplea etanol, metanol o una mezcla de ambos para su extracción (Romero et al., 2017; Xie et al., 2019). De hecho, la presencia de estos compuestos no se detectó en los extractos acuosos de orujillo obtenidos en la presente Tesis Doctoral a partir de las diferentes técnicas ensayadas. Por ello, se realizó una maceración con etanol sobre el orujillo original (peletizado y molido) y sobre los sólidos extraídos de orujillo obtenidos tras la etapa de extracción con ultrasonidos y microondas.

La Tabla 24 muestra los valores de rendimiento de extracción y contenido de ácido maslínico y oleanólico en los extractos etanólicos obtenidos a partir del orujillo original peletizado y molido, y de los sólidos de orujillo extraídos por ultrasonidos de tipo sonda de alta potencia y microondas.

Tabla 24. Rendimiento de extracción y contenido de ácido maslínico y oleanólico en los extractos etanólicos de orujillo original y sólidos extraídos tras tratamiento por ultrasonidos y microondas.

	Rendimiento (%)	Ácido maslínico		Ácido oleanólico	
		(mg/g orujillo)	(mg/g extracto)	(mg/g orujillo)	(mg/g orujillo)
Materia prima					
Orujillo peletizado	7,56 ± 0,78	5,70 ± 0,00	75,40 ± 0,00	2,10 ± 0,00	27,77 ± 0,00
Orujillo molido	6,40 ± 0,19	5,31 ± 0,12	82,97 ± 6,30	1,96 ± 0,05	30,63 ± 2,60
Sólidos extraídos					
Ultrasonidos sonda (alta potencia)/agua ^a	7,02 ± 0,18	8,40 ± 0,04	119,66 ± 2,20	3,20 ± 0,02	45,58 ± 1,10
Ultrasonidos - sonda (alta potencia)/agua ^b	7,56 ± 0,12	8,90 ± 0,01	117,72 ± 0,83	3,40 ± 0,00	44,97 ± 0,00
Microondas/ agua ^b	6,78 ± 0,14	9,54 ± 0,03	140,71 ± 2,14	3,60 ± 0,02	53,10 ± 1,43

^aOrujillo peletizado; ^bOrujillo molido.

El rendimiento de extracción (sólidos solubles en etanol) determinado fue similar en todos los casos, en torno al 7%, tanto para el orujillo original como para el orujillo ya extraído. En cuanto a los ácidos triterpénicos extraídos, se obtuvieron mayores concentraciones a partir de los sólidos de orujillo extraídos, que variaron entre 8,40 y 9,54 mg ácido maslínico/g orujillo y entre 3,20 y 3,60 mg ácido oleanólico/g orujillo, dependiendo del método de extracción (Tabla 24). Asimismo, los extractos obtenidos a partir del orujillo extraído presentaron una mayor pureza, entre 119,66 y 140,71 mg ácido maslínico/g extracto y entre 44,97 y 53,10 mg ácido oleanólico/g extracto. Esto indica que la extracción previa del orujillo favoreció la posterior extracción de los ácidos triterpénicos. Este hecho puede atribuirse al mayor contenido de extractivos etanólicos en el sólido de orujillo extraído frente al orujillo inicial, pero también al efecto del ultrasonidos y microondas sobre la estructura de la biomasa, que podría haber facilitado su extracción. En este sentido, estudios anteriores han demostrado que el empleo de microondas mejora la extracción de ácidos triterpénicos a partir de piel y orujo de aceituna frente a la extracción Soxhlet debido a que la primera producía un mayor daño tisular (Fernandez-Pastor et al., 2017; Xie et al., 2019).

Comparando estos valores con los obtenidos a partir de otras biomásas derivadas de la aceituna, cabe destacar que el contenido de ácido maslínico determinado para el orujillo es similar al de las hojas de olivo mediante maceración (7,3 mg/g hojas) (Guinda et al., 2010), pero superior al del orujo de aceituna empleando microondas como tecnología de

extracción (0,02 mg/g orujo) (Ozkan et al., 2017) (Tabla 8). Sin embargo, el contenido de ácido oleanólico en el orujillo es similar al del orujo de aceituna (3 mg/g orujo) (Romero et al., 2017) pero muy inferior al determinado en las hojas de olivo (18,91-39,80 mg/g hoja) (Martín-García et al., 2019).

Por lo tanto, una extracción secuencial del orujillo permite la obtención de extractos ricos en antioxidantes, principalmente hidroxitirosol, y manitol y en ácidos triterpénicos. En este caso, el orujillo se puede emplear como un biorecurso alternativo a las hojas de olivo, que se consideran una buena fuente de este compuesto, para elaborar productos de alto valor añadido enriquecidos en ácidos triterpénicos (Martín-García et al., 2019; Romero et al., 2017).

4.3. Deslignificación del orujillo extraído

Como segunda etapa, en un proceso de valorización integral del orujillo, se evaluaron diferentes tratamientos de deslignificación con un doble objetivo: recuperar compuestos de interés a partir de la lignina y favorecer una posterior etapa de sacarificación enzimática para producción de azúcares.

En un primer esquema de trabajo se seleccionó la extracción acuosa convencional (85°C y 90 min) en una única etapa (Estrategia 1). En una segunda estrategia, se evaluó el interés de aplicar una segunda extracción con agua o con acetona a fin de solubilizar más extractivos y lograr una mayor recuperación de compuestos antioxidantes y manitol (Estrategia 2).

A continuación, se describen las dos estrategias de proceso ensayadas, incluyendo la etapa de deslignificación posterior a la extracción:

- Estrategia 1 (Artículo 5): tras una extracción acuosa (85°C y 90 min) se ensayaron diferentes pretratamientos con agua caliente a presión, y con etanol al 50% y 60% (v/v) (sin catalizar y catalizado con ácido sulfúrico al 1%, v/v) a distintas temperaturas (Figura 48).
- Estrategia 2 (Artículo 6): se ensayó una extracción acuosa en dos etapas (85°C y 90 min), y también una extracción secuencial con agua (85°C y 90 min) y acetona 70% (30°C y 30 min) seguidas de una deslignificación organosolvente con etanol 50% (v/v), catalizado con ácido sulfúrico al 1% (v/v), a distintas temperaturas (Figura 49).

Tras la deslignificación parcial del orujillo se obtuvieron unos licores de pretratamiento con actividad antioxidante por la presencia de lignina solubilizada, y unos sólidos pretratados que se hidrolizaron enzimáticamente para obtener azúcares fermentables. Cabe decir, que el pretratamiento organosolvente con etanol se ha descrito como un tratamiento eficiente para solubilizar lignina de la biomasa (Galbe y Wallberg, 2019) que permite obtener ligninas de alta pureza (Pan y Saddler, 2013).

4.3.1. Caracterización de licores de pretratamiento

Los licores obtenidos tras la deslignificación del orujillo en las dos estrategias de proceso, se analizaron en términos de TPC y actividad antioxidante (Figura 55), siguiendo los métodos del Apartado 4.2.3.

En la Estrategia 1, el valor más alto de TPC (53,11 mg GAE/g orujillo) se obtuvo en el licor de pretratamiento P5 (50% etanol-1% ácido sulfúrico, 130°C), que también exhibió una alta actividad antioxidante, tanto para FRAP como para ABTS (58,59 y 97,65 mg TE/g orujillo, respectivamente) (Figura 55). Esto podría ser debido a que al menos una parte de los compuestos fenólicos medidos en los licores de pretratamiento corresponden a los grupos hidroxilos fenólicos de la lignina solubilizada (Michelin et al., 2018) que aportan propiedades antioxidantes (Contreras et al., 2021).

En la Estrategia 2, como se ha comentado previamente, se llevó a cabo una extracción en dos etapas previa a la etapa de deslignificación. La extracción acuosa y con acetona 70% como segunda etapa de extracción ofrecieron resultados similares en cuanto al TPC, actividad antioxidante y manitol (Tablas 19, 20 y 22). De acuerdo con estos resultados, se seleccionó la extracción acuosa en dos etapas por ser el agua un disolvente no tóxico y de bajo coste, para la recuperación global de los compuestos antioxidantes y manitol del orujillo.

El sólido resultante de esta doble extracción acuosa se pretrató de acuerdo con el esquema de la Figura 49. Los resultados de los licores de pretratamiento se muestran en la Figura 55. Tal y como se observa, el mayor contenido en compuestos fenólicos (46,16 mg GAE/g orujillo) y capacidad antioxidante, particularmente con el método ABTS (93,64 mg TE/g orujillo), se determinó en el licor del pretratamiento P10 (50% etanol-1% ácido sulfúrico, 140°C), (Figura 49). Por ello, este pretratamiento se eligió para continuar con las siguientes etapas del esquema de trabajo.

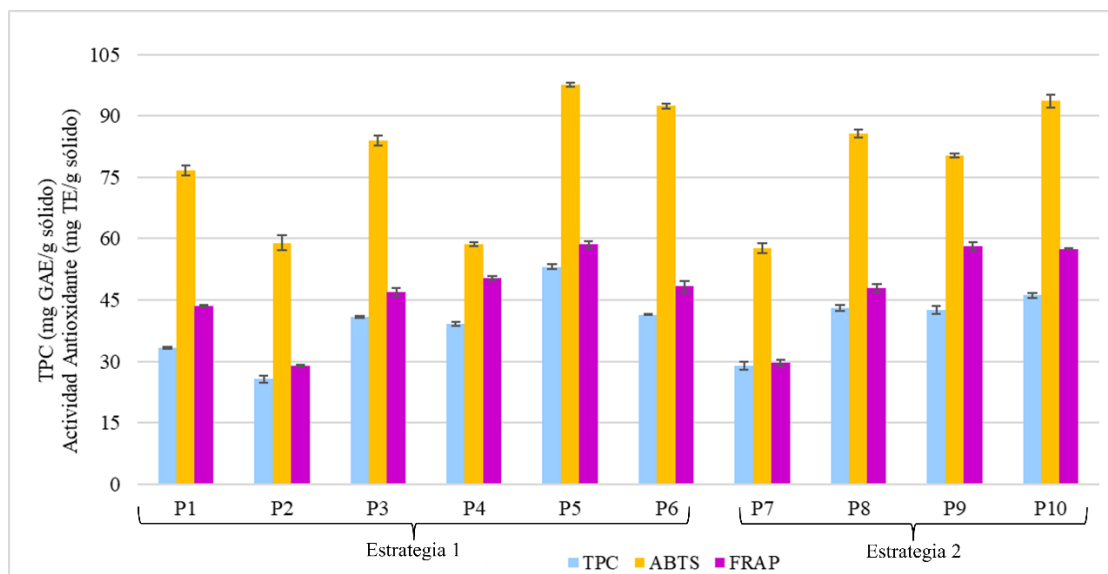


Figura 55. Contenido total en fenoles y actividad antioxidante de los licores de pretratamientos.

Evaluando los resultados obtenidos en los dos esquemas de trabajo, se obtuvieron valores más altos de compuestos fenólicos y actividad antioxidante con el pretratamiento P5 (Estrategia 1) que con el pretratamiento P10 (Estrategia 2). Esto puede deberse a que estos licores, además de lignina solubilizada, contienen compuestos fenólicos que no se han logrado extraer empleando una única etapa de extracción. No obstante, el pretratamiento también pudo influir en el tipo de lignina que se solubiliza, como se detalla en los siguientes apartados, y esto a su vez, determinar la actividad antioxidante medida en los licores, como sugieren algunos estudios (Contreras et al., 2021; Erdocia et al., 2014).

4.3.2. Sólidos de pretratamiento

Los **sólidos** obtenidos tras la etapa de deslignificación se caracterizaron (Tabla 25) y se sometieron a hidrólisis enzimática para evaluar la obtención de glucosa a partir de los mismos.

En la Estrategia 1 de proceso, los dos tratamientos que más afectaron a la hemicelulosa fueron el pretratamiento con agua caliente a presión (P1) y el pretratamiento P5, con una solubilización de esta superior al 55%, que afectó principalmente a los xilanos (Tabla 25). Estudios previos han mostrado la solubilización de xilanos del orujillo a través de tratamientos de autohidrólisis (Manzanares et al., 2020). La temperatura es un factor crucial para la eliminación de hemicelulosa y reducir las características recalcitrantes de

la biomasa, tanto con agua caliente a presión como en los pretratamientos con organosolvente (Díaz et al., 2011; Manzanares et al., 2020). Esto explica que el contenido de hemicelulosa en el sólido pretratado P4 sea superior al del sólido P5, ya que proceden de tratamientos con organosolvente a 110°C y 130°C, respectivamente. Esta solubilización de hemicelulosa provocó un aumento en el contenido de celulosa y lignina con respecto al orujillo extraído (Tabla 25). Así, el pretratamiento P5 dio lugar a un sólido con mayor contenido en celulosa y alcanzó el valor más alto de deslignificación, 23%. Esta mayor deslignificación puede deberse a la adición de ácido sulfúrico como catalizador, ya que las condiciones ácidas contribuyen a la rotura de los enlaces éter de la lignina, lo que favorece la deslignificación de la biomasa (Tayier et al., 2018). Por ello, y considerando también las propiedades antioxidantes del licor (Apartado 4.3.2), en esta estrategia, Estrategia 1, se seleccionó el pretratamiento P5 para recuperar lignina con propiedades antioxidantes del licor, y continuar con las siguientes etapas de proceso.

En la Estrategia 2, también se puede apreciar el papel importante que la temperatura desempeñó en el pretratamiento organosolvente del orujillo (Tabla 25). Cuando el sólido procedente de la segunda etapa de extracción con acetona 70% (E2) se pretrató a 110°C (P7), sólo se hidrolizó un 30% de hemicelulosa, y el rendimiento de deslignificación fue inferior al 12%. Sin embargo, al elevar la temperatura de pretratamiento a 130°C (P8) sobre el mismo sólido extraído, el rendimiento de deslignificación aumentó hasta 43%, y se solubilizó un 71% de hemicelulosa. Este efecto positivo de la temperatura cuando se emplea un proceso de etanol organosolvente coincide con los resultados obtenidos para otros materiales lignocelulósicos como la biomasa de *Cistus ladanifer* (Alves-Ferreira et al., 2021), *Eucalyptus nitens* (Romaní et al., 2019), paja de trigo (Salapa et al., 2017) o bagazo de caña de azúcar (Agnihotri et al., 2015).

Sin embargo, en este segundo esquema de trabajo la mayor solubilización de biomasa se consiguió en el pretratamiento P10, que también fue superior al alcanzado con el pretratamiento P5 de la Estrategia 1, descrito en el apartado anterior. Se logró solubilizar 75% de hemicelulosa y el rendimiento de deslignificación fue del 53%. Esto puede deberse al aumento de temperatura como se ha comentado anteriormente (130°C en P5 versus 140°C en P10). Por ello, teniendo en cuenta estos resultados de solubilización de hemicelulosa y deslignificación, y considerando el licor de pretratamiento (Apartado

4.3.1), se seleccionó el pretratamiento P10 para llevar a cabo las siguientes etapas del esquema de trabajo.

Tabla 25. Composición química (% peso seco) de los sólidos obtenidos tras el pretratamiento.

	Estrategia 1 (Artículo 5)						Estrategia 2 (Artículo 6)			
	Extracción acuosa						Extracción secuencial agua-acetona 70%		Doble extracción acuosa	
	P1	P2	P3	P4 ^a	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Celulosa	22,14 ± 1,94	17,78 ± 0,39	23,89 ± 1,48	23,50 ± 0,64	28,53 ± 1,20	18,30 ± 0,62	19,40 ± 1,20	26,70 ± 1,70	32,10 ± 1,40	29,00 ± 1,20
Hemicelulosa	10,28 ± 0,64	21,68 ± 0,27	10,05 ± 0,22	20,31 ± 0,32	14,47 ± 0,82	17,36 ± 0,52	19,20 ± 0,80	12,70 ± 0,40	14,20 ± 0,70	11,90 ± 0,30
Xilosa	5,17 ± 0,64	18,17 ± 0,27	4,69 ± 0,22	15,51 ± 0,32	10,11 ± 0,82	13,82 ± 0,52	15,90 ± 0,70	8,60 ± 0,40	9,80 ± 0,60	7,40 ± 0,30
Galactosa	2,72 ± 0,07	2,69 ± 0,05	2,87 ± 0,10	3,24 ± 0,06	2,48 ± 0,09	2,52 ± 0,04	2,50 ± 0,10	2,30 ± 0,10	2,30 ± 0,10	1,90 ± 0,00
Arabinosa	1,85 ± 0,08	2,13 ± 0,08	1,68 ± 0,00	2,36 ± 0,02	2,03 ± 0,01	1,67 ± 0,02	1,70 ± 0,10	1,80 ± 0,10	2,20 ± 0,30	2,10 ± 0,10
Manosa	1,76 ± 0,09	1,41 ± 0,06	1,98 ± 0,07	1,70 ± 0,06	1,62 ± 0,05	1,50 ± 0,03	1,40 ± 0,20	1,50 ± 0,00	1,60 ± 0,10	1,50 ± 0,00
Grupos acetilos	0,71 ± 0,07	0,40 ± 0,02	0,61 ± 0,03	1,32 ± 0,04	0,36 ± 0,03	1,07 ± 0,02	1,30 ± 0,10	0,50 ± 0,00	0,50 ± 0,00	0,30 ± 0,00
Lignina	58,13 ± 0,33	42,81 ± 0,87	54,82 ± 0,36	45,82 ± 0,47	47,40 ± 0,05	43,77 ± 0,63	44,80 ± 0,80	46,00 ± 0,70	45,40 ± 0,50	44,10 ± 0,90
LAI	56,77 ± 0,31	41,15 ± 0,87	54,25 ± 0,36	44,64 ± 0,45	46,44 ± 0,02	42,85 ± 0,63	43,60 ± 0,50	45,30 ± 0,60	44,50 ± 0,30	43,10 ± 0,80
LAS	1,36 ± 0,11	1,66 ± 0,00	0,57 ± 0,00	1,18 ± 0,14	0,96 ± 0,05	0,92 ± 0,01	1,30 ± 0,70	0,70 ± 0,30	0,90 ± 0,40	0,90 ± 0,50
Cenizas	1,59 ± 0,18	1,89 ± 0,07	2,64 ± 0,22	2,39 ± 0,04	3,18 ± 0,04	2,56 ± 0,07	0,30 ± 0,10	0,30 ± 0,10	0,30 ± 0,10	0,30 ± 0,00
Recuperación sólidos	63,56	90,78	77,51	70,81	55,50	74,01	75,89	47,68	48,21	43,47
Deslignificación	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	5,99 ± 1,22	23,11 ± 0,77	5,31 ± 0,52	11,80 ± 1,70	43,10 ± 1,00	46,20 ± 0,40	52,80 ± 1,00

15% (m/v) sólidos, 60 min extracción; LAS: Lignina ácido soluble; LAI: Lignina ácido insoluble

4.3.3. Hidrólisis enzimática de los sólidos pretratados

Cabe decir que el pretratamiento con etanol organosolvente suele solubilizar tanto las hemicelulosas como la lignina, al menos parcialmente, y permite mantener una gran parte de la fracción celulósica en el sustrato (Zhou et al., 2018), que es crucial para una elevada recuperación de azúcares por hidrólisis enzimática. Los sólidos resultantes de los diferentes tratamientos de deslignificación fueron hidrolizados enzimáticamente en condiciones estándar (5% (m/v) sólidos, 50°C, pH 4,8 durante 72 h) con el complejo enzimático Cellic CTec2 (Novozymes) y β -glucosidasa, y se aplicaron dosis de 15 unidades de papel de filtro/g biomasa y 15 unidades internacionales/g biomasa, respectivamente. Finalmente, el hidrolizado se separó de la fracción sólida mediante filtración a vacío.

La Figura 56 muestra la digestibilidad enzimática y el rendimiento de hidrólisis de los ensayos realizados en ambas estrategias de proceso. En la Estrategia 1, los mayores valores de digestibilidad enzimática, superiores al 70%, se obtuvieron con los sólidos pretratados con agua caliente a presión a 110°C (P1) y con etanol 50% (v/v) catalizado con ácido sulfúrico al 1% (v/v) a 130°C (P5). No obstante, los mejores resultados de digestibilidad enzimática se alcanzaron en la Estrategia 2, con valores en torno al 80% para los pretratamientos P8 y P10. Este valor es comparable al obtenido por (Abu Tayeh et al., 2020), que alcanzaron una conversión de celulosa del 90% a partir de orujo de oliva pretratado por microondas a 140°C con ácido fórmico 0,6 M durante 10 min.

Sin embargo, cuando estos valores se expresan referidos al contenido total de glucosa en el orujillo inicial, el pretratamiento P5 alcanzó el rendimiento más alto de hidrólisis enzimática, 69,2%. Este rendimiento es comparable al obtenido para este mismo residuo pretratado con etanol 50% (v/v) y catalizado con ácido sulfúrico al 1% (v/v) a 190°C (65,9%) (Manzanares et al., 2020).

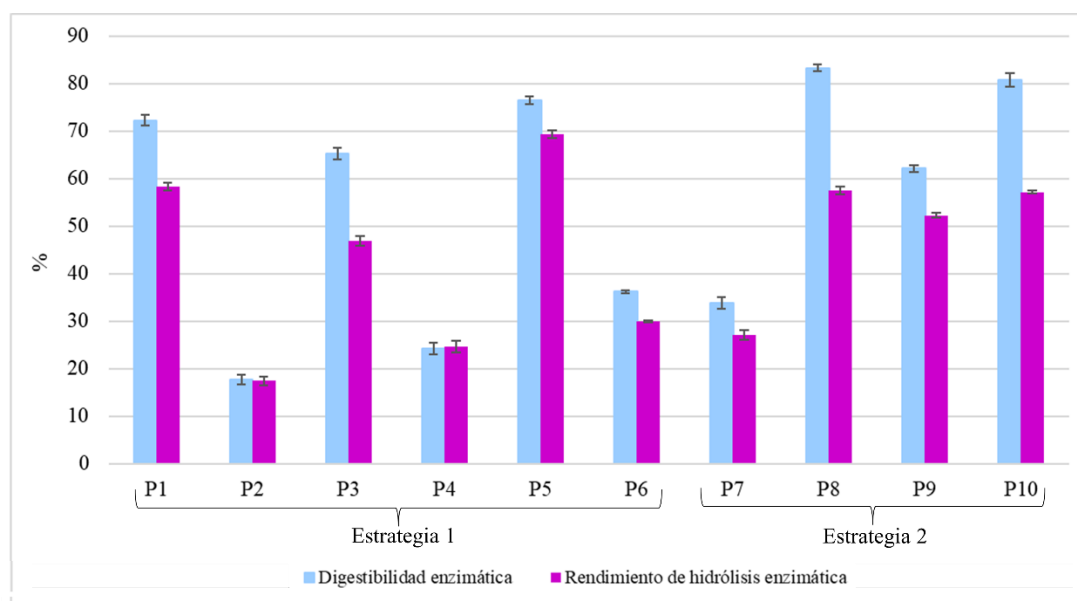


Figura 56. Digestibilidad enzimática de los sólidos pretratados, expresada como % de glucosa liberada con respecto al contenido de glucosa en estos sólidos, y rendimiento de hidrólisis enzimática, expresado como % de glucosa liberada con respecto al contenido de glucosa en el orujillo.

4.3.4. Obtención y caracterización de ligninas

Teniendo en cuenta los resultados discutidos en los apartados anteriores, y una vez seleccionados los tratamientos de deslignificación con organosolvente P5 en la Estrategia 1, y P10 en la Estrategia 2, se procedió a recuperar las ligninas solubilizadas en esos licores de pretratamiento. Además, se obtuvieron muestras de ligninas tras la hidrólisis enzimática de esos sólidos pretratados y todas ellas fueron caracterizadas.

4.3.4.1. Estrategia 1 de proceso

Para recuperar la lignina solubilizada en el licor de pretratamiento P5, se llevó a cabo una precipitación ácida (L1) (Figura 47), siguiendo el procedimiento descrito por García et al. (2017). Para ello, parte del licor de pretratamiento se evaporó en rotavapor hasta aproximadamente el 50% del volumen. A continuación, la lignina solubilizada se recuperó por precipitación añadiendo agua acidificada con H_2SO_4 a pH 2, se separó por filtración tras su lavado con agua acidificada y finalmente se secó en estufa a 105°C.

Además, tras la hidrólisis enzimática del sólido de pretratamiento, se obtuvo un sólido rico en lignina (L2) que se separó del hidrolizado enzimático por filtración. Ambas muestras de lignina (L1 y L2) fueron caracterizadas, de acuerdo con los métodos NREL,

para conocer su contenido en carbohidratos. Además, dado que esta metodología incluye una hidrólisis ácida en dos etapas donde se hidrolizan los carbohidratos, esto permitió determinar la pureza de las muestras de lignina a través de su contenido en LAI y obtener las muestras de lignina purificadas (L1p y L2p), libres de carbohidratos.

La composición química y elemental de las muestras de lignina obtenidas en este esquema de proceso se muestran en la Tabla 26. La pureza de L1 fue próxima al 90%, y superior a la de L2, 78%. Además, el mayor contenido en azúcares, principalmente glucosa y xilosa, de L2, indica que esta lignina estaba contaminada con parte de la celulosa que no fue hidrolizada durante la etapa de sacarificación. La pureza obtenida en la lignina L1 fue superior a la obtenida en otros estudios con poda de olivo pretratada con organosolventes (acetosolv, formosolv y acetosolv-formosolv) y posteriormente recuperada por precipitación con agua (Erdocia et al., 2014).

En cuanto al análisis elemental, la lignina L1 presentó un mayor porcentaje de nitrógeno. Estudios previos han demostrado que la lignina puede interaccionar con el material nitrogenado, lo que explicaría los resultados obtenidos ya que, L1 presenta un porcentaje mayor de LAI (Ramakoti et al., 2019). La cantidad de carbono de ambas ligninas fue similar y superior al 50% en ambos casos, con un bajo contenido de cenizas, lo que reduce la posibilidad de corrosión en la caldera ante una posible utilización de estos productos en procesos de conversión térmica (Perea-Moreno et al., 2016).

Tabla 26. Composición química y elemental de las muestras de lignina obtenidas.

	Estrategia 1 (Artículo 5)		Estrategia 2 (Artículo 6)		
	L1	L2	L3	L4	L5
Composición química (%)					
LAI	87,69 ± 2,38	78,34 ± 1,10	71,10 ± 3,64	46,95 ± 10,58	61,41 ± 1,79
LAS	1,78 ± 1,78	0,58 ± 0,08	N.D.	N.D.	N.D.
Glucano	1,42 ± 0,23	12,14 ± 1,66	1,13 ± 0,13	1,45 ± 0,35	19,54 ± 0,87
Xilano	2,05 ± 0,33	3,77 ± 0,25	1,55 ± 0,24	8,59 ± 2,47	N.D.
Galactano	1,40 ± 0,09	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Arabinano	1,73 ± 0,69	1,49 ± 0,06	N.D.	1,54 ± 0,19	N.D.
Cenizas	0,0018 ± 0,0001	0,13 ± 0,04	N.D.	N.D.	N.D.
Composición elemental (%)					
C	55,59 ± 0,41	52,18 ± 0,71	62,97 ± 0,30	46,01 ± 0,15	57,69 ± 1,26
H	5,80 ± 0,03	6,45 ± 0,13	8,95 ± 0,22	8,34 ± 0,15	8,73 ± 0,10
N	2,18 ± 0,05	1,89 ± 0,17	1,28 ± 0,01	1,14 ± 0,02	1,15 ± 0,10

L1, lignina recuperada del licor por precipitación ácida en la Estrategia 1; L2: lignina obtenida tras hidrólisis enzimática en la Estrategia 1; L3, lignina recuperada por precipitación ácida en la Estrategia 2; L4, lignina recuperada por evaporación en la Estrategia 2; L5: lignina obtenida tras hidrólisis enzimática en la Estrategia 2. LAI, Lignina ácido insoluble; LAS, Lignina ácido soluble. N.D., no detectado.

Pensando en una posible aplicación de estos productos (L1 y L2) como aditivos antioxidantes, se evaluó su contenido total en fenoles y su actividad antioxidante (Tabla 27). La lignina L1 presentó una capacidad antioxidante seis veces superior a la de la lignina L2, lo que puede atribuirse, al menos parcialmente, a su mayor pureza, como se comentó anteriormente. De igual forma, el contenido total en fenoles de la lignina L1 fue siete veces superior al de la lignina L2 (186,37 *versus* 25,86 mg GAE/g lignina). El valor máximo de compuestos fenólicos alcanzado (186,37 mg GAE/g lignina) es similar al obtenido para ligninas de la poda del manzano (García et al., 2017) tratados con organosolventes y, para lignina de orujo de oliva obtenida con líquidos iónicos (Cequier et al., 2019). En cuanto a la pérdida de actividad antioxidante de las ligninas después de la purificación, puede ser debida a que la hidrólisis ácida pudo causar degradación de las unidades aromáticas y luego modificar las propiedades antioxidantes de la lignina (García et al., 2017).

Tabla 27. Contenido fenólico total (TPC) y actividad antioxidante de los productos de lignina.

Tipo de lignina	TPC (mg GAE/g lignina)	FRAP (mg TE/g lignina)	ABTS (mg TE/g lignina)
L1	186,37 ± 0,01	254,66 ± 0,02	550,87 ± 0,02
L1p	71,63 ± 0,00	101,82 ± 0,01	217,30 ± 0,06
L2	25,86 ± 0,00	42,87 ± 0,04	83,94 ± 0,00
L2p	18,81 ± 0,00	14,19 ± 0,02	51,09 ± 0,00

L1, lignina recuperada del licor por precipitación ácida en la Estrategia 1; L2: lignina obtenida tras hidrólisis enzimática en la Estrategia 1; L1p, L1 purificada mediante hidrólisis ácida; L2p: L2 purificada mediante hidrólisis ácida; GAE, Equivalentes de ácido gálico; TE, Equivalentes de trolox.

4.3.4.2. Estrategia 2 de proceso

En este esquema de proceso, la lignina solubilizada en el tratamiento organosolvente P10 fue recuperada mediante dos técnicas diferentes: por precipitación ácida (L3), como se ha descrito previamente, y por evaporación (L4). Además, se obtuvo un sólido rico en lignina tras la hidrólisis enzimática (L5).

Para recuperar la lignina por evaporación (L4), el licor de pretratamiento se concentró dos veces en un rotavapor. Después, el líquido restante que quedó en el matraz se separó por decantación del sólido residual que quedó fijado en las paredes del mismo. A continuación, el sólido residual se lavó con etanol absoluto para su recuperación y finalmente se secó en estufa a 30°C. Las tres muestras de lignina fueron caracterizadas y

como se muestra en la Tabla 26, la lignina precipitada con ácido (L3) presentó la mayor pureza, 71,1%, comparada con las otras que presentaron carbohidratos, principalmente hemicelulósicos (L4) y celulósicos (L5). Por lo que, el método de recuperación por precipitación ácida fue más selectivo que el de evaporación y permitió obtener una lignina de mayor pureza. Esto puede atribuirse al hecho de que los carbohidratos disueltos en el licor de pretratamiento quedaron parcialmente retenidos en el sólido de la evaporación, dejando así una lignina con menor pureza. Al igual que en la lignina L2, la lignina L5 presentó un alto porcentaje de glucanos (19,54%) proveniente de la conversión incompleta de la celulosa en glucosa durante la sacarificación enzimática.

En cuanto a la composición elemental, el contenido de hidrógeno y nitrógeno en las tres muestras fue similar. Por otro lado, la lignina L3 presentó la mayor cantidad de carbono, incluso más que la lignina L4 a pesar de ser menos pura (Tabla 26).

En esta estrategia, también se determinó el peso molecular (M_w), el número molecular medio (M_n) y el índice de polidispersidad (PI) de las tres muestras de lignina. La lignina L3 presentó los valores más bajos de M_w (2053 Da) y un PI (3,36). Las muestras L4 y L5 mostraron pesos moleculares elevados de 19986 Da y 12968 Da, respectivamente, y una distribución de pesos moleculares más amplia, es decir, índices de polidispersidad más altos, 18,74 y 14,74, respectivamente. Esto podría deberse a la mayor presencia de carbohidratos en ambas ligninas (Tabla 26).

4.3.4.3. Características químicas de las ligninas

Las ligninas obtenidas en los diferentes esquemas de trabajo se analizaron también mediante diversas técnicas analíticas (véase Artículos 5 y 6) y particularmente por pirólisis-cromatografía de gases/espectrometría de masas (Pyr-GC-MS), que permitió la determinación de su estructura química básica. Se observó que todas las ligninas presentaban compuestos de tipo G, S y H, predominando los primeros. Esta relación S:G inusual, con predominio de las unidades G, se ha observado previamente en el orujo de aceituna (Sampedro et al., 2009) y en otros frutos como la pera (Rencoret et al., 2019). Sin embargo, la poda del olivo muestra un predominio mayor de unidades S, con una relación S:G de 1 a 5, como ocurre con otras maderas duras (Sequeiros y Labidi, 2017). En concreto, la relación S:G de las ligninas L1, L2, L3, L4 y L5 fue de 1:4, 1:5, 1:7, 1:2 y 1:9, respectivamente. En este sentido, las relaciones S:G y H:G:S dependen del tipo de biomasa, es decir, madera dura/blanda o angiosperma/gimnosperma, y también de la parte

de la planta, del tipo de lignina (Lourenço y Pereira, 2018) y de las condiciones del pretratamiento organosolvente (Sequeiros y Labidi, 2017). Esta estructura determina la facilidad para la deslignificación de la biomasa y sus propiedades (Nunes et al., 2010).

4.4. Purificación

Debido a su alto contenido en compuestos fenólicos e hidroxitirosol y manitol, se seleccionó el extracto de orujillo obtenido mediante extracción acuosa convencional para evaluar los siguientes métodos de purificación: separación por membranas, extracción líquido-líquido y separación por adsorción y resinas.

4.4.1. Tecnología de membranas

4.4.1.1. Procedimiento experimental

Se estudió la ultrafiltración y nanofiltración para separar selectivamente compuestos fenólicos y azúcares. Estas técnicas se emplean en múltiples procesos químicos industriales y son competitivas respecto a otras tecnologías de separación consolidadas (Zagklis y Paraskeva, 2019). Previamente, el extracto acuoso se filtró empleando papel de filtro de porosidad media, seguido de un filtro de microfibras de vidrio (1,2 μm de tamaño de poro) y un filtro de nitrato de celulosa (0,45 μm).

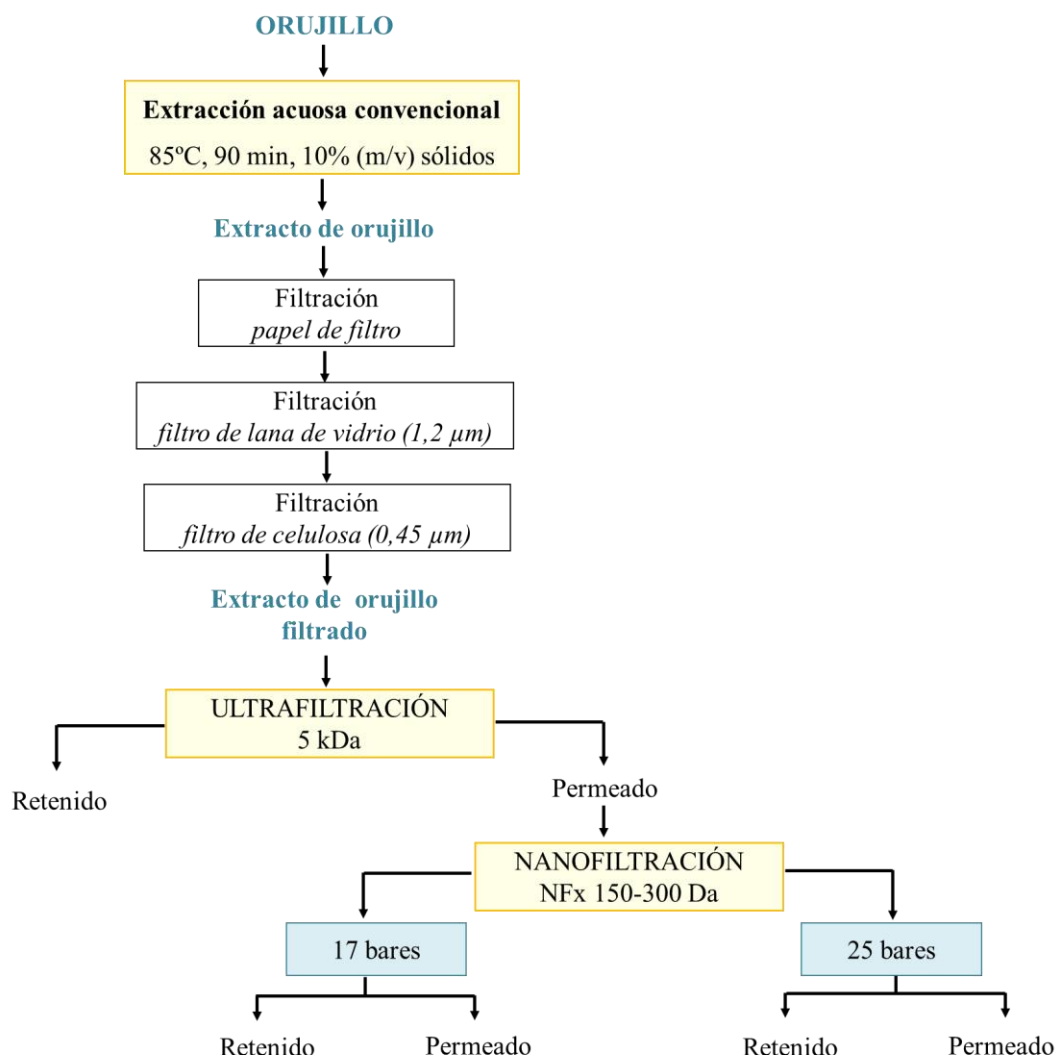


Figura 57. Proceso de purificación del extracto de orujillo mediante tecnología de membranas.

Para la ultrafiltración se empleó una membrana Synder MT (polietersulfona) con tamaño de poro de 5 kDa y para la nanofiltración una membrana Synder NFX 150-300 Da (película compuesta de poliamida). Ambas membranas se acondicionaron utilizando agua destilada a diferentes presiones membranales y todos los experimentos se realizaron a 22°C. La separación se llevó a cabo en un equipo desarrollado por el personal de investigación del LNEG y constaba de un depósito de alimentación de 3 L de capacidad, un módulo de membranas CF042A-FO de 42 cm² de superficie (Sterlitech, EE.UU.), una bomba, una válvula de control de contrapresión y un manómetro. Se empleó una configuración de flujo de cruzado y se controló ajustando la velocidad de la bomba de circulación a través de un convertidor de frecuencia. Además, se empleó un baño

termostático (Memmert, Alemania) para controlar la temperatura durante la separación. El retenido se recirculó continuamente en el tanque de alimentación y se recogió muestra del permeado y del retenido hasta una recirculación de 6 horas. La corriente de permeado obtenida tras la ultrafiltración se nanofiltró empleando presiones membranales de 17 y 25 bares durante 4 horas (Figura 57).

La corriente de alimentación y las corrientes de permeado y retenido, tanto de ultrafiltración como de nanofiltración, se analizaron para determinar su contenido en compuestos fenólicos (TPC), hidroxitirosol, actividad antioxidante (FRAP y ABTS) y la concentración de azúcares, específicamente, glucosa y manitol. El porcentaje de retención o rechazo determina la selectividad del proceso y se estima como:

$$\text{Retención o rechazo (\%)} = 1 - \frac{\text{Concentración en el permeado (g/L)}}{\text{Concentración inicial (g/L)}} \times 100$$

El % de recuperación en el permeado se estimó como:

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Cantidad recuperada en el permeado (g)}}{\text{Cantidad inicial (g)}} \times 100$$

4.4.1.2. Recuperación de los compuestos de interés

Se observó que, tras la etapa de **ultrafiltración**, la corriente de retenido se concentró en términos de compuestos fenólicos y, se produjo una separación parcial de la glucosa y manitol, que pasaron en mayor medida a la corriente de permeado (Tabla 28). Es decir, la membrana solo retuvo un 12,6% de glucosa, mientras que la retención de los compuestos fenólicos y manitol fue de 38,9% y 23,1%, respectivamente. El hidroxitirosol tuvo un comportamiento parecido a la glucosa, presentando un porcentaje de retención de 8,9% (Tabla 28). Por el contrario, la capacidad antioxidante presentó un valor de retención similar al del TPC; además del hidroxitirosol, otros compuestos fenólicos presentes en el extracto también influyen en dicha actividad (Tabla 28). El porcentaje de recuperación del hidroxitirosol en el permeado fue de un 40,1%, similar al de la glucosa (38,5%) y algo superior al del manitol (33,9%).

En otros estudios se ha observado que el porcentaje de rechazo y recuperación dependen del tipo de compuesto fenólico, lo que explicaría los diferentes valores obtenidos para el

TPC y el hidroxitirosol; por ej. del número de anillos de benceno que presentan y de su interacción con la membrana de ultrafiltración (Yilmaz y Bagci, 2019).

Tabla 28. Concentración de compuestos fenólicos totales (TPC), hidroxitirosol (HT), capacidad antioxidante, glucosa y manitol, porcentaje de rechazo y recuperación obtenidos tras la ultrafiltración y nanofiltración.

Muestra y parámetro	TPC*	HT	FRAP**	ABTS**	Glucosa	Manitol
Extracto inicial	4,68	0,45	5,04	10,4	4,29	4,77
Ultrafiltración 5 kDa^a						
Retenido (g/L)	5,38	0,44	6,03	11,41	3,85	5,38
Permeado (g/L)	2,86	0,41	3,16	5,44	3,75	3,67
% Retención	38,93	8,90	37,3	47,54	12,59	23,06
% Recuperación	26,89	40,09	27,59	23,02	38,46	33,85
Nanofiltración 150-300 Da^b (17 bar)						
Retenido (g/L)	2,61	0,58	2,51	4,48	4,08	3,78
Permeado (g/L)	2,17	0,41	2,09	3,61	2,91	3,49
% Retención	24,02	0,00	33,86	33,64	22,36	4,90
% Recuperación	6,07	8,00	5,29	5,31	6,21	7,61
Nanofiltración 150-300 Da^b (25 bar)						
Retenido (g/L)	2,59	0,58	2,45	4,02	3,11	3,66
Permeado (g/L)	2,12	0,41	2,12	3,51	3,04	2,50
% Retención	25,87	0,00	32,91	35,47	18,93	4,63
% Recuperación	7,24	11,32	6,20	5,91	6,63	7,98

^aTras la ultrafiltración (1 L) se obtienen 560 mL de retenido y 440 mL de permeado. ^bTras la nanofiltración (250 mL) se obtienen 230 mL de retenido y 20 mL de permeado. ^cTras la nanofiltración (250 mL) se obtienen 210 mL de retenido y 20 mL de permeado; *expresado como gramos de GAE/L; **expresado como gramos de TE/L.

En el proceso de **nanofiltración**, el TPC y los valores de concentración de hidroxitirosol, manitol y actividad antioxidante en el retenido y permeado a una presión de 17 bares fueron muy similares a los obtenidos con 25 bares (Tabla 28). Al igual que con la ultrafiltración, los porcentajes de retención dependieron de los compuestos estudiados, variando entre un 0% (hidroxitirosol) y 25,87% (TPC). Sin embargo, el valor de recuperación de hidroxitirosol en el permeado fue bajo, 8,0% y 11,3%, a presiones de 17 y 25 bares, respectivamente, debido a que se obtuvo un volumen de permeado también bajo en las condiciones aplicadas. Esto podría deberse a que se observó una caída del flujo probablemente ocasionada por el fenómeno del “fouling” o ensuciamiento como efecto del incremento de los compuestos retenidos, debido a un efecto combinado de

deposición de partículas en la membrana y el bloqueo de poros que incrementarían la resistencia al paso del flujo de permeado y provocaría la disminución del mismo (Muñoz et al., 2021).

En este trabajo la separación del hidroxitirosol de la glucosa y el manitol no fue satisfactoria debido a la dificultad para separar estos compuestos al presentar pesos moleculares similares. Esto concuerda con el estudio de Sygouni et al. (2019) cuando emplearon membranas basadas en poliamida y alpechín. Otros autores también han observado valores bajos de retención para el hidroxitirosol, menores del 25%, empleando nanofiltración y membrana compuestas de poliamida (Sánchez-Arévalo et al., 2021; Tundis et al., 2020). Sin embargo, los valores de retención de los azúcares fueron muy superiores a los obtenidos en este trabajo, del orden del 80%, lo que favoreció su separación (Sánchez-Arévalo et al., 2021).

El porcentaje de retención de los compuestos fenólicos depende de su tamaño molecular. Estudios previos han mostrados que el rechazo de los compuestos fenólicos en membranas de nanofiltración va desde menos del 10% hasta 100% cuando se incrementa el peso molecular de 125–200 Da a 1000 Da (Tundis et al., 2020; Yammine et al., 2019). En cuanto al rechazo de azúcares, el valor depende del tipo de la membrana y su grado de obstrucción, del peso molecular del carbohidrato y de la concentración de las especies químicas en la muestra (Saha et al., 2019; Muñoz et al., 2021). Por ejemplo, estos autores han descrito valores de rechazo de glucosa comprendidos entre 58% y 100% al emplear la membrana NF_x 150-300 en la nanofiltración de extractos orujo de uva y caña de azúcar, respectivamente.

4.4.2. Extracción líquido-líquido. Materiales adsorbentes y resinas

4.4.2.1. Procedimiento experimental

A la vista de los resultados obtenidos con la tecnología de membranas, se evaluó la extracción líquido-líquido con acetato de etilo y extracción en fase sólida con materiales adsorbentes y resinas. Estas técnicas también se han empleado para purificar compuestos fenólicos a partir de extractos de orujo y alpechín (Britton et al., 2019; Fernández-Prior et al., 2020).

La **extracción con acetato de etilo** se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Gullón et al. (2017) con algunas modificaciones. Se empleó acetato de etilo como

agente de extracción en una proporción de 2:1 (v/v) y se realizaron dos etapas de extracción de forma secuencial. Los extractos purificados obtenidos se mezclaron, se secaron y se redisolviaron en metanol:agua (50:50, v/v).

Por otro lado, se emplearon diversos **materiales adsorbentes y resinas** con diferente composición química y propiedades (Tabla 29). Los materiales C18, C8 (DSC8) y HLB se usan, generalmente, para purificar compuestos orgánicos en aplicaciones analíticas y las resinas poliméricas Microionex MB 200, XAD 7HP, XAD 16N, Macronet MN 202 y Purosorb PAD 910 se aplican en la industria alimentaria y farmacéutica.

Para llevar a cabo este estudio, cada material se añadió en un cartucho (1 g) y se acondicionó pasando 15 mL de metanol y 30 mL de agua a pH 3,6. A continuación, se pasaron 5,5 mL del extracto acuoso de orujillo y se llevaron a cabo dos procedimientos de elución. Como primer método, se realizó una primera elución con 5,5 mL de agua y, posteriormente, con 11 mL de metanol, que es un disolvente que se suele aplicar para recuperar los compuestos fenólicos adsorbidos (Cádiz-Gurrea et al., 2019) (Figura 29). En un segundo método, se llevó a cabo un fraccionamiento siguiendo el método descrito por otros autores (Cádiz-Gurrea et al., 2019; Monagas et al., 2003), con algunas modificaciones. Tras la elución con agua destilada, se secó el cartucho y se realizó una elución con 11 mL de acetato de etilo y, finalmente, se llevó a cabo una elución con metanol (11 mL) (Figura 29).

Tabla 29. Materiales adsorbentes y resinas de intercambio iónico empleadas para la purificación de compuestos fenólicos.

Material	Casa comercial	Detalles del material y características	Tamaño de poro (Å)	Tamaño de partícula (µm)	Superficie* (m ²)	Volumen* (cm ³)
Adsorbentes						
Finisterre C18	Teknokroma Analítica, Barcelona, Spain	Fase inversa, una de las fases más hidrofóbicas. Matriz: sílice. Grupo activo de la matriz: grupos octadecilo	60	50	-	2,8
Discovery DSC-8	Sigma Aldrich, St, Louis, MO, USA	Fase inversa, utilizada para eluir moléculas hidrofóbicas grandes. Matriz: sílice. Grupo activo de la matriz: grupos octilo	70	50	480	1,6
Supel-Select HLB	Sigma Aldrich, St, Louis, MO, USA	Retención basada predominantemente en la fase inversa, sin embargo, debido a que la fase está modificada con grupos hidrofílicos, también puede interaccionar con compuestos polares. Matriz: partículas de polímero de estireno modificado hidrófilo. Grupo activo de la matriz: fase de poliestireno	80-200	50-70	160-420	1,3
Resinas						
Microionex MB200	Rohm and Hass Madrid, Spain	Resina de intercambio iónico formada por una mezcla de polvo de aniones y cationes (H ⁺ /OH ⁻)	-	-	-	1,8
Amberlite XAD7HP	Sigma Aldrich, St, Louis, MO, USA	Resina macroreticular no iónica que adsorbe y libera especies iónicas a través de interacciones hidrofóbicas y polares. Matriz: polímero acrílico alifático	90	560-710	380	1,8
Amberlite XAD16N	Sigma Aldrich, St, Louis, MO, USA	Resina polimérica adsorbente. Un polímero no iónico, hidrofóbico y reticulado que obtiene sus propiedades de adsorción de su estructura macroporosa. Matriz: estireno-divinilbenceno	100	560-710	800	1,8
Macronet MN202	Purolite, Brasov, Romanía	Resina de intercambio iónico. Hidrofobicidad moderada. Matriz: Poliestireno macroporoso reticulado con divinilbenceno	220	300-1200	950	1,8
Purosorb PAD910	Purolite, Brasov, Romanía	Resina adsorbente, forma no iónica. Matriz: poliestireno macroporoso	170	350-1200	500	1,8

*1 g de material adsorbente.

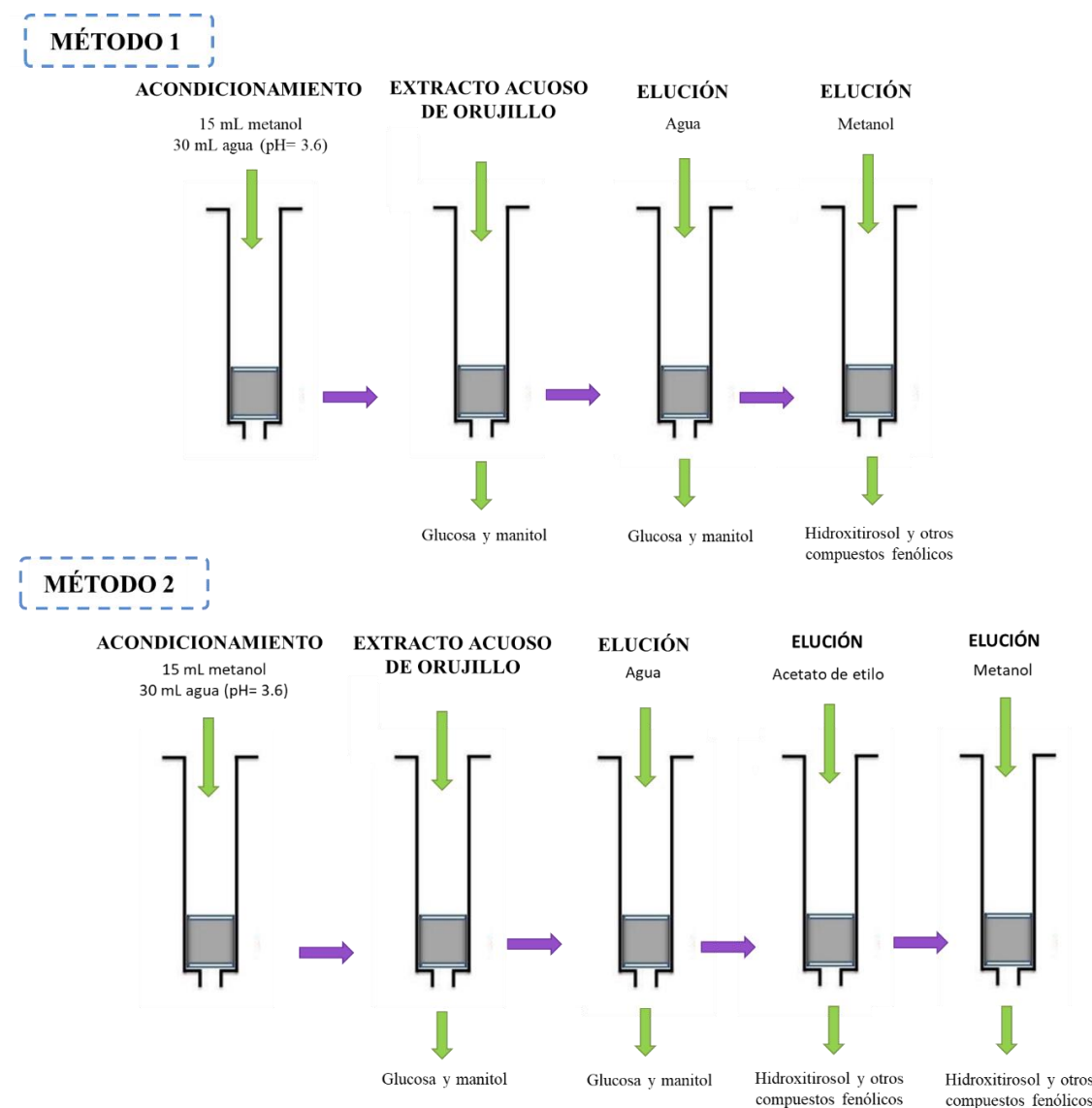


Figura 58. Métodos empleados para la purificación de compuestos fenólicos mediante extracción en fase sólida empleando diferentes materiales adsorbentes y resinas.

Se evaluó el TPC, la concentración de hidroxitirosol, la actividad antioxidante (FRAP y ABTS) y la concentración de azúcares, específicamente, glucosa y manitol en los diferentes eluyentes obtenidos.

Se estimó el porcentaje de recuperación como:

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Cantidad recuperada tras la elución (g)}}{\text{Cantidad en el extracto inicial de orujillo (g)}} \times 100$$

Tras pasar el extracto de orujillo por los materiales adsorbentes y resinas, se estimó el porcentaje de adsorción/retención como:

$$\text{Adsorción/Retención (\%)} = 100 - \% \text{ recuperación}$$

El porcentaje de adsorción corresponde a la cantidad de compuestos que interaccionaron con el material adsorbente o con las resinas, independientemente de si se recogieron en los siguientes pasos de elución (Trikas et al., 2017).

4.4.2.2. Recuperación de compuestos fenólicos totales e hidroxitirosol

En el caso de la **extracción líquido-líquido**, se consiguió recuperar en el extracto de acetato de etilo un 28,2% de los compuestos fenólicos (Tabla 3) y un 88,8% del hidroxitirosol (Tabla 4) presente en el extracto inicial de orujillo. Esto indica que este método de purificación fue muy selectivo para este compuesto fenólico en concreto. Gullón et al. (2017) empleando este mismo tipo de extracción, observaron diferentes selectividades en compuestos fenólicos del sarmiento. Similarmente, Allouche et al. (2004) emplearon este tipo de extracción con un sistema continuo en contracorriente de tres etapas para recuperar hidroxitirosol de aguas residuales de almazara, logrando una recuperación de 85%.

Por otra parte, el extracto purificado de acetato de etilo obtenido, presentó una pureza (por gramo de extracto) de 253,0 mg compuestos fenólicos (Figura 30a) y 110,0 mg hidroxitirosol (Figura 30b). Esto supone una concentración de compuestos fenólicos e hidroxitirosol alrededor de 2 y 7 veces superior a la del extracto original, respectivamente. Es de destacar que con este tipo de extracción se consiguió una pureza similar a la obtenida a partir de un extracto de orujo purificado mediante separación con membranas (microfiltración, ultrafiltración y nanofiltración) seguida de ósmosis inversa y cromatografía (115,2 mg hidroxitirosol/g extracto) (Luzi et al., 2021). Estos resultados indican que la extracción líquido-líquido se podría aplicar como estrategia alternativa al proceso de purificación por membranas, que es costoso (Croxatto et al., 2021).

Tabla 30. Recuperación de TPC tras la extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida del extracto de orujillo con materiales adsorbentes y resinas.

Tipo de extracción		Muestra tras extracción/ adsorción (%)	Adsorción/Retención (%) ¹	Recuperación en eluyentes			
				Agua (%)	Acetato de etilo (%) ²	Metanol (%)	Acetato de etilo + metanol (%)
Extracción líquido-líquido		52,77 ± 2,93	-	-	28,18 ± 0,59	-	
Adsorbentes							
C18	Método 1	20,01 ± 0,03	79,99	5,14 ± 0,10	-	45,38 ± 0,03	45,38 ± 0,03
	Método 2				24,90 ± 0,01	17,36 ± 0,03	42,26 ± 0,03
DSC-8	Método 1	26,93 ± 0,04	73,07	8,60 ± 0,05	-	49,13 ± 0,06	49,13 ± 0,06
	Método 2				25,51 ± 0,01	13,64 ± 0,03	39,15 ± 0,03
HLB	Método 1	15,45 ± 0,04	84,55	10,35 ± 0,02	-	49,77 ± 0,02	49,77 ± 0,02
	Método 2				11,93 ± 0,01	22,30 ± 0,01	34,23 ± 0,01
Resinas							
Microionex MB200	Método 1	5,20 ± 0,02	94,80	4,58 ± 0,01	-	12,48 ± 0,01	12,48 ± 0,01
	Método 2				4,04 ± 0,00	7,47 ± 0,01	11,51 ± 0,01
Amberlite XAD7HP	Método 1	47,96 ± 0,08	52,04	6,73 ± 0,01	-	30,53 ± 0,02	30,53 ± 0,02
	Método 2				19,50 ± 0,01	7,20 ± 0,03	26,70 ± 0,03
Amberlite XAD16N	Método 1	54,50 ± 0,17	45,50	2,32 ± 0,01	-	18,69 ± 0,03	18,69 ± 0,03
	Método 2				10,48 ± 0,00	10,61 ± 0,01	21,09 ± 0,01
Macronet MN02	Método 1	52,46 ± 0,25	45,54	2,29 ± 0,06	-	32,75 ± 0,06	32,75 ± 0,06
	Método 2				17,16 ± 0,03	11,70 ± 0,08	28,86 ± 0,08
Purolite PAD910	Método 1	46,51 ± 0,13	53,49	4,03 ± 0,07	-	26,18 ± 0,05	26,18 ± 0,05
	Método 2				18,01 ± 0,03	8,75 ± 0,05	26,76 ± 0,05

¹Porcentaje de compuestos adsorbidos/retenidos. ²Eluyente en el caso de extracción en fase sólida o extractante en el caso de extracción líquido-líquido.

Cuando se emplearon **materiales adsorbentes y resinas**, los porcentajes de adsorción/retención de compuestos fenólicos totales, incluyendo el hidroxitirosol, dependieron en gran medida del material empleado (Cádiz-Gurrea et al., 2019; Campone et al., 2020) (Tablas 30 y 31). Los porcentajes de adsorción más altos, 94,8% para TPC y 99,4% para hidroxitirosol, se obtuvieron con la resina Microionex MB200. Esto sugiere que las interacciones entre los compuestos fenólicos y esta resina iónica, que presenta grupos aniónicos y catiónicos, son más fuertes que con el resto de adsorbentes y resinas. De hecho, esta resina iónica se ha empleado para reducir eficientemente el contenido de inhibidores de fermentación, incluyendo compuestos fenólicos, en estudios conducentes a obtener bioetanol y xilitol a partir de biomasa del olivar (López-Linares et al., 2020b, 2020a; Negro et al., 2014). Sin embargo, se obtuvieron valores de recuperación bajos (menores del 13%) para estos compuestos con los eluyentes empleados en este estudio.

En el caso de los compuestos fenólicos, con los materiales adsorbentes C18, C8 y HLB se obtuvo una adsorción, superior al 70% en todos los casos, mientras que las resinas de intercambio iónico, presentaron valores de adsorción inferiores: entre 45% y 53%. En cambio, en el caso del hidroxitirosol los materiales adsorbentes empleados fueron mucho más eficientes y consiguieron una tasa de adsorción similar al valor máximo alcanzado con la resina Microionex MB200 (Tabla 31).

Las propiedades químicas del adsorbente, el diámetro de los poros y su superficie específica (m^2/g) son factores clave que influyen en la capacidad de adsorción (Rodrigues et al., 2017). Las propiedades químicas determinan el tipo de interacción que se produce entre los compuestos fenólicos y el material adsorbente o resina (da Costa Lopes et al., 2016; Trikas et al., 2017). Por ejemplo, en el caso de los materiales C18 y C8, la adsorción se realiza mediante fuertes interacciones no polares y también se pueden establecer enlaces de hidrógeno. En general, dichos adsorbentes presentaron más capacidad de adsorción que las resinas, a pesar de que algunas de éstas presentaban una mayor superficie específica y/o eran hidrofóbicas.

Por otra parte, la composición química de los extractos iniciales, el tipo de compuesto fenólico (p. ej. su polaridad) y las condiciones de adsorción empleadas (p. ej. el tiempo de contacto entre el extracto y la resina y de la proporción extracto/resina) también influyen en la eficiencia de adsorción (Campone et al., 2020; Çelik et al., 2021). Eso explicaría que, por ejemplo, se hayan descrito otros porcentajes de adsorción de

compuestos fenólicos con la resina XAD16N: ~30%-100% para extractos de naranja (Campone et al., 2020) y alpechín (Çelik et al., 2021).

Tabla 31. Recuperación de hidroxitirosol tras la extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida del extracto de orujillo con materiales adsorbentes y resinas.

Tipo de extracción		Muestra tras extracción/ adsorción (%)	Adsorción/Retención (%) ¹	Recuperación en eluyentes			
				Agua (%)	Acetato de etilo (%) ²	Metanol (%)	Acetato de etilo + metanol (%)
Extracción líquido-líquido		11,67 ± 0,02	-	-	88,83 ± 0,41	-	
Adsorbentes							
C18	Método 1	2,85 ± 0,09	97,15	11,72 ± 0,93	-	46,69 ± 0,65	46,69 ± 0,65
	Método 2				41,85 ± 1,78	0,79 ± 0,04	42,64 ± 1,78
DSC-8	Método 1	5,71 ± 0,08	94,29	16,56 ± 0,36	-	27,44 ± 0,84	27,44 ± 0,84
	Método 2				30,85 ± 2,22	0,65 ± 0,05	31,50 ± 2,22
HLB	Método 1	3,64 ± 0,56	96,36	5,50 ± 0,44	-	32,09 ± 1,76	32,09 ± 1,76
	Método 2				18,42 ± 0,32	2,80 ± 0,49	21,22 ± 0,59
Resinas							
Microionex MB200	Método 1	0,58 ± 0,21	99,42	6,35 ± 1,12	-	14,58 ± 0,75	14,58 ± 0,75
	Método 2				7,66 ± 0,54	8,73 ± 0,22	16,39 ± 0,58
Amberlite XAD7HP	Método 1	37,26 ± 2,59	62,74	9,67 ± 1,08	-	14,38 ± 1,40	14,38 ± 1,40
	Método 2				14,26 ± 1,02	1,38 ± 0,21	15,64 ± 1,04
Amberlite XAD16N	Método 1	47,68 ± 5,16	52,32	5,56 ± 0,08	-	15,20 ± 0,88	15,20 ± 0,88
	Método 2				12,13 ± 1,33	3,83 ± 2,88	15,96 ± 3,17
Macronet MN02	Método 1	33,23 ± 3,90	66,77	5,76 ± 0,53	-	22,44 ± 1,02	22,44 ± 1,02
	Método 2				17,80 ± 1,65	5,27 ± 0,31	23,07 ± 1,68
Purolite PAD910	Método 1	46,29 ± 2,86	53,71	8,66 ± 2,40	-	15,40 ± 0,19	15,40 ± 0,19
	Método 2				15,49 ± 0,31	2,47 ± 0,41	17,96 ± 0,51

¹Porcentaje de compuestos retenidos en el material adsorbente. ²Eluyente en el caso de extracción en fase sólida o extractante en el caso de extracción líquido-líquido.

Así, los valores de recuperación dependieron del material empleado y del eluyente. En general, se observó que el metanol (método 1) consiguió valores más altos de recuperación que el acetato de etilo (método 2) (Tablas 30 y 31) pero dio lugar a extractos purificados con menor contenido en TPC e hidroxitirosol (Figuras 59a y 59b). Es decir, este último disolvente fue más selectivo para los compuestos fenólicos que el metanol. En los extractos purificados con acetato de etilo, el TPC varió entre 151,6 (Microionex MB200) y 896,2 (DSC-8) mg GAE/g extracto (Figura 59a) y el hidroxitirosol entre 78,5 (Microionex MB200) y 298,7 (DSC-8) mg/g (Figura 59b). Remarcablemente, con la resina Microionex MB200, a pesar de presentar la recuperación más baja, se pudo obtener un extracto con una pureza de 403,5 mg de hidroxitirosol/g extracto empleando metanol como eluyente; es decir, con un contenido en hidroxitirosol 26 veces superior al del extracto de orujillo inicial.

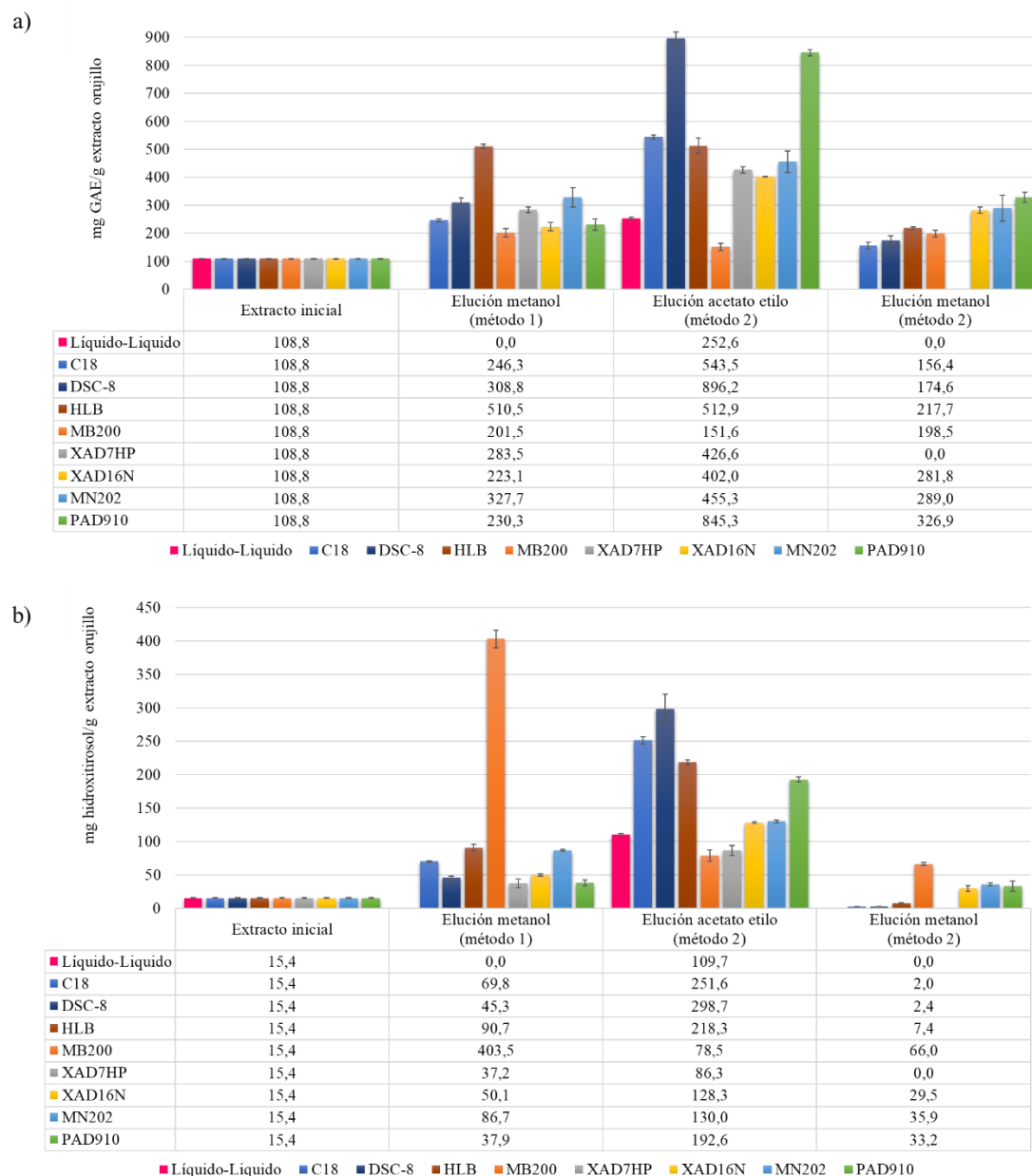


Figura 59. Contenido de compuestos fenólicos totales (a) y hidroxitirosol (b) (mg/g extracto) en los extractos purificados con materiales adsorbentes y resinas.

Algunos de estos materiales se han empleado para purificar hidroxitirosol en otros estudios. Fernández-Prior et al. (2020) obtuvieron a partir de alperujo, un extracto con 79 mg hidroxitirosol/g extracto partiendo de un contenido inicial de 53 mg/g extracto. Luzi et al. (2021) obtuvieron un extracto concentrado de orujo con 115,2 mg hidroxitirosol/g extracto, aunque fue necesaria una combinación de separación con membranas y cromatografía con una columna de tipo C18. Los resultados obtenidos con orujo en la presente Tesis Doctoral, podrían ser de interés para la industria ya que se obtuvieron

extractos enriquecidos en compuestos fenólicos del orujillo con todos los materiales empleados. Especialmente, el material Discovery DSC-8 ofreció el extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos (896,2 mg GAE/g de extracto) y un alto contenido en hidroxitirosol (298,7 mg/g de extracto) partiendo de una concentración inicial de 108,8 mg GAE/g extracto y 15,4 mg hidroxitirosol/g extracto, respectivamente.

Cabe decir que, el uso de acetato de etilo y metanol, empleados en la presente Tesis como eluyentes, está aceptado por el Real Decreto 1101/2011. Sin embargo, dado que el metanol y el etanol presentan una polaridad similar, resulta deseable el uso de este último por el carácter tóxico del metanol. En cualquier caso, estos disolventes podrían recuperarse y reutilizarse tras el paso de elución, reduciendo los costes de su empleo.

4.4.2.3. Evaluación de la actividad antioxidante

En el caso de la **extracción líquido-líquido**, el extracto de acetato de etilo obtenido presentó una actividad antioxidante de 313,0 y 496,0 mg de equivalentes de Trolox/g extracto, medida por FRAP y ABTS (Figuras 60a y 60), respectivamente; es decir, más del doble de la actividad antioxidante que presentaba el extracto de orujillo inicial.

Por otra parte, las fracciones con mayor actividad antioxidante se obtuvieron con el material adsorbente DSC-8 y la resina PAD910, empleando acetato de etilo como eluyente: FRAP, 925,4 y 901,1 mg de equivalentes de Trolox/g extracto, respectivamente, y ABTS, 2093,3 y 3226,3 mg de equivalentes de Trolox/g extracto, respectivamente (Figuras 60a y 60b). Por tanto, estos extractos purificados presentan mayor actividad antioxidante que el obtenido mediante extracción líquido/líquido con acetato de etilo, lo que podría deberse a su menor contenido en compuestos fenólicos.

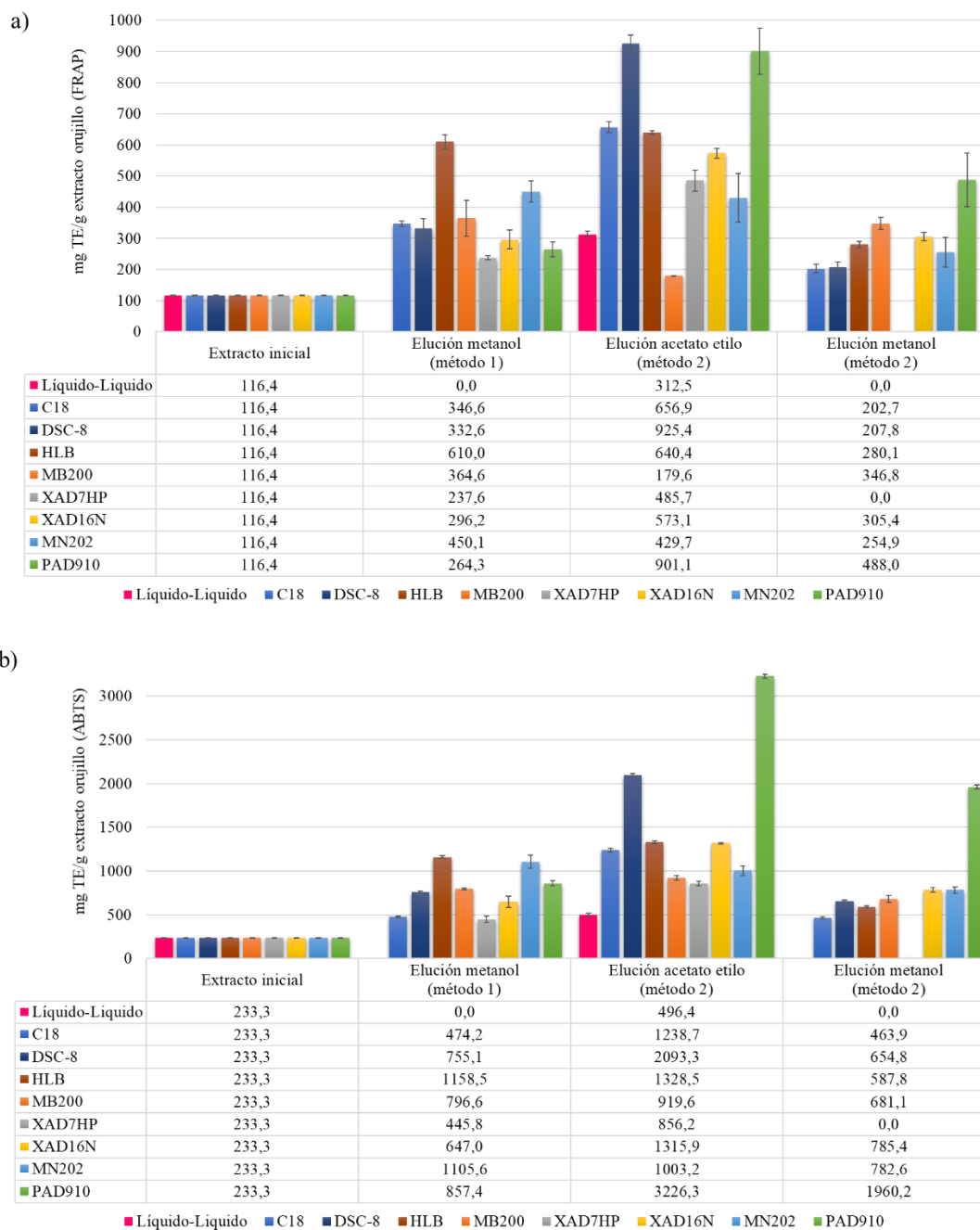


Figura 60. Actividad antioxidante FRAP (a) y ABTS(b) (mg/g extracto) en los extractos purificados obtenidos empleando materiales adsorbentes y resinas.

4.4.2.4. Evaluación de glucosa y manitol

La separación de los compuestos fenólicos de la glucosa y el manitol fue, en general, satisfactoria con la extracción líquido-líquido y con el empleo de materiales adsorbentes y resinas.

Tras la **extracción líquido-líquido**, la glucosa y manitol permanecían principalmente en el extracto acuoso. Así, en el extracto orgánico enriquecido en hidroxitirosol se había recuperado menos del 3% de estos compuestos, lo que indica una buena separación. Gullón et al. (2017) extrajeron licores de autohidrólisis de sarmientos con acetato de etilo para obtener una fase orgánica con compuestos fenólicos y actividad antioxidante y una fase acuosa enriquecida en oligosacáridos.

La retención de glucosa en los **materiales adsorbentes y resinas** fue generalmente baja, con valores de entre 10,4% (Amberlite XAD16N) y 37,8% (Microionex MB200), mientras que los valores para el manitol variaron entre 24,3% (C18) y 52,1% (Microionex MB200). Cuando se pasó agua por los adsorbentes se recuperó la mayor parte de estos compuestos mientras que la recuperación en los eluyentes orgánicos fue menor del 3% (Tablas 32 y 33).

Estos resultados no sólo son interesantes para la obtención de extractos ricos en hidroxitirosol que puedan ser empleados en el sector alimentario, farmacéutico y cosmético, sino que también son de aplicación en investigaciones analíticas si se requiere concentrar este compuesto para su detección, por ejemplo, en muestras biológicas. Por otra parte, en las fases acuosas, se recuperaría manitol, que es otro compuesto bioactivo de interés y, también, la glucosa. Como resumen, en la Figura 61 se muestra el contenido inicial de los compuestos estudiados en el extracto inicial y su enriquecimiento en los extractos purificados dependiendo del método de purificación.

Tabla 32. Recuperación de glucosa tras la extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida del extracto de orujillo con materiales adsorbentes y resinas.

Tipo de extracción		Muestra tras extracción/ adsorción (%)	Adsorción/ Retención (%) ¹	Recuperación en eluyentes			
				Agua (%)	Acetato de etilo (%) ²	Metanol (%)	Acetato de etilo + metanol (%)
Extracción líquido-líquido		91,98 ± 3,72	-	-	0,40 ± 0,10	-	
Adsorbentes							
C18	Método 1	76,09 ± 1,13	23,91	11,84 ± 0,51	-	2,78 ± 0,40	2,78 ± 0,40
	Método 2				1,23 ± 0,13	1,40 ± 0,15	2,63 ± 0,14
DSC-8	Método 1	81,62 ± 2,69	18,38	16,01 ± 0,72	-	1,40 ± 0,47	1,40 ± 0,47
	Método 2				1,26 ± 0,23	1,10 ± 0,12	2,36 ± 0,24
HLB	Método 1	66,12 ± 0,80	33,88	30,27 ± 1,27	-	2,01 ± 0,10	2,01 ± 0,10
	Método 2				2,67 ± 0,01	0,58 ± 0,02	3,25 ± 0,02
Resinas							
Microionex MB200	Método 1	62,22 ± 1,72	37,78	12,21 ± 1,97	-	0,26 ± 0,02	0,26 ± 0,02
	Método 2				0,08 ± 0,05	0,20 ± 0,02	0,28 ± 0,05
Amberlite XAD7HP	Método 1	87,89 ± 3,22	12,11	10,27 ± 2,85	-	1,66 ± 0,23	1,66 ± 0,23
	Método 2				1,07 ± 0,10	0,38 ± 0,05	1,45 ± 0,10
Amberlite XAD16N	Método 1	89,61 ± 0,86	10,39	6,82 ± 1,16	-	2,64 ± 0,19	2,64 ± 0,19
	Método 2				1,30 ± 0,37	0,97 ± 0,23	2,27 ± 0,42
Macronet MN02	Método 1	86,62 ± 1,57	13,38	9,13 ± 1,70	-	2,99 ± 0,20	2,99 ± 0,20
	Método 2				1,10 ± 0,39	1,27 ± 0,00	2,37 ± 0,39
Purolite PAD910	Método 1	87,42 ± 1,04	12,58	10,20 ± 0,96	-	2,28 ± 0,04	2,28 ± 0,04
	Método 2				1,26 ± 0,00	0,94 ± 0,11	2,20 ± 0,11

¹Porcentaje de compuestos retenidos en el material adsorbente. ²Eluyente en el caso de extracción en fase sólida o extractante en el caso de extracción líquido-líquido.

Tabla 33. Recuperación de manitol tras la extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida del extracto de orujillo con materiales adsorbentes y resinas.

Tipo de extracción		Muestra tras extracción/ adsorción (%)	Adsorción/Retención (%) ¹	Recuperación en eluyentes			
				Agua (%)	Acetato de etilo (%) ²	Metanol (%)	Acetato de etilo + metanol (%)
Extracción líquido-líquido		77,05 ± 4,53	-	-	2,40 ± 0,80	-	
Adsorbentes							
C18	Método 1	75,66 ± 2,44	24,34	13,21 ± 0,45	-	0,72 ± 0,06	0,72 ± 0,06
	Método 2				0,37 ± 0,04	0,33 ± 0,02	0,70 ± 0,04
DSC-8	Método 1	67,96 ± 3,61	32,04	12,94 ± 1,06	-	1,11 ± 0,00	1,11 ± 0,00
	Método 2				0,51 ± 0,01	0,59 ± 0,06	1,10 ± 0,06
HLB	Método 1	54,79 ± 4,71	45,21	26,13 ± 1,99	-	1,18 ± 0,14	1,18 ± 0,14
	Método 2				0,34 ± 0,00	0,39 ± 0,03	0,73 ± 0,03
Resinas							
Microionex MB200	Método 1	47,94 ± 1,40	52,06	12,93 ± 0,87	-	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,02
	Método 2				0,05 ± 0,03	0,22 ± 0,10	0,27 ± 0,10
Amberlite XAD7HP	Método 1	64,88 ± 3,50	35,02	9,91 ± 2,27	-	1,12 ± 0,16	1,12 ± 0,16
	Método 2				0,59 ± 0,19	0,16 ± 0,08	0,75 ± 0,19
Amberlite XAD16N	Método 1	66,59 ± 2,92	33,41	8,55 ± 0,78	-	1,63 ± 0,07	1,63 ± 0,07
	Método 2				0,78 ± 0,27	0,21 ± 0,13	0,99 ± 0,29
Macronet MN02	Método 1	66,22 ± 7,64	33,78	10,88 ± 1,36	-	1,71 ± 0,29	1,71 ± 0,29
	Método 2				0,77 ± 0,32	0,62 ± 0,32	1,39 ± 0,32
Purolite PAD910	Método 1	66,43 ± 3,52	33,57	12,23 ± 1,41	-	1,26 ± 0,18	1,26 ± 0,18
	Método 2				0,68 ± 0,01	0,54 ± 0,03	1,22 ± 0,03

¹Porcentaje de compuestos retenidos en el material adsorbente. ²Eluyente en el caso de extracción en fase sólida o extractante en el caso de extracción líquido-líquido.

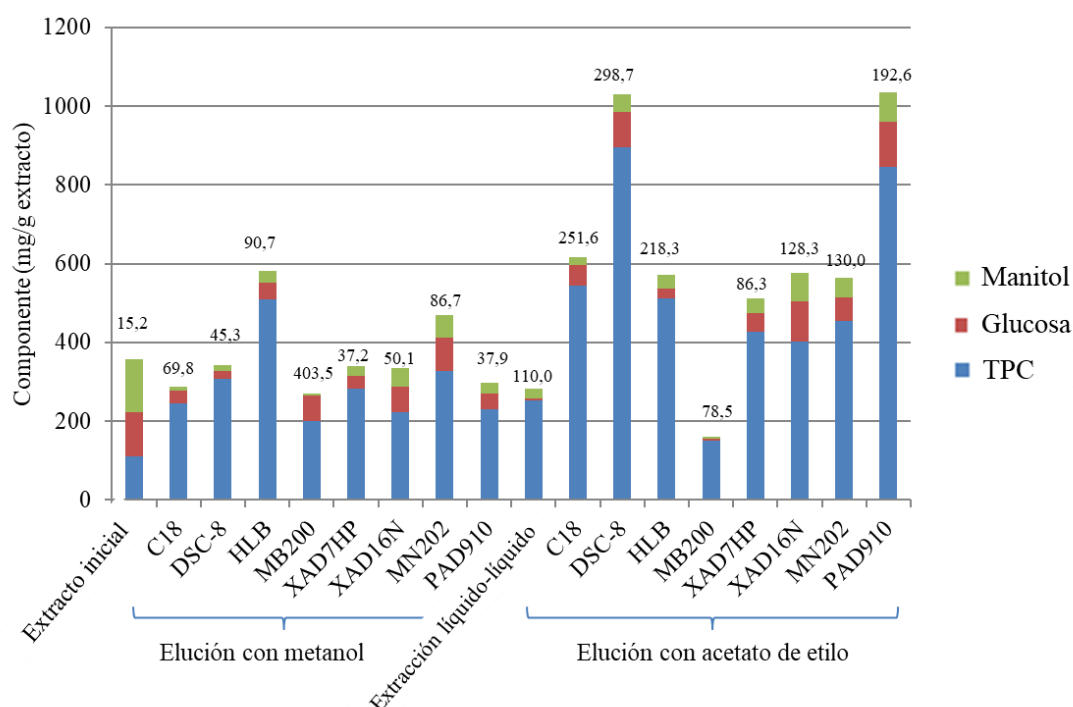


Figura 61. Resumen de la composición de los extractos purificados: contenido de fenoles totales (TPC), contenido de glucosa y manitol (barras) y contenido de hidroxitirosol (número encima de cada barra).

4.4.2.5. Perfil de compuestos fenólicos de los extractos purificados

Los perfiles cromatográficos, a 280 nm, de los extractos purificados variaron ligeramente dependiendo del método de purificación, aunque en todos ellos se identificó el hidroxitirosol como el principal compuesto. A modo de ejemplo, la Figura 62 muestra cromatogramas correspondientes al extracto de orujillo purificado por extracción líquido-líquido, y con diferentes materiales adsorbentes y resinas. En un estudio posterior la caracterización de las fracciones mediante espectrometría de masas permitiría conocer la distribución de los diferentes compuestos fenólicos del extracto de orujillo, dado que actualmente no existe literatura disponible al respecto.

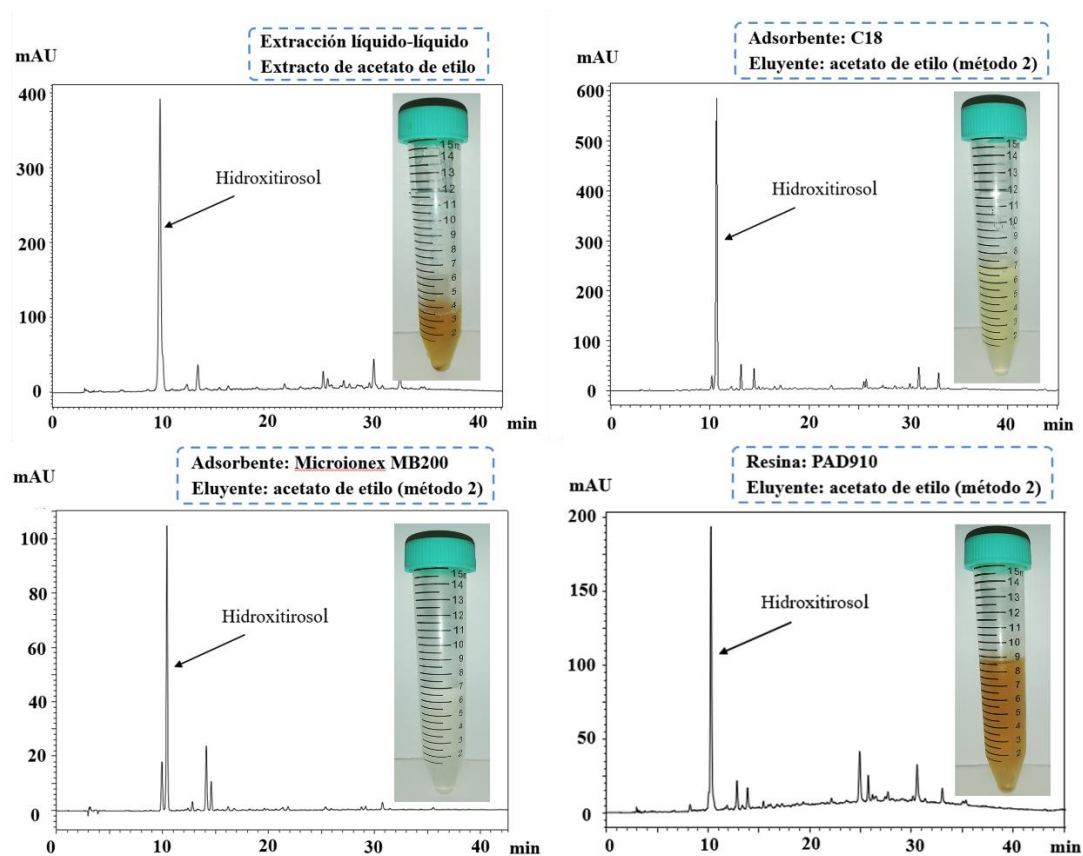


Figura 62. Cromatogramas (280 nm) de extractos purificados mediante diferentes técnicas.

4.5. Propuesta de valorización del orujillo

En términos generales, teniendo en cuenta los resultados de apartados anteriores en cuanto a propiedades antioxidantes de los extractos y de los licores de pretratamiento, así como la recuperación de glucosa por hidrólisis enzimática, se propone finalmente un esquema global de valorización del orujillo siguiendo el esquema de biorrefinería propuesto en la Figura 63. De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, este proceso consistiría en una etapa de extracción acuosa (85°C, 90 min, 10% sólidos) para obtener un extracto líquido rico en hidroxitirosol (15,4 mg/g extracto) que se puede purificar por adsorción (Discovery DSC-8) y elución con acetato de etilo. Esta etapa de purificación permitiría obtener un extracto fenólico concentrado en hidroxitirosol (298,7 mg/g extracto), que puede emplearse en la industria como antioxidante natural o para la formulación de cosméticos, nutracéuticos, etc. El extracto podría someterse a una etapa de cromatografía líquida si se desea obtener compuestos con una mayor pureza.

El orujillo extraído puede someterse a una maceración con etanol para recuperar ácidos triterpénicos (T^a ambiente, 24 h, 10% carga de sólido, 150 rpm) y a continuación, ser deslignificado con etanol al 50% (v/v) (catalizado con ácido sulfúrico 1%, v/v) a 130°C durante 60 min. Del licor de pretratamiento, se obtendría una lignina antioxidante, recuperada mediante precipitación ácida, con una pureza cercana al 90%, rica en unidades G (L1). Por otra parte, la fracción sólida enriquecida en celulosa se hidrolizaría enzimáticamente generando dos corrientes, un hidrolizado rico en glucosa, que puede servir como molécula plataforma para obtener productos de valor añadido o para producción de bioetanol, y un sólido rico en lignina (78% pureza), con propiedades

antioxidantes (L2). Ambas ligninas pueden emplearse para la obtención de derivados aromáticos.

Este esquema de proceso supone el aprovechamiento integral del orujillo mediante fraccionamiento y valorización de sus principales componentes. En el marco de un modelo de economía circular, esta propuesta contribuye a la gestión sostenible de esta biomasa residual y a una producción responsable de compuestos químicos renovables, capaces de reemplazar a compuestos químicos de origen fósil.

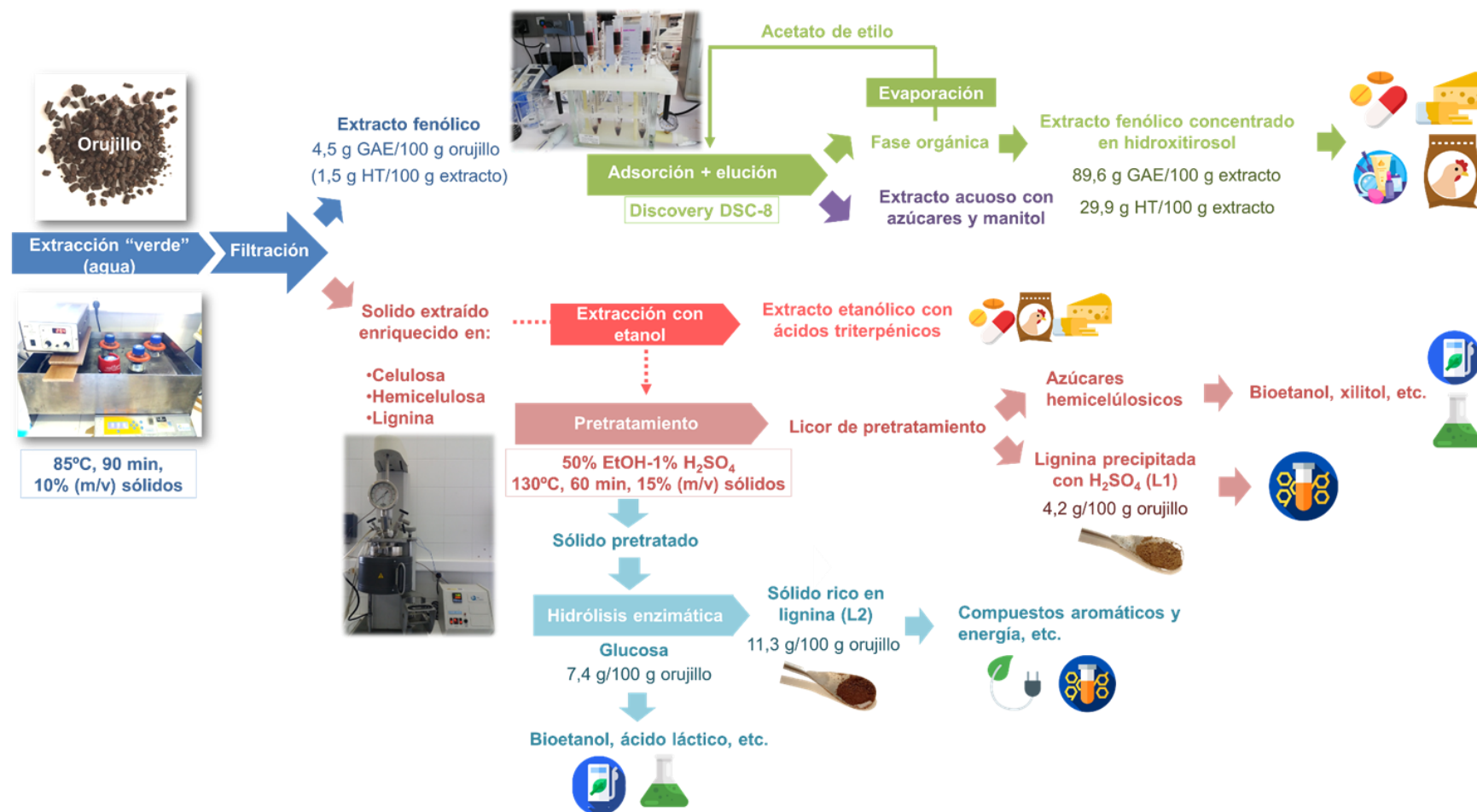


Figura 63. Propuesta de biorrefinería a partir de orujillo.

GAE: Equivalentes de ácido gálico; HT: hidroxitirosol.

5. CONCLUSIONES

Como resultado del trabajo de investigación que constituye esta Tesis Doctoral, se puede concluir que:

1. El orujillo es un residuo lignocelulósico con potencial para la obtención de compuestos bioactivos como el hidroxitirosol, manitol y ácido maslínico a partir de su fracción de extractivos, lignina con propiedades antioxidantes y azúcares a partir de sus fracciones de celulosa y hemicelulosa.
2. El agua es un disolvente eficaz para la extracción de compuestos bioactivos del orujillo.
3. El hidroxitirosol destaca en el perfil fenólico de los extractos de orujillo como principal compuesto antioxidante.
4. El perfil fenólico de los extractos de acetona muestra algunas diferencias respecto a los compuestos minoritarios, lo que podría explicar su mayor actividad antioxidante frente a los extractos acuosos.
5. El empleo de agua como solvente, tanto en extracción convencional (85°C, 90 min, 15% sólidos) como con ultrasonidos tipo sonda de alta potencia (80% amplitud, 16 min, 11,5% sólidos), rinde la mayor recuperación de hidroxitirosol, 6,3 mg/g orujillo, lo que se justifica por el carácter polar de dicho compuesto.
6. La extracción con ultrasonidos tipo sonda de baja potencia, empleando acetona como disolvente, rinde el extracto con mayor concentración en compuestos fenólicos totales (expresado como equivalentes de ácido gálico), 45,4 mg/g orujillo), aunque muy similar al obtenido con la extracción acuosa convencional (44,5 mg/g orujillo).
7. El empleo de ultrasonidos tipo sonda y microondas suponen una reducción considerable en el tiempo de extracción, entre 12 y 16 min, frente a la extracción en baño de ultrasonidos (43 min) y la extracción acuosa convencional (90 min).
8. Una segunda etapa de extracción con etanol permite la obtención de otros compuestos bioactivos de interés como son los ácidos triterpénicos, ácido maslínico y ácido oleanólico.

9. La deslignificación del orujillo con etanol al 50% (v/v), catalizado con ácido sulfúrico 1% (v/v) a 130°C durante 60 min, permite la obtención de un licor con azúcares fermentables y una lignina antioxidante de elevada pureza (90%), rica en unidades G, además de una fracción sólida enriquecida en celulosa.
10. La hidrólisis enzimática del orujillo deslignificado permite la obtención de un hidrolizado de glucosa y un sólido rico en lignina (78% pureza), con propiedades antioxidantes.
11. La purificación del extracto acuoso de orujillo mediante adsorción (Discovery DSC-8) resultó altamente eficaz al rendir un extracto 19 veces más concentrado que el original, con una concentración final en hidroxitirosol de 298,7 mg/g extracto.
12. La propuesta de biorrefinería planteada para el orujillo conlleva la integración de la obtención de compuestos bioactivos, a partir de sus fracciones de extractivos, y lignina junto con la obtención de azúcares fermentables y manitol.

CONCLUSIONS

As a result of this research, the following conclusions can be drawn:

1. Exhausted olive pomace is a lignocellulosic waste with potential for obtaining bioactive compounds such as hydroxytyrosol, mannitol and maslinic acid from its extractive fraction, lignin with antioxidant properties and sugars from cellulose and hemicellulose.
2. Water is an effective solvent for the extraction of bioactive compounds from exhausted olive pomace.
3. Hydroxytyrosol is the main antioxidant compound in the phenolic profile of the exhausted olive pomace extracts.
4. The phenolic profile of acetone extracts shows some differences with respect to the minor compounds, which could explain its higher antioxidant activity compared to aqueous extracts.
5. The use of water as solvent, both in conventional extraction (85°C, 90 min, 15% solids) and high-power probe-type ultrasound-assisted extraction (80% amplitude, 16 min, 11.5% solids), yields the highest hydroxytyrosol recovery, 6.3 mg/g biomass, which is attributed to its polar character.
6. Low-power probe-type ultrasound-assisted extraction, using acetone as solvent, yields the extract with the highest concentration of total phenolic compounds, 45.4 mg phenols/g biomass (expressed as gallic acid equivalents), although very similar to that obtained with conventional aqueous extraction, 44.5 mg phenols/g biomass (expressed as gallic acid equivalents).
7. Probe-type ultrasound and microwave-assisted extraction means a considerable reduction in extraction time, between 12 and 16 min, compared to bath-type ultrasound-assisted extraction (43 min) and conventional aqueous extraction (90 min).
8. A second extraction step with ethanol allows recovering other interesting bioactive compounds such as triterpenic acids, maslinic and oleanolic acid.
9. Delignification of the exhausted olive pomace using 50% (v/v) ethanol, catalyzed with 1% (v/v) sulfuric acid at 130°C for 60 min, yields a liquor containing fermentable sugars and an antioxidant lignin of high purity (90%),

rich in guaiacyl units, together with a cellulose-rich solid.

10. The enzymatic hydrolysis of the delignified exhausted olive pomace yields a glucose hydrolysate and a lignin-rich solid (78% purity), with antioxidant properties.
11. Purification of the aqueous extract by adsorption (Discovery DSC-8) was highly efficient, yielding an extract 19 times more concentrated than the original, with a hydroxytyrosol final concentration of 298.7 mg/g extract.
12. The proposed biorefinery for exhausted olive pomace integrates the production of bioactive compounds from both extractive and lignin fractions, fermentable sugars and mannitol.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AENOR. Asociación Española de Normalización y Certificación.
<http://www.aenor.es/aenor/inicio/home/home.asp> (fecha de acceso 12 de noviembre de 2021)
- AGROISA, 2021. ALPEOCEL. <https://agroisa.com/alpeocel> (fecha de acceso 25 de noviembre de 2021).
- Al Aani, S., Mustafa, T.N., Hilal, N., 2020. Ultrafiltration membranes for wastewater and water process engineering: A comprehensive statistical review over the past decade. *J. Water Process. Eng.* 35, 101241. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101241>
- Alamgir, A.N.M., 2018. Secondary metabolites: Secondary metabolic products consisting of C and H; C, H, and O; N, S, and P elements; and O/N heterocycles, in: *Therapeutic use of medicinal plants and their extracts: Volume 2*, (Ed. Rainsford, K.D.), Springer, EE.UU. New York. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92387-1_3
- Alara, O.R., Abdurahman, N.H., Ukaegbu, C.I., 2021. Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr. Res. Nutr. Food Sci.* 4, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Albuquerque, B.R., Heleno, S.A. 8., Oliveira, M.B.P.P., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., 2021. Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food Funct.* 12, 14–29. <https://doi.org/10.1039/d0fo02324h>
- Abu Tayeh, H.N., Azaizeh, H., Gerchman, Y., 2020. Circular economy in olive oil production – Olive mill solid waste to ethanol and heavy metal sorbent using microwave pretreatment. *Waste Manage.* 113, 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.06.017>
- Agnihotri, S., Johnsen, I.A., Bøe, M.S., Øyaas, K., Moe, S., 2015. Ethanol organosolv pretreatment of softwood (*Picea abies*) and sugarcane bagasse for biofuel and biorefinery applications. *Wood Sci. Technol.* 49, 881–896. <https://doi.org/10.1007/s00226-015-0738-4>
- Allouche, N., Fki, I., Sayadi, S., 2004. Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *J. Agric. Food Chem.* 52, 267–273. <https://doi.org/10.1021/jf034944u>
- Altemimi, A., Watson, D.G., Choudhary, R., Dasari, M.R., Lightfoot, D.A., 2016. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from peaches and pumpkins. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148758>
- Álvarez, A., Pizarro, C., García, R., Bueno, J.L., 2015. Spanish biofuels heating value estimation based on structural analysis. *Ind. Crops Prod.* 77, 983–991.

- <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.078>
- Alves-Ferreira, J., Lourenço, A., Morgado, F., Duarte, L.C., Roseiro, L.B., Fernandes, M.C., Pereira, H., Carvalheiro, F., 2021. Delignification of *Cistus ladanifer* biomass by organosolv and alkali processes. *Energies*. 14, 1127. <https://doi.org/10.3390/en14041127>
- Alvira, P., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Bioresource technology pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- Ameer, K., Chun, B.S., Kwon, J.H., 2017. Optimization of supercritical fluid extraction of steviol glycosides and total phenolic content from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves using response surface methodology and artificial neural network modeling. *Ind. Crops Prod.* 109, 672–685. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.023>
- Ammar, S., Contreras, M. del M., Gargouri, B., Segura-Carretero, A., Bouaziz, M., 2017. RP-HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS based metabolic profiling of the potential *Olea europaea* by-product “wood” and its comparison with leaf counterpart. *Phytochem. Anal.* 28, 217–229. <https://doi.org/10.1002/pca.2664>
- Anton Paar, 2021. Which microwave synthesis reactor is the best one for your research? <https://wiki.anton-paar.com/at-de/welcher-mikrowellen-synthesereaktor-ist-fuer-ihren-forschungsbereich-am-besten-geeignet/> (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021).
- Arciniegas Cabrera, V., 2020. Recuperación de compuestos bioactivos de subproductos de la industria alimentaria mediante el empleo de mezclas etanol/agua presurizadas. Universidad de Burgos. Máster en Seguridad y Biotecnología Alimentarias.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* 117, 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Bajpai, P., 2016. Background and general introduction, in: Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production, (Ed. Sharma, S.K.), Springer, EE.UU. New York. <https://doi.org/10.4324/9780429346644-1>
- Baker, P.W., Charlton, A., 2020. A comparison in protein extraction from four major crop residues in Europe using chemical and enzymatic processes-a review. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 59, 102239. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102239>

- Balbás de la Fuente, P., 2017. Selección de alternativas de proceso en la producción de biocombustibles oxigenados a partir de material lignocelulósico. Universidad de Valladolid. Máster en Ingeniería Industrial
- Ballesteros, I., Ballesteros, M., Cara, C., Sáez, F., Castro, E., Manzanares, P., Negro, M.J., Oliva, J.M., 2011. Effect of water extraction on sugars recovery from steam exploded olive tree pruning. *Bioresour. Technol.* 102, 6611–6616. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.077>
- Barroso Casillas, M., 2010. Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería. Universidad Politécnica Madrid.
- Baruah, J., Nath, B.K., Sharma, R., Kumar, S., Deka, R.C., Baruah, D.C., Kalita, E., 2018. Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. *Front. Energy Res.* 6, 147. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141>
- Bauer, M.C., Kruse, A., 2019. The use of dimethyl ether as an organic extraction solvent for biomass applications in future biorefineries: A user-oriented review. *Fuel*. 254, 115703. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.115703>
- Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., Kumar, S., 2014. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renew. Sust. Energy Rev.* 36, 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047>
- Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Alacaraz, M., 2002. Radioprotective effects *In vivo* of phenolics from *Olea europaea* L. leaves against X-ray-induced chromosomal damage: comparative study versus several flavonoids and sulfur-containing compounds. *J. Med. Food* 5, 125–135.
- Berbel, J., Posadillo, A., 2018. Review and analysis of alternatives for the valorisation of agro-industrial olive oil by-products. *Sustain.* 10, 237. <https://doi.org/10.3390/su10010237>
- Bertin, L., Ferri, F., Scoma, A., Marchetti, L., Fava, F., 2011. Recovery of high added value natural polyphenols from actual olive mill wastewater through solid phase extraction. *Chem. Eng. J.* 171, 1287–1293. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.05.056>
- Bertol, E., Vaiano, F., 2016. Assays for benzodiazepines, in: *Neuropathology of drug addictions and substance misuse*, (Ed. Preedy, V.R.). Elsevier, Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800634-4.00035-4>
- Bhatt, S.M., Shilpa, 2015. Lignocellulosic feedstock conversion, inhibitor detoxification and cellulosic hydrolysis – a review. *Biofuels*. 5, 633–649. <https://doi.org/10.1080/17597269.2014.1003702>

- Biesalski, H.K., Dragsted, L.O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P., Weber, P., 2009. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*. 25, 1202–1205. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.023>
- Binod, P., Janu, K.U., Sindhu, R., Pandey, A., 2011. Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production, in: *Biofuels*, (Ed. Pandey, A., Larroche, C., Gnansounou, E.), Elsevier, Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00010-3>
- BOE, 2021. BOE-A-2021-8447 Ley 7/2021, de 20 de mayo, de cambio climático y transición energética. https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2021-8447 (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021).
- Böhringer, C., 2003. The Kyoto Protocol: A review and perspectives. *Oxford Rev. Econ. Policy* 19, 451–466. <https://doi.org/10.1093/oxrep/19.3.451>
- Bolio-López, G., Valadez-Gonzalez, A., Veleza, L., Andreeva, A., 2011. Cellulose Whiskers from agro-industrial bananawaste: isolation and characterization. *Rev. Mex. Ing. Química* 10, 291–299.
- Bonifácio-Lopes, T., Teixeira, J.A., Pintado, M., 2019. Current extraction techniques towards bioactive compounds from brewer's spent grain—A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60, 2730–2741. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655632>
- Boronat, A., Mateus, J., Soldevila-Domenech, N., Guerra, M., Rodríguez-Morató, J., Varon, C., Muñoz, D., Barbosa, F., Morales, J.C., Gaedigk, A., Langohr, K., Covas, M.I., Pérez-Mañá, C., Fitó, M., Tyndale, R.F., de la Torre, R., 2019. Cardiovascular benefits of tyrosol and its endogenous conversion into hydroxytyrosol in humans. A randomized, controlled trial. *Free Radic. Biol. Med.* 143, 471–481. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.032>
- Boussetta, N., Vorobiev, E., Reess, T., De Ferron, A., Pecastaing, L., Ruscassié, R., Lanoisellé, J.L., 2012. Scale-up of high voltage electrical discharges for polyphenols extraction from grape pomace: Effect of the dynamic shock waves. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 16, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.05.004>
- Bouxin, F.P., David Jackson, S., Jarvis, M.C., 2014. Isolation of high quality lignin as a by-product from ammonia percolation pretreatment of poplar wood. *Bioresour. Technol.* 162, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.082>
- Britton, J., Davis, R., O'Connor, K.E., 2019. Chemical, physical and biotechnological approaches to the production of the potent antioxidant hydroxytyrosol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 5957–5974. <https://doi.org/10.1007/s00253-019->

09914-9

- Bu, J., Yan, X., Wang, Y.T., Zhu, S.M., Zhu, M.J., 2019. Co-production of high-gravity bioethanol and succinic acid from potassium peroxymonosulfate and deacetylation sequentially pretreated sugarcane bagasse by simultaneous saccharification and co-fermentation. *Energy Convers. Manag.* 186, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.02.038>
- Buckow, R., Schroeder, S., Berres, P., Baumann, P., Knoerzer, K., 2010. Simulation and evaluation of pilot-scale pulsed electric field (PEF) processing. *J. Food Eng.* 101, 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.06.010>
- Buratti, C., Mousavi, S., Barbanera, M., Lascaro, E., Cotana, F., Bufacchi, M., 2016. Thermal behaviour and kinetic study of the olive oil production chain residues and their mixtures during co-combustion. *Bioresour. Technol.* 214, 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.097>
- Cádiz-Gurrea, M., Fernández de las Nieves, I., Aguilera Saez, L.M., Fernández-Arroyo, S., Legeai-Mallet, L., Bouaziz, M., Segura-Carretero, A., 2019. Bioactive compounds from *Theobroma cacao*: Effect of isolation and safety evaluation. *Plant Foods Hum. Nutr.* 74, 40–46. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0694-x>
- Calderon-Bodevin, A., 2005. Obtencion de antecedentes experimentales para un tratamiento avanzado de adsorcion de EDTA en turba magallanica. Universidad Carólica de la Santísima Concepción. Grado académico de Licenciado en Química.
- Campone, L., Celano, R., Rizzo, S., Piccinelli, A.L., Rastrelli, L., Russo, M., 2020. Development of an enriched polyphenol (natural antioxidant) extract from orange juice (*Citrus sinensis*) by adsorption on macroporous resins. *J. Food Qual.* 2020, 1251957. <https://doi.org/10.1155/2020/1251957>
- Cantero, D.A., Garcia, J., Cocero, M.J., Bermejo, M., 2010. Nuevas tendencias en el diseño de procesos para aprovechamiento de residuos alimentarios dirigidas a conseguir una sociedad sostenible, in: Retos medioambientales de la industria alimentaria, (Ed. Instituto Tomás Pascual Sanz). International Marketing and Communication, Madrid, España
- Cara, C., Ruiz, E., Carvalheiro, F., Moura, P., Ballesteros, I., Castro, E., Gírio, F., 2012. Production, purification and characterisation of oligosaccharides from olive tree pruning autohydrolysis. *Ind. Crop. Prod.* 40, 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.017>
- Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M.J., Castro, E., 2008.

- Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel* 87, 692–700. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2007.05.008>
- Carrillo-Beltrán, R., Corpas-iglesias, F.A., Terrones-saeta, J.M., Bertoya-sol, M., 2021. New geopolymers from industrial by-products: Olive biomass fly ash and chamotte as raw materials. *Constr. Build. Mater.* 272, 121924. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.121924>
- Cassano, A., Conidi, C., Giorno, L., Drioli, E., 2013. Fractionation of olive mill wastewaters by membrane separation techniques. *J. Hazard. Mater.* 248–249, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.006>
- Castro, E., Nieves, I.U., Mullinnix, M.T., Sagues, W.J., Hoffman, R.W., Fernández-Sandoval, M.T., Tian, Z., Rockwood, D.L., Tamang, B., Ingram, L.O., 2014. Optimization of dilute-phosphoric-acid steam pretreatment of *Eucalyptus benthamii* for biofuel production. *Appl. Energy* 125, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.03.047>
- Çelik, G., Saygın, Ö., Akme Mehmet Balcıoğlu, I., 2021. Multistage recovery process of phenolic antioxidants with a focus on hydroxytyrosol from olive mill wastewater concentrates. *Sep. Purif. Technol.* 259, 117757. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117757>
- Cequier, E., Aguilera, J., Balcells, M., Canela-Garayoa, R., 2019. Extraction and characterization of lignin from olive pomace: a comparison study among ionic liquid, sulfuric acid, and alkaline treatments. *Biomass Convers. Biorefin.* 9, 241–252. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00400-w>
- Chanioti, S., Tzia, C., 2018. Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. *Innov. Food Sci. Emerging Technol.* 48, 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.07.001>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S., Abert-Vian, M., 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chen, X.Y., Gänzle, M.G., 2017. Lactose and lactose-derived oligosaccharides: More than prebiotics? *Int. Dairy J.* 67, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.10.001>
- Chiang, S.S., Liang, Z.C., Wang, Y.C., Liang, C.H., 2017. Effect of light-emitting diodes

- on the production of cordycepin, mannitol and adenosine in solid-state fermented rice by *Cordyceps militaris*. J. Food Compost. Anal. 60, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.03.007>
- Chin, D.W.K., Lim, S., Pang, Y.L., Lam, M.K., 2020. Fundamental review of organosolv pretreatment and its challenges in emerging consolidated bioprocessing. Biofuels, Bioprod. Bioref. 14, 808–829. <https://doi.org/10.1002/bbb.2096>
- Chohan, N.A., Aruwajoye, G.S., Sewsynker-Sukai, Y., Gueguim Kana, E.B., 2020. Valorisation of potato peel wastes for bioethanol production using simultaneous saccharification and fermentation: Process optimization and kinetic assessment. Renew. Energy 146, 1031–1040. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.07.042>
- Christoforou, E., Fokaides, P.A., 2016. A review of olive mill solid wastes to energy utilization techniques. Waste Manag. 49, 346–363. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.01.012>
- Chudzik, M., Korzonek-Szlacheta, I., Król, W., 2015. Triterpenes as potentially cytotoxic compounds. Molecules 20, 1610–1625. <https://doi.org/10.3390/molecules20011610>
- Conde, E., Cara, C., Moure, A., Ruiz, E., Castro, E., Domínguez, H., 2009. Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. Food Chem. 114, 806–812. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.017>
- Conidi, C., Cassano, A., Caiazzo, F., Drioli, E., 2017. Separation and purification of phenolic compounds from pomegranate juice by ultrafiltration and nanofiltration membranes. J. Food Eng. 195, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.09.017>
- Contreras, M. del M., Romero, I., Moya, M., Castro, E., 2020a. Olive-derived biomass as a renewable source of value-added products. Process Biochem. 97, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.013>
- Contreras, M. del M., Lama-Muñoz, A., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., Castro, E., 2020b. Valorization of olive mill leaves through ultrasound-assisted extraction. Food Chem. 314, 126218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126218>
- Contreras, M. del M., Gómez-Cruz, I., Romero, I., Castro, E., 2021. Olive pomace-derived biomasses fractionation through a two-step extraction based on the use of ultrasounds: Chemical characteristics. Foods 10, 111. [https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods10010111](https://doi.org/10.3390/foods10010111)
- CORDIS, 2020. Integration of PEF in food processing for improving food quality, safety and competitiveness. <https://cordis.europa.eu/project/id/635632/es> (fecha de

- acceso: 28 de noviembre de 2021).
- Costa, P., Grosso, C., Gonçalves, S., Andrade, P.B., Valentão, P., Bernardo-Gil, M.G., Romano, A., 2012. Supercritical fluid extraction and hydrodistillation for the recovery of bioactive compounds from *Lavandula viridis* L'Hér. Food Chem. 135, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.108>
- Croxatto, G., Sohn, J., Voogt, J., Birkved, M., Olsen, S.I., Nilsson, A.E., 2021. Insights from combining techno-economic and life cycle assessment – a case study of polyphenol extraction from red wine pomace. Resour. Conserv. Recycl. 167, 105318. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2020.105318>
- Crupi, R., Palma, E., Siracusa, R., Fusco, R., Gugliandolo, E., Cordaro, M., Impellizzeri, D., De Caro, C., Calzetta, L., Cuzzocrea, S., Di Paola, R., 2020. Protective effect of hydroxytyrosol against oxidative stress induced by the ochratoxin in kidney cells: in vitro and In vivo study. Front. Vet. Sci. 7, 136. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00136>
- Cuerda-Correa, E.M., 2016. Procesos de adsorción para descontaminación ambiental in Aplicaciones de adsorbentes y catalizadores en procesos medioambientales y energéticos, (Ed. Álvarez, M.A., Carrasco, F.).
- Cuevas, M., García, J.F., Hodaifa, G., Sánchez, S., 2015. Oligosaccharides and sugars production from olive stones by autohydrolysis and enzymatic hydrolysis. Ind. Crops Prod. 70, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.011>
- Cuevas, M., García Martín, J.F., Bravo, V., Sánchez, S., 2021. Ethanol production from olive stones through liquid hot water pre-treatment, enzymatic hydrolysis and fermentation. Influence of enzyme loading, and pre-treatment temperature and time. Fermentation 7,25. <https://doi.org/10.3390/fermentation7010025>
- da Costa Lopes, A.M., Brenner, M., Fale, P., Roseiro, B., Bogel-Lukasic, R., 2016. Extraction and purification of phenolic compounds from lignocellulosic biomass assisted by ionic liquid, polymeric resins, and supercritical CO₂. ACS Sustainable Chem. Eng. 4, 3357-3367. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00429>
- da Rosa, G.S., Vanga, S.K., Garipey, Y., Raghavan, V., 2019. Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.). Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 58, 102234. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102234>
- da Silva, R.P.F.F., Rocha-Santos, T.A.P., Duarte, A.C., 2016. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. Trends Anal. Chem. 76, 40–51.

- <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.013>
- Dávila, I., Gullón, B., Labidi, J., Gullón, P., 2019. Multiproduct biorefinery from vine shoots: Bio-ethanol and lignin production. *Renew. Energy* 142, 612–623. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.04.131>
- De Dietrich, 2021. Liquid liquid extraction. https://www.dedietrich.com/en/solutions-and-products/extraction/liquid/liquid-extraction?gclid=CjwKCAiAnO2MBhApEiwA8q0HYUBRpn-rU1l3v8LSBuBhKXel01Qkn4AXXRBWD1LxNxjreB7Zx-3zcRoCD0wQAvD_BwE (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021).
- de la Calle, I., Costas-Rodríguez, M., 2017. Microwaves for greener extraction, in: *The application of green solvents in separation processes*, (Ed. Pena-Pereira, F., Tobiszewski, M.), Elsevier, Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805297-6.00009-7>
- de la Casa, J.A., Castro, E., 2014. Recycling of washed olive pomace ash for fired clay brick manufacturing. *Constr. Build. Mater.* 61, 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2014.03.026>
- de la Rosa, J.L.M., Jiménez Herrera, B., Salmerón Rodríguez, E., Coletto, F.R., Zamorano, F.G., Caballero, F.L., 2010. *Agronomía y poda del olivar*, cuarta ed. España.
- de la Rosa, L.A., Moreno-Escamilla, J.O., Rodrigo-García, J., Alvarez-Parrilla, E., 2019. Phenolic compounds, in: *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables*, (Ed. Yahia, E.M.). Elsevier, Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>
- Delazar, A., Lutfun Nahar, S., Hamedeyazdan, S., D., S., 2012. Microwave-assisted extraction in natural products isolation, in: *Natural products isolation*, (Ed. Sarker, S.D., Nahar, L.), Springer, EE.UU. New York. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_5
- Deng, J., Xu, Z., Xiang, C., Liu, J., Zhou, L., Li, T., Yang, Z., Ding, C., 2017. Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. *Ultrason. Sonochem.* 37, 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.01.023>
- Díaz, M.J., Huijgen, W.J.J., Van, R.R., Laan, D., Reith, J.H., Cara, C., Castro, E., 2011. Organosolv pretreatment of olive tree biomass for fermentable sugars. *Holzforschung* 65, 177–183. <https://doi.org/10.1515/HF.2011.030>
- Díaz, M.J., Ruiz, E., Romero, I., Cara, C., Moya, M., Castro, E., 2009. Inhibition of *Pichia*

- stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings. World J. Microbiol. Biotechnol. 25, 891–899. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-9966-9>
- Díez-Ruano, J.L., 2010. Control avanzado en procesos industriales de microfiltración y ultrafiltración tangencial. Universidad Politécnica de Valencia. Máster de Automática e Informática Industrial.
- Difonzo, G., Troilo, M., Squeo, G., Pasqualone, A., Caponio, F., 2021. Functional compounds from olive pomace to obtain high-added value foods – a review. J. Sci. Food Agric. 101, 15–26. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10478>
- Doménech, P., Duque, A., Higuera, I., Fernández, J.L., Manzanares, P., 2021. Analytical characterization of water-soluble constituents in olive-derived by-products. Foods 10, 1299. <https://doi.org/10.3390/foods10061299>
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E.B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A.A., Novellino, E., Santini, A., 2019. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. Phyther. Res. 33, 2221–2243. <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>
- Duthie, G.G., Gardner, P.T., Kyle, J.A.M., 2003. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? Proc. Nutr. Soc. 62, 599–603. <https://doi.org/10.1079/pns2003275>
- ECA, 2019. España lidera la producción mundial de aceite de oliva en 2019 y crece en torno a un 40% en esta campaña. <https://www.cesce.es/es/w/comunicacion/sala-de-prensa/espana-lidera-la-produccion-mundial-aceite-oliva-2019-crece-torno-40-esta-campana> (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021).
- ECOLEC, 2021. Fundación Ecolec. Reciclaje electrónico y gestión de RAEE <https://ecolec.es/> (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021).
- Ecured, 2021. Celulosa. <https://www.ecured.cu/Celulosa> (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021).
- EFSA, 2021. <https://www.efsa.europa.eu/en> (fecha de acceso: 12 de noviembre de 2021)
- El-Abbassi, A., Kiai, H., Raiti, J., Hafidi, A., 2014. Application of ultrafiltration for olive processing wastewaters treatment. J. Clean. Prod. 65, 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.08.016>
- El Asli, A., Qatibi, A.I., 2009. Ethanol production from olive cake biomass substrate. Biotechnol. Bioprocess Eng. 14, 118–122. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0071-y>
- ElMekawy, A., Diels, L., Bertín, L., Wever, H. De, Pant, D., 2013. Potential biovalorization techniques for olive mill biorefinery wastewater. Biofuels, Bioprod. Bioref. 6, 246–256. <https://doi.org/10.1002/bbb>

- EMGRISA y MITECO, 2019. Análisis de la consideración como subproducto del orujo graso húmedo procedente de la elaboración de aceite de oliva y destinado a la extracción de aceite de orujo de oliva. https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/participacion-publica/estudiosubproductoalperujo_191120_tcm30-506764.pdf (fecha de acceso: 23 de noviembre de 2021)
- Enel Green Power, 2021. ¿Qué es la transición energética? <https://www.enelgreenpower.com/es/learning-hub/transicion-energetica> (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021).
- Erdocia, X., Prado, R., Corcuera, M.Á., Labidi, J., 2014. Effect of different organosolv treatments on the structure and properties of olive tree pruning lignin. *J. Ind. Eng. Chem.* 20, 1103–1108. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.06.048>
- ESAMUR, 2021. <https://www.esamur.com/> (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021).
- Esencia de Olivo, 2021. La aceituna, el fruto del olivo | Esencia de Olivo - Aceite de Oliva. <http://www.esenciadeolivo.es/cultura-del-olivo/cultivo/la-aceituna-el-fruto-del-olivo/> (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021).
- EUROSTAT, 2021. Home - Eurostat. <https://ec.europa.eu/eurostat> (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021).
- FAOSTAT, 2020. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021).
- FASEB, 2021. Federación de Sociedades Americanas de Biología Experimental. https://hmong.es/wiki/Federation_of_American_Societies_for_Experimental_Biology (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021).
- FDA, 2019. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov> (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021).
- FEDER, 2014. Programación de Fondos Europeos - Fondo Europeo de Desarrollo Regional 2014-2020. <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/haciendayfinanciacioneuropea/areas/fondos-europeos/fondos-europeos-andalucia/paginas/programacion-fondo-desarrollo-regional.html> (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021).
- Fernandes, M.C., Torrado, I., Carvalheiro, F., Dores, V., Guerra, V., Lourenço, P.M.L., Duarte, L.C., 2016. Bioethanol production from extracted olive pomace: dilute acid hydrolysis. *Bioethanol* 2, 103–111. <https://doi.org/10.1515/bioeth-2016-0007>
- Fernández-Bolaños, J., Felizón, B., Brenes, M., Guillén, R., Heredia, A., 1998.

- Hydroxytyrosol and tyrosol as the main compounds found in the phenolic fraction of steam-exploded olive stones. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 1643–1649. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0106-8>
- Fernández-Martín, R.M., 2010. La unión europea como impulsora de la lucha contra el cambio climático. Kyoto y los retos para el 2020. *Revista de Economía Mundial*, 25, 205-226.
- Fernández-Prior, M.Á., Fatuarte, J.C.P., Oria, A.B., Viera-Alcaide, I., Fernández-Bolaños, J., Rodríguez-Gutiérrez, G., 2020. New liquid source of antioxidant phenolic compounds in the olive oil industry: Alperujo water. *Foods* 9, 962. <https://doi.org/10.3390/foods9070962>
- Ferreira, I., Barros, L., Abreu, R., 2009. Antioxidants in wild mushrooms. *Curr. Med. Chem.* 16, 1543–1560. <https://doi.org/10.2174/092986709787909587>
- Foti, P., Romeo, F. V., Russo, N., Pino, A., Vaccalluzzo, A., Caggia, C., Randazzo, C.L., 2021. Olive mill wastewater as renewable raw materials to generate high added-value ingredients for agro-food industries. *Appl. Sci.* 11,7511. <https://doi.org/10.3390/app11167511>
- Franco, T.S., Amezcua, R.M.J., Rodríguez, A.V., Enriquez, S.G., Urquiza, M.R., Mijares, E.M., de Muniz, G.B., 2020. Carboxymethyl and nanofibrillated cellulose as additives on the preparation of chitosan biocomposites: Their influence over films characteristics. *J. Polym. Environ.* 28, 676–688. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01639-0>
- Fu, D., Mazza, G., 2011. Aqueous ionic liquid pretreatment of straw. *Bioresour. Technol.* 102, 7008–7011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.049>
- Galbe, M., Zacchi, G., 2012. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass Bioenergy* 46, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.03.026>
- Galbe, M., Wallberg, O., 2019. Pretreatment for biorefineries: A review of common methods for efficient utilisation of lignocellulosic materials. *Biotechnol. Biofuels* 12, 294. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1634-1>
- Gálvez-Pérez, A., Pérez, A., Calero, M., Martín-Lara, M.A., Blázquez, G., 2019. Integral exploitation from olive cake for energy production in a biorefinery scheme. *Process Saf. Environ. Prot.* 131, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.09.010>
- García, A., Spigno, G., Labidi, J., 2017. Antioxidant and biocide behaviour of lignin fractions from apple tree pruning residues. *Ind. Crops Prod.* 104, 242–252.

- <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.063>
- Garcia-Castello, E., Cassano, A., Criscuoli, A., Conidi, C., Drioli, E., 2010. Recovery and concentration of polyphenols from olive mill wastewaters by integrated membrane system. *Water Res.* 44, 3883-3892. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.005>
- Garcia-Vaquero, M., Ummat, V., Tiwari, B., Rajauria, G., 2020. Exploring ultrasound, microwave and ultrasound-microwave assisted extraction technologies to increase the extraction of bioactive compounds and antioxidants from brown macroalgae. *Mar. Drugs* 18, 172. <https://doi.org/10.3390/md18030172>
- García Martín, J.F., Cuevas, M., Feng, C., Mateos, P.Á., Torres, M., Sánchez, S., 2020. Energetic valorisation of olive biomass: Olive-tree pruning, olive stones and pomaces. *Processes* 8, 511. <https://doi.org/10.3390/pr8050511>
- Georgieva, T.I., Ahring, B.K., 2007. Potential of agroindustrial waste from olive oil industry for fuel ethanol production. *Biotechnol. J.* 2, 1547–1555. <https://doi.org/10.1002/biot.200700128>
- Ghosh, S., Sudha, M.L., 2012. A review on polyols: New frontiers for health-based bakery products. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 63, 372–379. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.627846>
- Giacometti, J., Žauhar, G., Žuvić, M., 2018. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of major phenolic compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.) using response surface methodology. *Foods* 7, 1–14. <https://doi.org/10.3390/foods7090149>
- Gil-Chávez, G., Villa, J.A., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E.M., González-Aguilar, G.A., 2013. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An overview. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12, 5–23. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12005>
- GIOTTI, 2020. Azienda specializzata in aromi, estratti, succhi in formulazioni per l'industria. URL <https://www.enrico-giotti.it/it-it> (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021)
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R., 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4775–4800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- Goldfarb, J.L., Buessing, L., Gunn, E., Lever, M., Billias, A., Casoliba, E., Schievano, A., Adani, F., 2016. Novel integrated biorefinery for olive mill waste management:

- utilization of secondary waste for water treatment. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5, 876–884. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b02202>
- Goldsmith, Chloe D, Vuong, Q. V, Stathopoulos, C.E., Roach, P.D., Scarlett, C.J., 2018. Ultrasound increases the aqueous extraction of phenolic compounds with high antioxidant activity from olive pomace. *LWT - Food Sci. Technol.* 89, 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.065>
- Górniak, I., Bartoszewski, R., Króliczewski, J., 2019. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids, *Phytochem. Rev.* 18, 241-272. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>
- Grupo GIDOLQUIM, n.d. 3.6.1 Fundamento de la técnica. Técnicas y operaciones avanzadas en el laboratorio químico. <http://www.ub.edu/talq/es/node/252> (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021).
- Guinda, Á., Rada, M., Delgado, T., Gutiérrez-Adánez, P., Castellano, J.M., 2010. Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf. *J. Agric. Food Chem.* 58, 9685–9691. <https://doi.org/10.1021/jf102039t>
- Gullón, B., Eibes, G., Moreira, M.T., Dávila, I., Labidi, J., Gullón, P., 2017. Antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained from the refining of autohydrolysis liquors of vine shoots. *Ind. Crops Prod.* 107, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.034>
- Gullón, B., Gullón, P., Eibes, G., Cara, C., De Torres, A., López-Linares, J.C., Ruiz, E., Castro, E., 2018. Valorisation of olive agro-industrial by-products as a source of bioactive compounds. *Sci. Total Environ.* 645, 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.155>
- Gutiérrez-Villanueva, A., Guirola-Céspedes, C., de Armas-Martínez, A.C., Albernas-Carvajal, Y., Villanueva-Ramos, G., 2020. Valorización de la lignina en el concepto de biorrefinería (I). *Cent. Azúcar* 47, 95–105.
- Hadhoum, L., Burnens, G., Loubar, K., Balistrout, M., Tazerout, M., 2019. Bio-oil recovery from olive mill wastewater in sub-/supercritical alcohol-water system. *Fuel* 252, 360–370. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.04.133>
- Haghighi, S., Hossein, A., Tabatabaei, M., 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol , a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 27, 77–93. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>
- Haloui, E., Marzouk, B., Marzouk, Z., Bouraoui, A., Fenina, N., 2011. Hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves: Potent anti-inflammatory and analgesic activities.

- J. Food, Agric. Environ. 9, 128–133.
- Hamoud-Agha, M.M., Allaf, K., 2020. Instant controlled pressure drop (DIC) technology in food preservation, in fundamental and industrial applications, in: Food Preservation and waste exploitation, (Ed. Socaci, S.A., Farcas, A.C., Aussenac. T., Laguerre, J.C.). IntechOpen, London, United Kingdom. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83439>
- Hassan, A., Ilyas, S.Z., Jalil, A., Ullah, Z., 2021. Monetization of the environmental damage caused by fossil fuels. Environ. Sci. Pollut. Res. 28, 21204–21211. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12205-w>
- Hassan, S.S., Williams, G.A., Jaiswal, A.K., 2018. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 262, 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.099>
- Haykiri-Acma, H., Yaman, S., 2019. Effects of dilute phosphoric acid treatment on structure and burning characteristics of lignocellulosic biomass. J. Energy Resour. Technol. 141. <https://doi.org/10.1115/1.4042719>
- He, L., Mu, C., Shi, J., Zhang, Q., Shi, B., Lin, W., 2011. Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. Int. J. Biol. Macromol. 48, 354–359. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.12.012>
- Hernández, V., Romero-García, J.M., Dávila, J.A., Castro, E., Cardona, C.A., 2014. Techno-economic and environmental assessment of an olive stone based biorefinery. Resources, Conserv. Recycl. 92, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2014.09.008>
- Herrero, M., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibáñez, E., 2010. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. J. Chromatogr. A 1217, 2495–2511. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.019>
- Hielscher-Ultrasound Technology, 2021. Ultrasonido: Aplicaciones y procesos - Tecnología de ultrasonidos de Hielscher. <https://www.hielscher.com/es/technolo.htm> (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021)
- Hirondart, M., Rombaut, N., Fabiano-Tixier, A.S., Bily, A., Chemat, F., 2020. Comparison between pressurized liquid extraction and conventional soxhlet extraction for rosemary antioxidants, yield, composition, and environmental footprint. Foods 9, 584. <https://doi.org/10.3390/foods9050584>
- Hochegger, M., Cottyn-Boitte, B., Cézard, L., Schober, S., Mittelbach, M., 2019.

- Influence of ethanol organosolv pulping conditions on physicochemical lignin properties of European larch. *Int. J. Chem. Eng.* 2019, 10. <https://doi.org/10.1155/2019/1734507>
- Hodson de Jaramillo, E., 2018. Bioeconomía: el futuro sostenible. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.* 42, 188-201. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.650>
- Huang, Y.F., Lo, S.L., 2020. Predicting heating value of lignocellulosic biomass based on elemental analysis. *Energy* 191, 116501. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.116501>
- IACGB, 2020. International Advisory Council - Global Bioeconomy Summit 2020. <https://gbs2020.net/about/international-advisory-council/> (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021)
- Inostroza, J.P., Troncoso, J., Mardones, C., Vergara, C., 2018. Lignans in olive stones discarded from the oil industry. Comparison of three extraction methods followed by HPLC-DAD-MS/MS and antioxidant capacity determination. *J. Chil. Chem. Soc.* 63, 4001–4005. <https://doi.org/10.4067/s0717-97072018000204001>
- IRENA, 2017. Bioenergy for sustainable development. <https://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2017/01/BIOENERGY-AND-SUSTAINABLE-DEVELOPMENT-final-20170215.pdf> (fecha de acceso: 21 de octubre de 2021)
- Jahromi, 2019. Extraction techniques of phenolic compounds from plants, in: *Plant physiological aspects of phenolic compounds* (Ed. Soto-Hernández, M., García-Mateos, R., Palma-Tenango, M.) IntechOpen, London, United Kingdom. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84705>
- Jedrzejczyk, M., Soszka, E., Czapnik, M., Ruppert, A.M., Grams, J., 2019. Physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass, in: *Second and third generation of feedstocks*, (Ed. Basile, A., Dalena, F.), Elsevier, Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-02722-2>
- Jeleń, H.H., Gracka, A., 2015. Analysis of black pepper volatiles by solid phase microextraction-gas chromatography: A comparison of terpenes profiles with hydrodistillation. *J. Chromatogr. A* 1418, 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.065>
- Jiménez, J., Alche, J., Wang, W., Rodríguez, M., 2007. Alpeorujo y semillas de olivo presentan el mismo tipo de proteínas de almacenamiento. *Actas del Simposium Científico-Técnico del año 2005*. 365–376.

- Junta de Andalucía, 2010. Potencial energético de los subproductos de la industria olivarera en Andalucía. <https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/Potencial%20energ%C3%A9tico.pdf> (fecha de acceso: 5 de noviembre de 2021)
- Junta de Andalucía, 2017. Anuario de estadísticas agrarias y pesqueras de Andalucía. <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturaganaderiapescaydesarrollosostenible/servicios/estadistica-cartografia/actividad/detalle/175066/175488.html> (fecha de acceso: 5 de noviembre de 2021)
- Junta de Andalucía, 2018. Estrategia Andaluza de Bioeconomía Circular, <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturaganaderiapescaydesarrollosostenible/areas/politica-agraria-comun/desarrollo-rural/paginas/estrategia-andaluza-bioeconomia.html> (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021).
- Kamal, S., Uddin, M.M., Rahman, R., Islam, S.M.R., Khan, M.S., 2017. A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agric. Food Secur.* 6, 51. <https://doi.org/10.1186/s40066-017-0130-8>
- Kazan, A., Celiktaş, M.S., Sargin, S., Yesil-Celiktaş, O., 2015. Bio-based fractions by hydrothermal treatment of olive pomace: Process optimization and evaluation. *Energy Convers. Manag.* 103, 366–373. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2015.06.084>
- Kaderides, K., Papaoikonomou, L., Sera, M., Goula, A.M., 2019. Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. *Chem. Eng. Process.* 137, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.01.006>
- Kim, P., Hamilton, C., Elder, T., Labbé, N., 2018. Effect of non-structural organics and inorganics constituents of switchgrass during pyrolysis. *Front. Energy Res.* 6, 96. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00096>
- Khemakhem, I., Ahmad-Qasem, M.H., Barrajón, E., Micol, V., García-Pérez, J.V., Ayadi, M.A., Bouaziz, M., 2017. Kinetic improvement of olive leaves ' bioactive compounds extraction by using power ultrasound in a wide temperature range. *Ultrason. Sonochem.* 34, 466–473. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.010>
- Krishnan, C., Sousa, L. da C., Jin, M., Chang, L., Dale, B.E., Balan, V., 2010. Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* 107, 441–450. <https://doi.org/10.1002/bit.22824>

- Kucharska, K., Rybarczyk, P., Hołowacz, I., Łukajtis, R., Glinka, M., Kamiński, M., 2018. Pretreatment of lignocellulosic materials as substrates for fermentation processes. *Molecules* 23, 2937. <https://doi.org/10.3390/molecules23112937>
- Kumar, A.K., Sharma, S., 2017. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresour. Bioprocess.* 4, 7. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0137-9>
- Kumar, M., Dahuja, A., Tiwari, S., Punia, S., Tak, Y., Amarowicz, R., Bhoite, A.G., Singh, S., Joshi, S., Panesar, P.S., Prakash Saini, R., Pihlanto, A., Tomar, M., Sharifi-Rad, J., Kaur, C., 2021. Recent trends in extraction of plant bioactives using green technologies: A review. *Food Chem.* 353, 129431. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129431>
- La Fata, G., Rastall, R.A., Lacroix, C., Harmsen, H.J.M., Mohajeri, M.H., Weber, P., Steinert, R.E., 2017. Recent development of prebiotic research—statement from an expert workshop. *Nutrients* 9, 1376. <https://doi.org/10.3390/nu9121376>
- La Scalia, G., Micale, R., Cannizzaro, L., Marra, F.P., 2017. A sustainable phenolic compound extraction system from olive oil mill wastewater. *J. Clean. Prod.* 142, 3782–3788. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.10.086>
- Lama-Muñoz, A., Contreras, M. del M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., Castro, E., 2020a. Content of phenolic compounds and mannitol in olive leaves extracts from six Spanish cultivars: Extraction with the Soxhlet method and pressurized liquids. *Food Chem.* 320, 126626. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126626>
- Lama-Muñoz, A., Contreras, M. del M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., Castro, E., 2020b. Characterization of the lignocellulosic and sugars composition of different olive leaves cultivars. *Food Chem.* 329, 127153. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127153>
- Lama-Muñoz, A., Contreras, M. del M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., Castro, E., 2019a. Optimization of oleuropein and luteolin-7-O-glucoside extraction from olive leaves by ultrasound-assisted technology. *Energies* 12, 2486. <https://doi.org/10.3390/en12132486>
- Lama-Muñoz, A., Contreras, M. del M., Espínola, F., Moya, M., De Torres, A., Romero, I., Castro, E., 2019b. Extraction of oleuropein and luteolin-7-O-glucoside from olive leaves: Optimization of technique and operating conditions. *Food Chem.* 293, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.075>
- Lama-Muñoz, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rubio-Senent, F., Fernández-Bolaños, J.,

2012. Production, characterization and isolation of neutral and pectic oligosaccharides with low molecular weights from olive by-products thermally treated. *Food Hydrocoll.* 28, 92–104. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.11.008>
- Lama-Muñoz, A., Romero-García, J.M., Cara, C., Moya, M., Castro, E., 2014. Low energy-demanding recovery of antioxidants and sugars from olive stones as preliminary steps in the biorefinery context. *Ind. Crops Prod.* 60, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.051>
- Landolsi, I., Rjiba, N., Hamdaoui, M., Harzallah, O.A., Boudokhane, C., 2021. Optimization of cellulose extraction and TCF bleaching from olive tree pruning residues by Box–Behnken design. *J. Nat. Fibers.* <https://doi.org/10.1080/15440478.2021.1967830>
- Lavilla, I., Bendicho, C., 2017. Fundamentals of ultrasound-assisted extraction, in: *Water extraction of bioactive compounds*, (Ed. Dominguez, H., González, M.J.) Elsevier, Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00011-5>
- Lefebvre, T., Destandau, E., Lesellier, E., 2021. Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review. *J. Chromatogr. A.* 1635, 461770. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461770>
- Leite, P., Salgado, J.M., Venâncio, A., Domínguez, J.M., Belo, I., 2016. Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and cellulase production by solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 214, 737–746. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.028>
- Li, C., Wang, L., Chen, Z., Li, Yongfu, Wang, R., Luo, X., Cai, G., Li, Yanan, Yu, Q., Lu, J., 2015. Ozonolysis pretreatment of maize stover: The interactive effect of sample particle size and moisture on ozonolysis process. *Bioresour. Technol.* 183, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.042>
- Li, J., Zhang, S., Zhang, M., Sun, B., 2019. Novel approach for extraction of grape skin antioxidants by accelerated solvent extraction: Box–Behnken design optimization. *J. Food Sci. Technol.* 56, 4879–4890. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03958-5>
- Li, L., Zhuang, J., Zou, H., Pang, J., Yu, S., 2020. Partition usage of cellulose by coupling approach of supercritical carbon dioxide and cellulase to reducing sugar and nanocellulose. *Carbohydr. Polym.* 229, 115533. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115533>
- Lima, P.S.S., Lucchese, A.M., Araújo-Filho, H.G., Menezes, P.P., Araújo, A.A.S., Quintans-Júnior, L.J., Quintans, J.S.S., 2016. Inclusion of terpenes in cyclodextrins:

- Preparation, characterization and pharmacological approaches. *Carbohydr. Polym.* 151, 965–987. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.040>
- Liu, B., Liu, J., Huang, D., Pei, D., Wei, J., Di, D., 2021. Isolation and purification of oleuropein from olive leaves using boric acid affinity resin and a novel solvent system. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 614, 126145. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126145>
- Liu, Y., Nie, Y., Xingmei, L., Xiangping, Z., Pan, F., Zhou, L., Liu, X., Ji, X., Zhang, S., 2019. Cascade utilization of lignocellulosic biomass to high-value products. *Green Chem.* 21, 3499. <https://doi.org/10.1039/c9gc00473d>
- Loaiza-Rodríguez, J.M., 2019. Aplicación de métodos hidrotérmicos y Lacasa-Mediador en procesos de biorrefinería de *Eucalytus Globulus*. Universidad de Huelva. Memoria para optar al grado de Doctor.
- Lockyer, S., Rowland, I., Spencer, J.P.E., Yaqoob, P., Stonehouse, W., 2017. Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: a randomised controlled trial. *Eur. J. Nutr.* 56, 1421–1432. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1188-y>
- López-Fernández-Sobrinho, R., Margalef, M., Torres-Fuentes, C., Ávila-Román, J., Aragonès, G., Muguera, B., Bravo, F.I., 2021. Enzyme-assisted extraction to obtain phenolic-enriched wine lees with enhanced bioactivity in hypertensive rats. *Antioxidants* 10, 517. <https://doi.org/10.3390/antiox10040517>
- Lopez-Huertas, E., Fonolla, J., 2017. Hydroxytyrosol supplementation increases vitamin C levels *in vivo*. A human volunteer trial. *Redox Biol.* 11, 384–389. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.014>
- López-Linares, J.C., Gómez-Cruz, I., Ruiz, E., Romero, I., Castro, E., 2020a. Production of ethanol from hemicellulosic sugars of exhausted olive pomace by *Escherichia coli*. *Processes* 8, 533. <https://doi.org/10.3390/PR8050533>
- López-Linares, J.C., Ruiz, E., Romero, I., Castro, E., Manzanares, P., 2020b. Xylitol Production from Exhausted Olive Pomace by *Candida boidinii*. *Appl. Sci.* 10, 6966. <https://doi.org/10.3390/app10196966>
- López-Linares, J.C., Moya, M., Peláez, L., Ruiz, E., Romero, I., Cara, C., Castro, E., 2019. Valorización de hoja de almazara en el contexto de una biorrefinería. Extracción acuosa en autoclave. 93–102.
- López de las Hazas, M.C., Godinho-Pereira, J., Macià, A., Almeida, A.F., Ventura, M.R., Motilva, M.J., Santos, C.N., 2018. Brain uptake of hydroxytyrosol and its main

- circulating metabolites: Protective potential in neuronal cells. *J. Funct. Foods* 46, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.028>
- Lopez, F.J., Pinzi, S., Ruiz, J.J., Lopez, A., Dorado, M.P., 2010. Economic viability of the use of olive tree pruning as fuel for heating systems in public institutions in South Spain. *Fuel* 89, 1386–1391. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2009.11.003>
- Lourenço, A., Pereira, H., 2018. Compositional variability of lignin in biomass, in: *Lignin*, (Ed. Poletto, M.), IntechOpen, London, United Kingdom. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71208>
- Lugani, Y., Oberoi, S., Singh Sooch, B., 2017. Xylitol: a sugar substitute for patients of diabetes Mellitus. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 6, 741–749. <https://doi.org/10.20959/wjpps20174-8946>
- Luo, Y., Li, Z., Li, X., Liu, X., Fan, J., Clark, J.H., Hu, C., 2019. The production of furfural directly from hemicellulose in lignocellulosic biomass: A review. *Catal. Today* 319, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.06.042>
- Luzi, F., Pannucci, E., Clemente, M., Grande, E., Urciuoli, S., Romani, A., Torre, L., Puglia, D., Bernini, R., Santi, L., 2021. Hydroxytyrosol and oleuropein-enriched extracts obtained from olive oil wastes and by-products as active antioxidant ingredients for poly (Vinyl alcohol)-based films. *Molecules* 26, 2104. <https://doi.org/10.3390/molecules26072104>
- Małyska, A., Jacobi, J., 2018. Plant breeding as the cornerstone of a sustainable bioeconomy. *N. Biotechnol.* 40, 129–132. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.06.011>
- Mansour, A. Ben, Porter, E.A., Kite, G.C., Simmonds, M.S.J., Abdelhedi, R., Bouaziz, M., 2015. Phenolic profile characterization of chemlali olive stones by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 63, 1990–1995. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00353>
- Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., González, A., Oliva, J.M., Ballesteros, M., 2020. Processing of extracted olive oil pomace residue by hydrothermal or dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis in a biorefinery context. *Renew. Energy* 145, 1235–1245. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.06.120>
- Manzanares, P., Negro, M.J., Oliva, J.M., Saéz, F., Ballesteros, I., Ballesteros, M., Cara, C., Castro, E., Ruiz, E., 2011. Different process configurations for bioethanol production from pretreated olive pruning biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 881–887. <https://doi.org/10.1002/jctb.2604>
- Manzanares, P., Ruiz, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., Gallego, F.J., López-Linares, J.C.,

- Castro, E., 2017. Residual biomass potential in olive tree cultivation and olive oil industry in Spain: Valorization proposal in a biorefinery context. *Spanish J. Agric. Res.* 15. <https://doi.org/10.5424/sjar/2017153-10868>
- MAPA, 2020. Aceite de oliva. <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/aceite-oliva-y-aceituna-mesa/aceite.aspx> (fecha acceso: 28 de noviembre de 2021)
- Martillanes, S., Rocha-Pimienta, J., Cabrera-Bañegil, M., Martín-Vertedor, D., Delgado-Adámez, J., 2017. Application of phenolic compounds for food preservation: Food additive and active packaging, in: *Phenolic Compounds*, (Ed. Soto-Hernández, M., Palma-Tenango, M., García-Mateos, M.R.). IntechOpen, London, United Kingdom. <https://doi.org/10.5772/66885>
- Martín-García, B., Verardo, V., León, L., De la Rosa, R., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Gómez-Caravaca, A.M., 2019. GC-QTOF-MS as valuable tool to evaluate the influence of cultivar and sample time on olive leaves triterpenic components. *Food Res. Int.* 115, 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.085>
- Martín-Ortíz, A., 2019. Desarrollo de nuevas metodologías avanzadas para el análisis de oligosacáridos bioactivos. Universidad Complutense de Madrid. Memoria para optar al grado de Doctor.
- Martines, E., Lira, L., 2008. Cálculo de la temperatura de punto de rocío a diferentes valores de presión. Simposio de Metrología.
- Martinez-Hernandez, E., Siew, K., 2020. Life cycle analysis of renewable energy, in: *Earth systems and environmental sciences*. Elsevier, Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819727-1.00016-9>
- Martínez-Patiño, J.C., Ruiz, E., Cara, C., Romero, I., Castro, E., 2018. Advanced bioethanol production from olive tree biomass using different bioconversion schemes. *Biochem. Eng. J.* 137, 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.06.002>
- Martínez-Patiño, J.C., Gullón, B., Romero, I., Ruiz, E., Brnčić, M., Žlabur, J.Š., Castro, E., 2019a. Optimization of ultrasound-assisted extraction of biomass from olive trees using response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* 51, 487–495. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.05.031>
- Martínez-Patiño, J.C., Gómez-Cruz, I., Romero, I., Gullón, B., Ruiz, E., Brnčić, M., Castro, E., 2019b. Ultrasound-assisted extraction as a first step in a biorefinery strategy for valorisation of extracted olive pomace. *Energies* 12, 2679.

- <https://doi.org/10.3390/en12142679>
- Martínez-Patiño, J.C., Romero-García, J.M., Ruiz, E., Oliva, J.M., Álvarez, C., Romero, I., Negro, M.J., Castro, E., 2015. High solids loading pretreatment of olive tree pruning with dilute phosphoric acid for bioethanol production by *Escherichia coli*. *Energy Fuels* 29, 1735–1742. <https://doi.org/10.1021/ef502541r>
- Martínez-Patiño, J.C., Ruiz, E., Romero, I., Cara, C., López-Linares, J.C., Castro, E., 2017a. Combined acid/alkaline-peroxide pretreatment of olive tree biomass for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 239, 326–335. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.102>
- Martínez-Patiño, J.C., Romero, I., Ruiz, E., Cara, C., Romero-García, J.M., Castro, E., 2017b. Design and optimization of sulfuric acid pretreatment of extracted olive tree biomass using response surface methodology. *BioResources* 12, 1779–1797. <https://doi.org/10.15376/biores.12.1.1779-1797>
- Martínez, L., Ros, G., Nieto, G., 2018. Hydroxytyrosol: Health benefits and use as functional ingredient in meat. *Medicines* 5, 13. <https://doi.org/10.3390/medicines5010013>
- Martins, F., Felgueiras, C., Smitkova, M., Caetano, N., 2019. Analysis of fossil fuel energy consumption and environmental impacts in european countries. *Energies* 12, 964. <https://doi.org/10.3390/en12060964>
- Mason, T.J., Chemat, F., Ashokkumar, M., 2015. Power ultrasonics for food processing, in: *Power ultrasonics*, (Ed. Gallego-Juárez, J.A., Graff, K.F.) Elsevier, Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-028-6.00027-2> CHAPTER
- Mata-Sánchez, J., Pérez Jiménez, J.A., Díaz Villanueva, M.J., Serrano, A., Núñez, N., Giménez, J.L., 2015. New techniques developed to quantify the impurities of olive stone as solid biofuel. *Renew. Energy* 78, 566–572. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.01.049>
- Mateo, S., Puentes, J.G., Moya, A.J., Sánchez, S., 2015. Ethanol and xylitol production by fermentation of acid hydrolysate from olive pruning with *Candida tropicalis* NBRC 0618. *Bioresour. Technol.* 190, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.045>
- Mateos, R., Sarria, B., Bravo, L., 2020. Nutritional and other health properties of olive pomace oil. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60, 3506–3521. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1698005>
- Medina, E., Romero, C., Brenes, M., 2018. Residual olive paste as a source of phenolic

- compounds and triterpenic acids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 120, 1700368. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700368>
- Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., Pacheco, N., 2017. Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy* 7, 47. <https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>
- Medouni-Haroune, L., Zaidi, F., Medouni-Adrar, S., Kecha, M., 2018. Olive Pomace: From an olive mill waste to a resource, an overview of the new treatments. *J. Crit. Rev.* 5, 1–6. <https://doi.org/10.22159/jcr.2018v5i5.28840>
- Mengal, P., Wubbolts, M., Zika, E., Ruiz, A., Brigitta, D., Pieniadz, A., Black, S., 2018. Bio-based industries joint undertaking: The catalyst for sustainable bio-based economic growth in Europe. *N. Biotechnol.* 40, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.06.002>
- Mesa, L., Albernas, Y., Morales, M., Corsano, G., González, E., 2016. Integration of organosolv process for biomass pretreatment in a biorefinery, in: *Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery* (Ed. Mussatto, S.I.). Elsevier, Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00011-6>
- Mewalal, R., Rai, D.K., Kainer, D., Chen, F., Külheim, C., Peter, G.F., Tuskan, G.A., 2017. Plant-derived terpenes: A feedstock for specialty biofuels. *Trends Biotechnol.* 35, 227–240. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.003>
- Michelin, M., Liebentritt, S., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., 2018. Lignin from an integrated process consisting of liquid hot water and ethanol organosolv: Physicochemical and antioxidant properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 120, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.046>
- Mingshu, L., Kai, Y., Qiang, H., Dongying, J., 2006. Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. *J. Basic Microbiol.* 46, 68–84. <https://doi.org/10.1002/jobm.200510600>
- Miranda, I., Simões, R., Medeiros, B., Nampoothiri, K.M., Sukumaran, R.K., Rajan, D., Pereira, H., Ferreira-Dias, S., 2019. Valorization of lignocellulosic residues from the olive oil industry by production of lignin, glucose and functional sugars. *Bioresour. Technol.* 292, 121936. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121936>
- Miranda, T., Nogales, S., Román, S., Montero, I., Arranz, J.I., Sepúlveda, F.J., 2014. Control of several emissions during olive pomace thermal degradation. *Int. J. Mol.*

- Sci. 15, 18349–18361. <https://doi.org/10.3390/ijms151018349>
- MITECO, 2020. España Circular 2030, Estrategia Española de Economía Circular. <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/economia-circular/estrategia/> (fecha acceso: 28 de noviembre de 2021)
- MITECO, 2019. La Estrategia de Transición Justa será el marco de actuación para optimizar las oportunidades de la transición ecológica <https://www.miteco.gob.es/es/prensa/ultimas-noticias/la-estrategia-de-transición-justa-será-el-marco-de-actuación-para-optimizar-las-oportunidades-de-la-transición-ecológica-/tcm:30-487299> (fecha acceso: 28 de noviembre de 2021)
- Mkaouar, S., Bahloul, N., Gelicus, A., Allaf, K., Kechaou, N., 2015. Instant controlled pressure drop texturing for intensifying ethanol solvent extraction of olive (*Olea europaea*) leaf polyphenols. Sep. Purif. Technol. 145, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.03.014>
- MOLISERB SRL, 2021. Company Profile https://www.dnb.com/business-directory/company-profiles/moliserb_srl.539c608fbb21be7e7f07e00bbf612653.html (fecha acceso: 25 de noviembre de 2021)
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., Ricardo Da Silva, J.M., 2003. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. graciano, tempranillo, and cabernet sauvignon. J. Agric. Food Chem. 51, 6475–6481. <https://doi.org/10.1021/jf030325>
- Montealegre, C., Esteve, C., García, M.C., García-Ruiz, C., Marina, M.L., 2014. Proteins in olive fruit and oil. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 54, 611–624. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.598639>
- Moreira, S.A., Silva, S., Costa, E.M., Saraiva, J.A., Pintado, M., 2020. Effect of high hydrostatic pressure extraction on biological activities of stinging nettle extracts. Food Funct. 11, 921–931. <https://doi.org/10.1039/c9fo02442e>
- Morris, V.J., Belshaw, N.J., Waldron, K.W., Maxwell, E.G., 2013. The bioactivity of modified pectin fragments. Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre 1, 21–37. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.02.001>
- Mosca, A., Crudele, A., Smeriglio, A., Braghini, M.R., Panera, N., Comparcola, D., Alterio, A., Sartorelli, M.R., Tozzi, G., Raponi, M., Trombetta, D., Alisi, A., 2020. Antioxidant activity of Hydroxytyrosol and Vitamin E reduces systemic inflammation in children with paediatric NAFLD. Dig. Liver Dis. 1–5.

<https://doi.org/10.1016/j.dld.2020.09.021>

- Muñoz, A., 2016. Caracterización de pectinas industriales de cítricos y su aplicación como recubrimientos de fresas. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, Madrid. Máster en Química Agrícola y Nuevos Alimentos.
- Muñoz, P., Pérez, K., Cassano, A., Ruby-Figueroa, R., 2021. Recovery of anthocyanins and monosaccharides from grape marc extract by nanofiltration membranes. *Molecules* 26, 2003. <https://doi.org/10.3390/molecules26072003>
- Musa, K.H., Abdullah, A., Jusoh, K., Subramaniam, V., 2010. Antioxidant activity of pink-flesh guava (*Psidium guajava* L.): Effect of extraction techniques and solvents. *Food Anal. Methods* 4, 100–107. <https://doi.org/10.1007/s12161-010-9139-3>
- Mussatto, S.I., Mancilha, I.M., 2007. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydr. Polym.* 68, 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.011>
- Nabet, N., Gilbert-López, B., Madani, K., Herrero, M., Ibáñez, E., Mendiola, J.A., 2019. Optimization of microwave-assisted extraction recovery of bioactive compounds from *Origanum glandulosum* and *Thymus fontanesii*. *Ind. Crops Prod.* 129, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.032>
- Naciones Unidas, 2021. Qué es la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. <https://unfccc.int/es/process-and-meetings/the-convention/que-es-la-convencion-marco-de-las-naciones-unidas-sobre-el-cambio-climatico> (fecha de acceso: 28 de noviembre de 2021)
- Naciones Unidas, 2015. Consumo y producción sostenibles – Desarrollo Sostenible <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/sustainable-consumption-production/> (fecha de acceso: 13 de noviembre de 2021)
- Nadar, S.S., Rao, P., Rathod, V.K., 2018. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Res. Int.* 108, 309–330. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.006>
- Nediani, C., Ruzzolini, J., Romani, A., Calorini, L., 2019. Oleuropein, a bioactive compound from *Olea europaea* L., as a potential preventive and therapeutic agent in non-communicable diseases. *Antioxidants* 8, 578. <https://doi.org/10.3390/antiox8120578>
- Negro, M.J., Alvarez, C., Ballesteros, I., Romero, I., Ballesteros, M., Castro, E., Manzanares, P., Moya, M., Oliva, J.M., 2014. Ethanol production from glucose and xylose obtained from steam exploded water-extracted olive tree pruning using phosphoric acid as catalyst. *Bioresour. Technol.* 153, 101–107.

- Negro, M.J., Duque, A., Manzanares, P., Sáez, F., Oliva, J.M., Ballesteros, I., Ballesteros, M., 2015. Alkaline twin-screw extrusion fractionation of olive-tree pruning biomass. *Ind. Crops Prod.* 74, 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.018>
- Negro, M.J., Manzanares, P., Ruiz, E., Castro, E., Ballesteros, M., 2017. The biorefinery concept for the industrial valorization of residues from olive oil industry, in: *Olive Mill Waste*, (Ed. Galanakis, C.M.) Elsevier, Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805314-0.00003-0>
- Nerin, C., Bentayeb, K., Rodriguez-Lafuente, A., 2012. Sampling techniques for the determination of migrants from packaging materials in food, in: *Chemistry, molecular sciences and chemical engineering*. Elsevier, Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00139-3>
- Niknam, S.M., Kashaninejad, M., Escudero, I., Sanz, M.T., Beltrán, S., Benito, J.M., 2021. Valorization of olive mill solid residue through ultrasound-assisted extraction and phenolics recovery by adsorption process. *J. Clean. Prod.* 316, 128340. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128340>
- NREL, 2021. Integrated Biorefinery Research Facility | Bioenergy <https://www.nrel.gov/bioenergy/ibrf.html> (fecha de acceso: 3 de diciembre de 2021)
- Ntaikou, I., Siankevich, S., Lyberatos, G., 2021. Effect of thermo-chemical pretreatment on the saccharification and enzymatic digestibility of olive mill stones and their bioconversion towards alcohols. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 24570–24579. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09625-z>
- Nueva Génesis, 2012. Carbohidratos. <https://es.slideshare.net/videoconferencias/carbohidratos-13766956> (fecha de acceso: 3 de diciembre de 2021)
- Nunes, C.A., Lima, C.F., Barbosa, L.C.A., Colodette, J.L., Gouveia, A.F.G., Silvério, F.O., 2010. Determination of *Eucalyptus* spp lignin S/G ratio: A comparison between methods. *Bioresour. Technol.* 101, 4056–4061. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.012>
- Oliva, J.M., Negro, M.J., Álvarez, C., Manzanares, P., Moreno, A.D., 2020. Fermentation strategies for the efficient use of olive tree pruning biomass from a flexible biorefinery approach. *Fuel* 277, 118171. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118171>
- Osorio-Tobón, J.F., 2020. Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *J. Food Sci. Technol.* 57, 4299–4315. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04433-2>

- Özçelik, A.E., Acaroğlu, M., Köse, H., 2020. Determination of combustion characteristics of olive pomace biodiesel–Eurodiesel fuel mixtures. *Energ. Source Part A*. 42, 1476–1489. <https://doi.org/10.1080/15567036.2019.1604862>
- Ozkan, G., Karacabey, E., Arslan, N., Odabasi, N., 2017. Optimisation of microwave-assisted extraction of triterpenoic acids from olive mill waste using response surface methodology. *Qual. Assur. Saf. Crop. Foods* 9, 179–185. <https://doi.org/10.3920/QAS2015.0783>
- Padilla-Rascón, C., Ruiz, E., Romero, I., Castro, E., Oliva, J.M., Ballesteros, I., Manzanares, P., 2020. Valorisation of olive stone by-product for sugar production using a sequential acid/steam explosion pretreatment. *Ind. Crops Prod.* 148, 112279. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112279>
- Padilla-Rascón, C., Romero-García, J.M., Ruiz, E., Romero, I., Castro, E., 2021. Microwave-assisted production of furfural from the hemicellulosic fraction of olive stones. *Process Saf. Environ. Prot.* 152, 630–640. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.06.035>
- Pan, X., Saddler, J.N., 2013. Effect of replacing polyol by organosolv and kraft lignin on the property and structure of rigid polyurethane foam. *Biotechnol. Biofuels* 6, 12. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-12>
- Parisutham, V., Kim, T.H., Lee, S.K., 2014. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production. *Bioresour. Technol.* 161, 431–440. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.114>
- Parlamento Europeo, 2021. Economía circular: definición, importancia y beneficios. <https://www.europarl.europa.eu/news/es/headlines/economy/20151201STO05603/economia-circular-definicion-importancia-y-beneficios> (fecha de acceso: 17 de octubre de 2021)
- Parniakov, O., Barba, F.J., Grimi, N., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N., Vorobiev, E., 2015. Pulsed electric field and pH assisted selective extraction of intracellular components from microalgae *Nannochloropsis*. *Algal Res.* 8, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.014>
- Parra, R., Gomez-Jimenez, M.C., 2020. Spatio-temporal immunolocalization of extensin protein and hemicellulose polysaccharides during olive fruit abscission. *Planta* 252, 32. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03439-6>
- Parra, R., Paredes, M.A., Labrador, J., Nunes, C., Coimbra, M.A., Fernandez-Garcia, N., Olmos, E., Gallardo, M., Gomez-Jimenez, M.C., 2020. Cell wall composition and

- ultrastructural immunolocalization of pectin and arabinogalactan protein during *Olea europaea* L. fruit abscission. *Plant Cell Physiol.* 61, 814–825. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa009>
- Patermann, C., Aguilar, A., 2018. The origins of the bioeconomy in the European Union. *N. Biotechnol.* 40, 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.04.002>
- Patil, R., Cimon, C., Eskicioglu, C., Goud, V., 2021. Effect of ozonolysis and thermal pre-treatment on rice straw hydrolysis for the enhancement of biomethane production. *Renew. Energy* 179, 467–474. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.07.048>
- Paul, A., Zhang, B.D., Mohapatra, S., Li, G., Li, Y.M., Gazit, E., Segal, D., 2019. Novel mannitol-based small molecules for inhibiting aggregation of α -synuclein amyloids in Parkinson's disease. *Front. Mol. Biosci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00016>
- Pavez, I., Lozano-Sánchez, J., Borrás-Linares, I., Nuñez, H., Robert, P., Segura-Carretero, A., 2019. Obtaining an extract rich in phenolic compounds from olive pomace by pressurized liquid extraction. *Molecules* 24, 3108. <https://doi.org/10.3390/molecules24173108>
- Paz, A., Karnaouri, A., Templis, C.C., Papayannakos, N., Topakas, E., 2020. Valorization of exhausted olive pomace for the production of omega-3 fatty acids by *Cryptocodinium cohnii*. *Waste Manag.* 118, 435–444. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.09.011>
- Pazouki, L., Niinemetst, U., 2016. Multi-substrate terpene synthases: Their occurrence and physiological significance. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01019>
- PDR, 2014. Desarrollo Rural: PDR - Andalucía 2014-2020 - Junta de Andalucía. <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturaganaderiapescaydesarrollo-sostenible/areas/politica-agraria-comun/desarrollo-rural/paginas/marco-2014-2020-programa.html> (fecha de acceso: 17 de octubre de 2021)
- Pecha, M.B., Garcia-Perez, M., 2020. Pyrolysis of lignocellulosic biomass: oil, char, and gas, in: *Bioenergy*, (Ed. Dahiya, A.). Elsevier, Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815497-7.00029-4>
- Peláez Renovables, 2020. Producto_Food_Grass - Piropel Biomasa de Jaén. https://pelaezrenovables.com/producto_food_grass/ (fecha de acceso: 17 de octubre de 2021)

- Pellet del Sur, 2021. Venta de hueso de aceituna a un precio increíble al por mayor y al por menor. <https://pelletsdelsur.com/projects/hueso-de-aceituna-calidad-a1/> (fecha de acceso: 17 de octubre de 2021)
- Pereira, H., Graca, J., Rodrigues, J.C., 2003. Wood chemistry in relation to quality. *Wood Qual. Its Biol. Basis*, 53-86. <https://doi.org/10.1002/chin.200446298>
- Pereira, J.N., Couto, M.A.P.G., Anna, L.M.M.S., 2008. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. https://www.abq.org.br/workshop/11/Nei-Pereira-Jr_LIGNOCELLULOSIC-BIOMASS-FOR-THE-PRODUCTION-BIOETHANOL-WITHIN-THE-CONCEPT-OF-BIOREFINERY.pdf (fecha de acceso: 29 de noviembre de 2021)
- Perea-Moreno, A.J., Aguilera-Ureña, M.J., Manzano-Agugliaro, F., 2016. Fuel properties of avocado stone. *Fuel* 186, 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.08.101>
- Pérez, J.A., González, A., Oliva, J.M., Ballesteros, I., Manzanares, P., 2007. Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 929–938. <https://doi.org/10.1002/jctb>
- Pińkowska, H., Wolak, P., Oliveros, E., 2013. Production of xylose and glucose from rapeseed straw in subcritical water - Use of Doehlert design for optimizing the reaction conditions. *Biomass Bioen* 58, 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.09.005>
- Plaza-Díaz, J., Pastor-Villaescusa, B., Rueda-Robles, A., Abadía-Molina, F., Ruiz-Ojeda, F.J., 2020. Plausible biological interactions of low- and non-calorie sweeteners with the intestinal microbiota: An update of recent studies. *Nutrients* 12, 1153. <https://doi.org/10.3390/nu12041153>
- PNIEC, 2021. Plan Nacional Integrado de Energía y Clima (PNIEC) 2021-2030. <https://www.miteco.gob.es/es/prensa/pniec.aspx> (fecha de acceso: 17 de octubre de 2021)
- Poudyal, H., Lemonakis, N., Efentakis, P., Gikas, E., Halabalaki, M., Andreadou, I., Skaltsounis, L., Brown, L., 2017. Hydroxytyrosol ameliorates metabolic, cardiovascular and liver changes in a rat model of diet-induced metabolic syndrome: Pharmacological and metabolism-based investigation. *Pharmacol. Res.* 117, 32–45. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.12.002>
- PubChem, 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (fecha de acceso: 15 de noviembre de 2021)

- Puig-Gamero, M., Parascanu, M.M., Sánchez, P., Sanchez-Silva, L., 2021. Olive pomace versus natural gas for methanol production: a life cycle assessment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 30335–30350. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12710-6>
- Ramos, P., Santos, S.A.O., Guerra, Â.R., Guerreiro, O., Felício, L., Jerónimo, E., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P., Duarte, M., 2013. Valorization of olive mill residues: Antioxidant and breast cancer antiproliferative activities of hydroxytyrosol-rich extracts derived from olive oil by-products. *Ind. Crops Prod.* 46, 359–368. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.020>
- Ramakoti, B., Dhanagopal, H., Deepa, K., Rajesh, M., Ramaswamy, S., Tamilarasan, K., 2019. Solvent fractionation of organosolv lignin to improve lignin homogeneity: Structural characterization. *Bioresour. Technol. Reports* 7, 100293. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100293>
- Rajha, H.N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R.G., Vorobiev, E., 2014. A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots. *Food Res. Int.* 65, 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.024>
- Rashidi, S., Eikani, M.H., Ardjmand, M., 2018. Extraction of *Hyssopus officinalis* L. essential oil using instant controlled pressure drop process. *J. Chromatogr. A* 1579, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.10.020>
- Ray, P., Singh, P.S., Poliseti, V., 2020. Synthetic polymeric membranes for the removal of toxic pollutants and other harmful contaminants from water, in: Removal of toxic pollutants through microbiological and tertiary treatment, (Ed. Shah, M.P.). Elsevier, Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821014-7.00002-2>
- Real Decreto 1101/2011, de 22 de julio, por el que se aprueba la lista positiva de los disolventes de extracción que se pueden utilizar en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes.
- Rencoret, J., Gutiérrez, A., Castro, E., Del Río, J.C., 2019. Structural characteristics of lignin in pruning residues of olive tree (*Olea europaea* L.). *Holzforschung* 73, 25–34. <https://doi.org/10.1515/hf-2018-0077>
- Requejo, A., Peleteiro, S., Garrote, G., Rodríguez, A., Jiménez, L., 2012. Biorefinery of olive pruning using various processes. *Bioresour. Technol.* 111, 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.156>
- REUS, 2021. Home – Reus, los ultrasonidos al servicio de la naturaleza <https://www.etsreus.com/es/home-esp/> (fecha de acceso: 17 de octubre de 2021)

- Rezania, S., Mohamad, S.E., Sohaili, J., Taib, S.M., Badruddin, M., Yusof, M., Kamyab, H., Darajeh, N., Ahsan, A., 2017. Review on pretreatment methods and ethanol production from cellulosic water hyacinth. *Bioresources*. 12, 2108–2124.
- Ribeiro, T.B., Oliveira, A., Coelho, M., Veiga, M., Costa, E.M., Silva, S., Nunes, J., Vicente, A.A., Pintado, M., 2021. Are olive pomace powders a safe source of bioactives and nutrients? *J. Sci. Food Agric.* 101, 1963–1978. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10812>
- Ribeiro, T.B., Oliveira, A.L., Costa, C., Nunes, J., Vicente, A.A., Pintado, M., 2020. Total and sustainable valorisation of olive pomace using a fractionation approach. *Appl. Sci.* 10, 6785. <https://doi.org/10.3390/app10196785>
- Rigane, G., Bouaziz, M., Baccar, N., Abidi, S., Sayadi, S., Salem, R. Ben, 2012. Recovery of hydroxytyrosol rich extract from two-phase chemlali olive pomace by chemical treatment. *J. Food Sci.* 77, 1077–1083. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02898.x>
- Ritchie, H., Roser, M., 2020. Energy. <https://ourworldindata.org/fossil-fuels#citation> (fecha de acceso: 2 de diciembre de 2021)
- Rivas-Siota, S., 2014. Valorización de hemicelulosas de biomasa vegetal. Universidad de Vigo. Memoria para optar al grado de Doctor.
- Rodrigues Pinto, P., Mota, I.F., Pereira, C.M., Ribeiro, A.M., Loureiro, J.M., Rodrigues, A.E., 2017. Separation and recovery of polyphenols and carbohydrates from Eucalyptus bark extract by ultrafiltration/diafiltration and adsorption processes. *Sep. Purif. Technol.* 183, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.04.003>
- Rodríguez- Pleguezuelo, C.R., Hugo, V., Zuazo, D., Ramón, J., Martínez, F., José, F., Peinado, M., Martín, F.M., Francisco, I., Tejero, G., 2018. Organic olive farming in Andalusia , Spain . A review. *Agron. Sustain. Dev.* 38, 20. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0498-2>
- Rodríguez-Lizana, A., Pereira, M.J., Ribeiro, M.C., Soares, A., Márquez-García, F., Ramos, A., Gil-Ribes, J., 2017. Assessing local uncertainty of soil protection in an olive grove area with pruning residues cover: A geostatistical cosimulation approach. *L. Degrad. Dev.* 28, 2086–2097. <https://doi.org/10.1002/ldr.2734>
- Rodríguez, G., Lama, A., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J., 2008. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresour. Technol.* 99, 5261–5269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.027>
- Rodríguez, G., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J., 2007.

- Effect of steam treatment of alperujo on the composition, enzymatic saccharification, and in vitro digestibility of alperujo. *J. Agric. Food Chem.* 55, 136–142. <https://doi.org/10.1021/jf0616513>
- Rogelj, J., Luderer, G., Pietzcker, R.C., Kriegler, E., Schaeffer, M., Krey, V., Riahi, K., 2015. Energy system transformations for limiting end-of-century warming to below 1.5 °C. *Nat. Clim. Chang.* 5, 519–527. <https://doi.org/10.1038/nclimate2572>
- Román, M., Rivera, C., Cardona, L., Muñoz, L., Gomez, D., Passaro, C., Quiceno, J.M., 2016. Guia de Extracción por Fluidos Super criticos: Fundamentos y Aplicaciones. Tecnoparque. https://repositorio.sena.edu.co/bitstream/handle/11404/4698/guia_extraccion_fluidos_supercriticos.pdf;jsessionid=F8A68A600E01BEBDA68A3B21052671EF?sequence=1 (fecha de acceso: 14 de diciembre de 2021)
- Romaní, A., Larramendi, A., Yáñez, R., Cancela, Á., Sánchez, Á., Teixeira, J.A., Domingues, L., 2019. Valorization of *Eucalyptus nitens* bark by organosolv pretreatment for the production of advanced biofuels. *Ind. Crops Prod.* 132, 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.040>
- Romero-García, J.M., Lama-Muñoz, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Moya, M., Ruiz, E., Fernández-Bolaños, J., Castro, E., 2016a. Obtaining sugars and natural antioxidants from olive leaves by steam-explosion. *Food Chem.* 210, 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.003>
- Romero-García, J.M., Martínez-Patiño, C., Ruiz, E., Romero, I., Castro, E., 2016b. Ethanol production from olive stone hydrolysates by xylose fermenting microorganisms. *Bioethanol* 2, 51–65. <https://doi.org/10.1515/bioeth-2016-0002>
- Romero-García, J.M., Sanchez, A., Rendón-Acosta, G., Martínez-Patiño, J.C., Ruiz, E., Magaña, G., Castro, E., 2016c. An olive tree pruning biorefinery for co-producing high value-added bioproducts and biofuels: Economic and energy efficiency analysis. *Bioenerg. Res.* 9, 1070–1086. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9786-3>
- Romero, A., 2010. Aprovechamiento de la biomasa como fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat.* 104, 331–345.
- Romero, C., Medina, E., Mateo, A., Brenes, M., 2017. New by-products rich in bioactive substances from the olive oil mill processing. *J. Sci. Food Agric.* 98, 225–230. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8460>
- Roselló-Soto, E., Barba, F.J., Parniakov, O., Galanakis, C.M., Lebovka, N., Grimi, N., Vorobiev, E., 2015. High voltage electrical discharges, pulsed electric field, and

- ultrasound assisted extraction of protein and phenolic compounds from olive kernel. *Food Bioprocess Technol.* 8, 885–894. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1456-x>
- Rouches, E., Herpoël-Gimbert, I., Steyer, J.P., Carrere, H., 2016. Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 59, 179–198. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.317>
- Rubio-Senent, F., Martos, S., Lama-Muñoz, A., Fernández-Bolaños, J.G., Rodríguez-Gutiérrez, G., Fernández-Bolaños, J., 2015. Isolation and identification of minor secoiridoids and phenolic components from thermally treated olive oil by-products. *Food Chem.* 187, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.022>
- Ruiz-Sierra, A.R., Campos Iturralde, M., Llorente Ruiz De Azúa, P., Mallorquín Esteban, P., Zika, E., Mengal, P., 2012. Una oportunidad para la bioindustrias en Europa. <https://www.publicacionescajamar.es/publicacionescajamar/public/pdf/publicaciones-periodicas/mediterraneo-economico/31/31-788.pdf> (fecha de acceso: 3 de noviembre de 2021)
- Ruiz, E., Romero-García, J.M., Romero, I., Manzanares, P., Negro, M.J., Castro, E., 2017. Olive-derived biomass as a source of energy and chemicals. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 11, 1077–1094. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Saggi, S.K., Dey, P., 2019. An overview of simultaneous saccharification and fermentation of starchy and lignocellulosic biomass for bio-ethanol production. *Biofuels* 10, 287–299. <https://doi.org/10.1080/17597269.2016.1193837>
- Saha, K., Maharana, A., Sikder, J., Chakraborty, S., Curcio, S., Drioli, E., 2019. Continuous production of bioethanol from sugarcane bagasse and downstream purification using membrane integrated bioreactor. *Catal. Today* 331, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2017.11.031>
- SAIREM, 2021. Microondas y radiofrecuencia. <https://www.sairem.com/es/> (fecha de acceso: 21 de noviembre de 2021)
- Salapa, I., Katsimpouras, C., Topakas, E., Sidiras, D., 2017. Organosolv pretreatment of wheat straw for efficient ethanol production using various solvents. *Biomass Bioenergy* 100, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.03.011>
- Saleh-Abdo, T., Kumar-Gupta, V., 2016. An overview of membrane science and technology, in: *Nanomaterial and polymer membranes*, , (Ed. Abdo-Saleh, T., Kumar, V.). Elsevier, Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804703-3.00001-2>

- Sampedro, I., Cajthaml, T., Marinari, S., Petruccioli, M., Sampedro, I., Grego, S., Annibale, A.D., 2009. Organic matter transformation and detoxification in dry olive mill residue by the saprophytic fungus *Paecilomyces farinosus*. *Process Biochem.* 44, 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.10.016>
- Sánchez-Arévalo, C.M., Jimeno-Jiménez, Á., Carbonell-Alcaina, C., Vincent-Vela, M.C., Álvarez-Blanco, S., 2021. Effect of the operating conditions on a nanofiltration process to separate low-molecular-weight phenolic compounds from the sugars present in olive mill wastewaters. *Process Saf. Environ. Prot.* 148, 428–436. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.10.002>
- Sandberg, M., Venkatesh, G., Granström, K., 2017. Experimental study and analysis of the functional and life-cycle global warming effect of low-dose chemical pre-treatment of effluent from pulp and paper mills. *J. Clean. Prod.* 174, 701–709. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.214>
- Santos, J.I., Fillat, Ú., Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., Negro, M.J., Ballesteros, I., Rodríguez, A., Ibarra, D., 2017. Evaluation of lignins from side-streams generated in an olive tree pruning-based biorefinery: Bioethanol production and alkaline pulping. *Int. J. Biol. Macromol.* 105, 238–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.030>
- SARAPECO, 2021. Supercritical CO₂ Extraction Machines. https://separeco.com/?gclid=CjwKCAiAv_KMBhAzEiwAs-rX1Ji65tl_PJ5sASD8KKDI70KkQb_l8S6ppgHzNePPLM6PZzQpvBEjXxoCtP8QAvD_BwE (fecha de acceso: 21 de noviembre de 2021)
- Sari, Y.W., Syafitri, U., Sanders, J.P.M., Bruins, M.E., 2015. How biomass composition determines protein extractability. *Ind. Crops Prod.* 70, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.020>
- Sarris, D., Galiotou-Panayotou, M., Koutinas, A.A., Komaitis, M., Papanikolaou, S., 2011. Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 1439–1448. <https://doi.org/10.1002/jctb.2658>
- Sayehban, P., Seidavi, A., Dadashbeiki, M., Ghorbani, A., de Araújo, W.A.G., Durazzo, A., Lucarini, M., Gabrielli, P., Omri, B., Albino, L.F.T., Souto, E.B., Santini, A., 2020. Olive pulp and exogenous enzymes feed supplementation effect on the carcass and offal in broilers: A preliminary study. *Agriculture.* 10, 359. <https://doi.org/10.3390/agriculture10080359>

- Scepankova, H., Martins, M., Estevinho, L., Delgadillo, I., Saraiva, J.A., 2018. Enhancement of bioactivity of natural extracts by non-thermal high hydrostatic pressure extraction. *Plant Foods Hum. Nutr.* 73, 253–267. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0687-9>
- Schievano, A., Adani, F., Buessing, L., Botto, A., Casoliba, E.N., Rossoni, M., Goldfarb, J.L., 2015. An integrated biorefinery concept for olive mill waste management: Supercritical CO₂ extraction and energy recovery. *Green Chem.* 17, 2874–2887. <https://doi.org/10.1039/c5gc00076a>
- Sciubba, F., Chronopoulou, L., Pizzichini, D., Lionetti, V., Fontana, C., Aromolo, R., Socciarelli, S., Gambelli, L., Bartolacci, B., Finotti, E., Benedetti, A., Miccheli, A., Neri, U., Palocci, C., Bellincampi, D., 2020. Olive mill wastes: A source of bioactive molecules for plant growth and protection against pathogens. *Biology.* 9, 450. <https://doi.org/10.3390/biology9120450>
- Scoma, A., Bertin, L., Zanaroli, G., Fraraccio, S., Fava, F., 2011. A physicochemical-biotechnological approach for an integrated valorization of olive mill wastewater. *Bioresour. Technol.* 102, 10273–10279. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.080>
- Scoma, A., Varela-Corredor, F., Bertin, L., Gostoli, C., Bandini, S., 2016. Recovery of VFAs from anaerobic digestion of dephenolized olive mill wastewaters by electrodialysis. *Sep. Purif. Technol.* 159, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.12.029>
- Selvamuthukumaran, M., Shi, J., 2017. Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. *Food Qual. Saf.* 1, 61–81. <https://doi.org/10.1093/fqs/fyx004>
- Seok, J., Lee, Y., Y., Hyun kim, T., 2016. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 199, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>
- Sequeiros, A., Labidi, J., 2017. Characterization and determination of the S/G ratio via Py-GC/MS of agricultural and industrial residues. *Ind. Crops Prod.* 97, 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.056>
- Shirkavand, E., Baroutian, S., Gapes, D.J., Young, B.R., 2016. Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment - A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 54, 217–234. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.003>

- SIGPAC, 2021. SIGPAC web.
<https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/sigpac/index.xhtml> (fecha de acceso 6 de noviembre de 2021)
- Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A., 2016. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview. *Bioresour. Technol.* 199, 76–82.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>
- Sindhu, R., Pandey, A., Binod, P., 2015. Alkaline Treatment., in: Pretreatment of biomass, (Ed. Padey, A., Negi, S., Binod, P., Larroche, C.). Elsevier, Helsinki, Finland <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800080-9.00004-9>
- Sharayei, P., Azarpazhooh, E., Zomorodi, S., Ramaswamy, H.S., 2019. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *LWT - Food Sci. Technol.* 101, 342–350.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.031>
- Singleton, V.L., Rossi, S.A., 1965. Colorimetric of total phenolics with phosphomolibdic Phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2005. Determination of extractives in biomass laboratory analytical procedure (LAP) .NREL/TP-510-42619; National Renewable Energy Laboratory: Golden, CO, USA
- Solarte-Toro, J.C., Romero-García, J.M., López-Linares, J.C., Ramos, E.R., Castro, E., Alzate, C.A.C., 2018. Simulation approach through the biorefinery concept of the antioxidants, lignin and ethanol production using olive leaves as raw material. *Chem. Eng. Trans.* 70, 925–930. <https://doi.org/10.3303/CET1870155>
- Soto-García, M., Rosales-Castro, M., 2016. Effect of solvent and solvent-to-solid ratio on the phenolic extraction and the antioxidant capacity of extracts from *Pinus durangensis* and *Quercus sideroxyla* bark. *Maderas Cienc. y Tecnol.* 18, 701–714.
<https://doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>
- Sowbhagya, H.B., Chitra, V.N., 2010. Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50, 146–161.
<https://doi.org/10.1080/10408390802248775>
- Spiridon, I., 2018. Biological and pharmaceutical applications of lignin and its derivatives: A mini-review. *Cellul. Chem. Technol.* 52, 543–550.
- Stansted Fluid Power, 2021. Very high pressure homogenizers.
<https://www.stanstedfluidpower.com/> (fecha de acceso 6 de noviembre de 2021)

- Stiefel, S., Di Marino, D., Eggert, A., Kühnrich, I.R., Schmidt, M., Grande, P.M., Leitner, W., Jupke, A., Wessling, M., 2017. Liquid/liquid extraction of biomass-derived lignin from lignocellulosic pretreatments. *Green Chem.* 19, 93. <https://doi.org/10.1039/c6gc02270g>
- Stiti, N., Hartmann, M.A., 2012. Nonsterol triterpenoids as major constituents of *Olea europaea*. *J. Lipids* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/476595>
- Subramaniam, B., 2017. Sustainable processes with supercritical fluids, in: *Earth systems and environmental sciences*. Elsevier, Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10252-0>
- SULZER, 2021. Home. Sulzer. <https://www.sulzer.com/> (fecha de acceso 6 de noviembre de 2021)
- Sun, Shaoni, Sun, Shaolong, Cao, X., Sun, R., 2016. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresour. Technol.* 199, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>
- Susmozas, A., Moreno, A.D., Romero-García, J.M., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2019. Designing an olive tree pruning biorefinery for the production of bioethanol, xylitol and antioxidants: A techno-economic assessment. *Holzforschung* 73, 15–23. <https://doi.org/10.1515/hf-2018-0099>
- Sygouni, V., Pantziaros, A.G., Iakovides, I.C., Sfetsa, E., Bogdou, P.I., Christoforou, E.A., Paraskeva, C.A., 2019. Treatment of two-phase olive mill wastewater and recovery of phenolic compounds using membrane technology. *Membranes* 9, 27. <https://doi.org/10.3390/membranes9020027>
- Taamalli, A., Lozano Sánchez, J., Jebabli, H., Trabelsi, N., Abaza, L., Segura Carretero, A., Youl Cho, J., Arráez Román, D., 2019. Monitoring the bioactive compounds status in *Olea europaea* according to collecting period and drying conditions. *Energies* 12, 947. <https://doi.org/10.3390/en12050947>
- Tabernero, M., Sarriá, B., Largo, C., Martínez-López, S., Madrona, A., Espartero, J.L., Bravo, L., Mateos, R., 2014. Comparative evaluation of the metabolic effects of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives (hydroxytyrosyl acetate and ethyl hydroxytyrosyl ether) in hypercholesterolemic rats. *Food Funct.* 5, 1556–1563. <https://doi.org/10.1039/c3fo60677e>
- Talebniya, F., Karakashev, D., Angelidaki, I., 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour. Technol.* 101, 4744–4753. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.080>

- Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A.M., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., 2015. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Res. Int.* 77, 92–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.011>
- Tapia-Quirós, P., Montenegro-Landívar, M.F., Reig, M., Vecino, X., Alvarino, T., Cortina, J.L., Saurina, J., Granados, M., 2020. Olive mill and winery wastes as viable sources of bioactive compounds: A study on polyphenols recovery. *Antioxidants* 9, 1074. <https://doi.org/10.3390/antiox9111074>
- Tayier, M., Duan, D., Zhao, Y., Ruan, R., Wang, Y., Liu, Y., 2018. Catalytic effects of various acids on microwave-assisted depolymerization of organosolv lignin. *BioResources* 13, 412–424. <https://doi.org/10.15376/biores.13.1.412-424>
- Taylor, M.J., Alabdrabalameer, H.A., Skoulou, V., 2019. Choosing physical, physicochemical and chemical methods of pre-treating lignocellulosic wastes to repurpose into solid fuels. *Sustain.* 11, 3604. <https://doi.org/10.3390/su11133604>
- Teixeira, A.R.S., Santos, J.L.C., Crespo, J.G., 2014. Assessment of solvent resistant nanofiltration membranes for valorization of deodorizer distillates. *J. Membr. Sci.* 470, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.07.032>
- TESEO, 2012. Extracción líquido-líquido - Operaciones Unitarias III. <https://sites.google.com/site/teseop3/proceso/actividad-1> (fecha de acceso: 19 de octubre de 2021)
- Testai, L., 2015. Flavonoids and mitochondrial pharmacology: A new paradigm for cardioprotection. *Life Sci.* 135, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.04.017>
- Thimmappa, R., Geisler, K., Louveau, T., O'Maille, P., Osbourn, A., 2014. Triterpene biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 225–257. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120229>
- Toledano, A., Alegría, I., Labidi, J., 2013. Biorefining of olive tree (*Olea europea*) pruning. *Biomass Bioenergy* 59, 503–511. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.10.019>
- Tomás-Pejó, E., Alvira, P., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2011. Pretreatment technologies for lignocellulose-to-bioethanol conversion, in: *Biofuels*, (Ed. Pandey, A., Larroche, C., Ricke, S.C., Dussap, C.G., Gnansounou, E.). Elsevier, Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00007-3>
- Tortosa, G., Alburquerque, J.A., Ait-Baddi, G., Cegarra, J., 2012. The production of commercial organic amendments and fertilisers by composting of two-phase olive

- mill waste (“alperujo”). *J. Clean. Prod.* 26, 48–55.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.12.008>
- Travaini, R., Martín-juárez, J., Lorenzo-hernando, A., Bolado-rodríguez, S., 2016. Ozonolysis : An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. *Bioresour. Technol.* 199, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.143>
- Travaini, R., Otero, M.D.M., Coca, M., Da-Silva, R., Bolado, S., 2013. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. *Bioresour. Technol.* 133, 332–339.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.133>
- Trikas, E.D., Papi, R.M., Kyriakidis, D.A., Zachariadis, G.A., 2017. Evaluation of ion exchange and sorbing materials for their adsorption/desorption performane towards anthocyanins, total phenolics, and sugars from a grape pomace extract. *Separations* 4, 9. <https://doi.org/10.3390/separations4010009>
- Tsimogiannis, D., Oreopoulou, V., 2019. Classification of phenolic compounds in plants, in: *Polyphenols in plants*, (Ed. Watson, R.R.). Elsevier, Helsinki, Filand..
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813768-0.00026-8>
- Tundis, R., Conidi, C., Loizzo, M.R., Sicari, V., Cassano, A., 2020. Olive mill wastewater polyphenol-enriched fractions by integrated membrane process: A promising source of antioxidant, hypolipidemic and hypoglycaemic compounds. *Antioxidants* 9, 602.
<https://doi.org/10.3390/antiox9070602>
- UE-28, 2018. Renewable energy for sustainable rural development: significant potential synergies, but mostly unrealised.
https://www.eca.europa.eu/Lists/ECADDocuments/SR18_05/SR_Renewable_Energy_EN.pdf (fecha de acceso: 11 de octubre 2021)
- Usmani, Z., Sharma, M., Gupta, P., Karpichev, Y., Gathergood, N., Bhat, R., Gupta, V.K., 2020. Ionic liquid based pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced bioconversion. *Bioresour. Technol.* 304, 123003.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123003>
- Vankar, P.S., 2004. Essential oils and fragrances from natural sources. *Resonance* 9, 30–41. <https://doi.org/10.1007/bf02834854>
- Vázquez, H.J., Dacosta, O., 2007. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ing. Investig. y Tecnol.* 8, 249–259. <https://doi.org/10.22201/fi.25940732e.2007.08n4.020>
- Vergara-Barberán, M., Lerma-García, M.J., Herrero-Martínez, J.M., Simó-Alfonso, E.F.,

2015. Use of an enzyme-assisted method to improve protein extraction from olive leaves. *Food Chem.* 169, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.116>
- Vladić, J., Janković, T., Živković, J., Tomić, M., Zdunić, G., Šavikin, K., Vidović, S., 2020. Comparative study of subcritical water and microwave-assisted extraction techniques impact on the phenolic compounds and 5-hydroxymethylfurfural content in pomegranate peel. *Plant Foods Hum. Nutr.* 75, 553–560. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00848-6>
- Wang, Lu, 2021. Overcome saccharification barrier: Advances in hydrolysis technology, in: *Advances in 2nd generation of bioethanol production*, (Ed. Lu, X.). Elsevier, Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818862-0.00005-4>
- Wang, S., Dai, G., Yang, H., Luo, Z., 2017. Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: A state-of-the-art review. *Prog. Energy Combust. Sci.* 62, 33–86. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2017.05.004>
- Wang, W., Guo, J., Zhang, J., Peng, J., Liu, T., Xin, Z., 2015. Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran. *Food Chem.* 171, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.095>
- Wang, Y.N., Tang, C.Y., 2011. Nanofiltration membrane fouling by oppositely charged macromolecules: Investigation on flux behavior, foulant mass deposition, and solute rejection. *Environ. Sci. Technol.* 45, 8941–8947. <https://doi.org/10.1021/es202709r>
- Weeranoppanant, N., Adamo, A., Sapparaiuly, G., Rose, E., Fleury, C., Schenkel, B., Jensen, K.F., 2017. Design of multistage counter-current liquid-liquid extraction for small-scale applications. *Ind. Eng. Chem. Res.* 56, 4095–4103. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b00434>
- Wen, L., Zhang, Z., Sun, D.W., Sivagnanam, S.P., Tiwari, B.K., 2020. Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60, 1826–1841. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1602823>
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C.S., Zandile, M., Duan, Y., Ma, H., Luo, X., 2018. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. *Ultrason. Sonochem.* 48, 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018>
- Wong-Paz, J.E., Aguilar-Zárate, P., Veana, F., Muñiz-Márquez, D.B., 2020. Impacto de las tecnologías de extracción verdes para la obtención de compuestos bioactivos de los residuos de frutos cítricos. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quim. Biol.* 23, 1–11. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.255>

- Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapple, M., Ladisch, M.R., Lee, Y.Y., 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 96, 1959–1966. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.010>
- Xiao, C., Anderson, C.T., 2013. Roles of pectin in biomass yield and processing for biofuels. *Front. Plant Sci.* 4, 67. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00067>
- Xie, P., Huang, L., Zhang, C., Deng, Y., Wang, X., Cheng, J., 2019. Enhanced extraction of hydroxytyrosol, maslinic acid and oleanolic acid from olive pomace: Process parameters, kinetics and thermodynamics, and greenness assessment. *Food Chem.* 276, 662–674. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.079>
- Xu, D.P., Zheng, J., Zhou, Y., Li, Y., Li, S., Li, H. Bin, 2017. Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. *Food Chem.* 217, 552–559. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.013>
- Yahya, N.A., Attan, N., Wahab, R.A., 2018. An overview of cosmeceutically relevant plant extracts and strategies for extraction of plant-based bioactive compounds. *Food Bioprod. Process.* 112, 69–85. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.09.002>
- Yakhlef, W., Arhab, R., Romero, C., Brenes, M., de Castro, A., Medina, E., 2018. Phenolic composition and antimicrobial activity of Algerian olive products and by-products. *LWT - Food Sci. Technol.* 93, 323–328. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.044>
- Yammine, S., Rabagliato, R., Vitrac, X., Peuchot, M.M., Ghidossi, R., 2019. The use of nanofiltration membranes for the fractionation of polyphenols from grape pomace extracts. *OENO One* 1, 11–26. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2019.53.1.2342>
- Yang, B., Wyman, C.E., 2008. Pretreatment: The key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 2, 26–40. <https://doi.org/10.1002/bbb.49>
- Yilmaz, E., Bagci, P.O., 2019. Ultrafiltration of broccoli juice using polyethersulfone membrane: Fouling analysis and evaluation of the juice quality. *Food Bioproc. Tech.* 12, 1273–1283. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02292-0>
- Yu, Q., Liu, R., Li, K., Ma, R., 2019. A review of crop straw pretreatment methods for biogas production by anaerobic digestion in China. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 107, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.020>
- Yuan, T.Q., Xu, F., Sun, R.C., 2013. Role of lignin in a biorefinery: Separation characterization and valorization. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88, 346–352. <https://doi.org/10.1002/jctb.3996>

- Zabaniotou, A., Kamaterou, P., Pavlou, A., Panayiotou, C., 2018. Sustainable bioeconomy transitions: Targeting value capture by integrating pyrolysis in a winery waste biorefinery. *J. Clean. Prod.* 172, 3387–3397. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.077>
- Zabed, H., Sahu, J.N., Boyce, A.N., Faruq, G., 2016. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 66, 751–774. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>
- Zagklis, D.P., Paraskeva, C.A., 2019. Preliminary design of a phenols purification plant. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 95, 373–383. <https://doi.org/10.1002/jctb.5930>
- Zeković, Z., Pintać, D., Majkić, T., Vidović, S., Mimica-Dukić, N., Teslić, N., Versari, A., Pavlić, B., 2017. Utilization of sage by-products as raw material for antioxidants recovery—Ultrasound versus microwave-assisted extraction. *Ind. Crops Prod.* 99, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.028>
- Zhang, J., Chen, J., Liang, Z., Zhao, C., 2014. New lignans and their biological activities. *Chem. Biodivers.* 11, 1–54. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100433>
- Zhang, J., Wen, C., Zhang, H., Duan, Y., Ma, H., 2020. Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 95, 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.018>
- Zhang, Q.W., Lin, L.G., Ye, W.C., 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chin. Med.* 13, 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
- Zhao, X., Cheng, K., Liu, D., 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 815–827. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1883-1>
- Zheng, A., Li, Hao, Xu, J., Cao, K., Li, Hua, Pu, W., Yang, Z., Peng, Y., Long, J., Liu, J., Feng, Z., 2015. Hydroxytyrosol improves mitochondrial function and reduces oxidative stress in the brain of db/db mice: Role of AMP-activated protein kinase activation. *Br. J. Nutr.* 113, 1667–1676. <https://doi.org/10.1017/S0007114515000884>
- Zhou, X., Li, W., Mabon, R., Broadbelt, L.J., 2017. A critical review on hemicellulose pyrolysis. *Energy Technol.* 5, 52–79. <https://doi.org/10.1002/ente.201600327>
- Zhou, Z., Lei, F., Li, P., Jiang, J., 2018. Lignocellulosic biomass to biofuels and biochemicals: A comprehensive review with a focus on ethanol organosolv

pretreatment technology. *Biotechnol. Bioeng.* 115, 2683–2702.
<https://doi.org/10.1002/bit.26788>

Zhu, J., Yan, C., Zhang, Xin, Yang, C., Jiang, M., Zhang, Xiangwu, 2020. A sustainable platform of lignin: From bioresources to materials and their applications in rechargeable batteries and supercapacitors. *Prog. Energy Combust. Sci.* 76, 100788.
<https://doi.org/10.1016/j.pecs.2019.100788>

ANEXOS

Referencia: Irene Gómez-Cruz, Cristóbal Cara, Inmaculada Romero, Eulogio Castro, Beatriz Gullón (2020). Valorisation of exhausted olive pomace by an eco-friendly solvent extraction process of natural antioxidants. *Antioxidants*, 9(10), 1010.

Resumen: Exhausted olive pomace (EOP) is the waste generated from the drying and subsequent extraction of residual oil from the olive pomace. In this work, the effect of different aqueous solvents on the recovery of antioxidant compounds from this lignocellulosic biomass was assessed. Water extraction was selected as the best option for recovering bioactive compounds from EOP, and the influence of the main operational parameters involved in the extraction was evaluated by response surface methodology. Aqueous extraction of EOP under optimised conditions (10% solids, 85 °C, and 90 min) yielded an extract with concentrations (per g EOP) of phenolic compounds and flavonoids of 44.5 mg gallic acid equivalent and 114.9 mg rutin equivalent, respectively. Hydroxytyrosol was identified as the major phenolic compound in EOP aqueous extracts. Moreover, these extracts showed high antioxidant activity, as well as moderate bactericidal action against some food-borne pathogens. In general, these results indicate the great potential of EOP as a source of bioactive compounds, with potential uses in several industrial applications.

DOI: 10.3390/antiox9101010

Referencia: Irene Gómez-Cruz, María del Mar Contreras, Inmaculada Romero, Eulogio Castro (2021). A biorefinery approach to obtain antioxidants, lignin and sugars from exhausted olive pomace. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 96, 356-363.

Resumen: Exhausted olive pomace (EOP) is the main residue of the pomace olive oil extracting industry. In this work, EOP was fractionated into valuable components for valorisation: an aqueous extract rich in hydroxytyrosol and mannitol, lignins with antioxidant properties and fermentable sugars. EOP was first subjected to water extraction at 85 °C for 90 min. Several pretreatments based on liquid hot water and organosolv with 50% or 60% ethanol (catalysed and uncatalysed with 1% sulfuric acid) were then evaluated in terms of delignification ability and efficiency for enzymatic hydrolysis of the pretreated solids. Once the best conditions had been selected (50 % ethanol-1% sulfuric acid at 130 °C for 60 min), an organosolv lignin (OL) with antioxidant properties was obtained through acid precipitation of the pretreatment liquor. This was compared to the enzymatic hydrolysis lignin obtained in the subsequent step and to the lignins purified by acid hydrolysis. OL showed a higher total phenolic content and antioxidant activity than the rest of the lignin samples. Chemical differences were also observed that could explain the results.

DOI: 10.1016/j.jiec.2021.01.042

Referencia: Irene Gómez-Cruz, María del Mar Contreras, Florbela Carvalheiro, Luís C. Duarte, Luisa B. Roseiro, Inmaculada Romero, Eulogio Castro (2021). Recovery of bioactive compounds from industrial exhausted olive pomace through ultrasound-assisted extraction. *Biology*, 10(6), 514.

Resumen: Exhausted olive pomace (EOP) is the main agro-industrial waste of the olive pomace extracting industries. It contains phenolic compounds and mannitol, so the extraction of these bioactive compounds should be considered as a first valorization step, especially if EOP is used as biofuel. Therefore, EOP was subjected to bath-type ultrasound-assisted extraction (UAE), and the effects of the acetone concentration (20–80%, v/v), solid load (2–15%, w/v), and extraction time (10–60 min) on the extraction of antioxidant compounds were evaluated according to a Box–Behnken experimental design. By means of the response surface methodology, the optimum conditions were obtained: 40% acetone, 8.6% solids, and 43 min. For all the extracts, the total phenolic content (TPC), flavonoid content (TFC), and antioxidant activity (DPPH, ABTS, and FRAP) were determined. With the aim of shortening the extraction time, a two-level factorial experiment design was also carried out using a probe-type UAE, keeping the solid load at 8.6% (w/v) and the acetone concentration at 40% (v/v), while the amplitude (30–70%) and the extraction time (2–12 min) were varied to maximize the aforementioned parameters. Finally, a maximum of phenolic compounds was reached (45.41 mg GAE/g EOP) at 12 min and 70% amplitude. It was comparable to that value obtained in the ultrasonic bath (42.05 mg GAE/g EOP), but, remarkably, the extraction time was shortened, which translates into lower costs at industrial scale. Moreover, the bioactive compound hydroxytyrosol was found to be the major phenolic compound in the extract, i.e., 5.16 mg/g EOP (bath-type UAE) and 4.96 mg/g EOP (probe-type UAE). Other minor phenolic compounds could be detected by capillary zone electrophoresis and liquid-chromatography–mass spectrometry. The sugar alcohol mannitol, another bioactive compound, was also found in the extract, and its content was determined. Thus, the use of this technology can support the valorization of this waste to obtain bioactive compounds, including mannitol, hydroxytyrosol, and other derivatives, before being applied for other uses.

DOI: 10.3390/biology10060514

Referencia: Irene Gómez-Cruz, María del Mar Contreras, Inmaculada Romero, Eulogio Castro (2021). Sequential extraction of hydroxytyrosol, mannitol and triterpenic acids using a green optimized procedure based on ultrasound. *Antioxidants*, 10(11), 1781.

Resumen: Olive-derived biomasses contain bioactive compounds with health promoting effects as well as antioxidant and sweet-tasting properties. However, their sequential extraction has not been attained. In the present study, firstly antioxidants and mannitol were extracted from exhausted olive pomace (EOP) by an eco-friendly method, ultrasound-assisted water extraction (UAW). The amplitude (20–80%), extraction time (2–18 min) and solid loading (2–15%, w/v) were evaluated according to a Box–Behnken experimental design. Using the response surface methodology, the optimal conditions for extraction were obtained: 80% amplitude, 11.5% solid loading and 16 min. It enabled the multi-response optimization of the total phenolic content (TPC) (40.04 mg/g EOP), hydroxytyrosol content (6.42 mg/g EOP), mannitol content (50.92 mg/g EOP) and antioxidant activity (ferric reducing power or FRAP, 50.95 mg/g EOP; ABTS, 100.64 mg/g EOP). Moreover, the phenolic profile of the extracts was determined by liquid chromatography-UV and mass spectrometry, identifying hydroxytyrosol as the main phenolic compound and other minor derivatives could be characterized. Scanning electron microscopy was used to analyze the morphological changes produced in the cellular structure of EOP after UAW. In addition, the chemical composition of the extracted EOP solid was characterized for further valorization. Then, a second extraction step was performed in order to extract bioactive triterpenes from the latter solid. The triterpenes content in the extract was determined and the effect of the previous UAW step on the triterpenes extraction was evaluated. In this case, the use of ultrasound enhanced the extraction of maslinic acid and oleanolic acid from pelletized EOP with no milling requirement. Overall, UAW can be applied to obtain antioxidant compounds and mannitol as first extraction step from pelletized EOP while supporting the subsequent recovery of triterpenic acids.

DOI: 10.3390/antiox10111781

Referencia: Irene Gómez-Cruz, Inmaculada Romero, María del Mar Contreras, Jalel Labidi, Luisa B. Roseiro, Luís C. Duarte, Eulogio Castro, Florbela Carvalheiro (2022). Combined extraction and ethanol organosolv fractionation of exhausted olive pomace for bioactive compounds. *Advanced Sustainable Systems*, 6, 2100361.

Resumen: The olive pomace oil extracting industry generates large amounts of exhausted olive pomace (EOP), a lignocellulosic waste that needs to be managed according to sustainable criteria. The aim of this work is to devise an integrated strategy to valorize EOP by applying two-step extraction, and to evaluate the effect of an ethanol organosolv pretreatment on the delignification and enzymatic hydrolysis of the extracted EOP. Once the extraction and organosolv pretreatment conditions are selected, solubilized lignin is recovered from the pretreatment liquor using different methods. In addition to those organosolv lignin samples, a lignin-rich solid is obtained after enzymatic saccharification of the pretreated solid. All the lignin samples are fully characterized aiming at further valorization. The selected two-step aqueous extraction (85 °C, 90 min, 10% biomass) removes 89% of the extractives content in raw EOP and achieves the full recovery of phenols and mannitol content in that fraction, 4.7 mg gallic acid equivalents per g EOP and 4.5 mg g⁻¹EOP, respectively. The organosolv pretreatment (50% ethanol catalyzed with 1% H₂SO₄, 140 °C, 60 min, 15% biomass) results in a delignified solid with 81% of enzymatic digestibility and a high purity organosolv lignin (>71%), rich in guaiacyl units.

DOI: 10.1002/adsu.202100361

Referencia: Irene Gómez-Cruz, María del Mar Contreras, Inmaculada Romero, Eulogio Castro (2022). Optimization of microwave-assisted water extraction to obtain high value-added compounds from exhausted olive pomace in a biorefinery context. *Foods*, 11 (14), 2002.

Resumen: Microwave-assisted water extraction (MAWE) was evaluated to obtain the valuable bioactive compounds hydroxytyrosol and mannitol from exhausted olive pomace (EOP). The influence of the operational parameters solid loading (3–15%, w/v), temperature (40–100 °C), and extraction time (4–40 min) was studied using an experimental design. The optimized conditions maximizing their joint extraction were 12% w/v solid loading, 100 °C temperature, and 16 min. It was possible to solubilize 5.87 mg of hydroxytyrosol/g EOP and 46.70 mg mannitol/g EOP. The extracts were also further characterized by liquid chromatography–mass spectrometry, which detected other hydroxytyrosol derivatives such as oleacein, verbascoside, and oleuropein. Moreover, the applied MAWE conditions promoted the co-extraction of proteinaceous material, which was also evaluated. In order to carry out an integral valorization of this waste, the extracted EOP solid was further evaluated chemically and microscopically before recovering the bioactive triterpenes. In particular, maslinic acid and oleanolic acid were obtained, 9.54 mg/g extracted solid and 3.60 mg/g extracted solid, respectively. Overall, MAWE can be applied as a first stage in the fractionation of EOP to support its valorization in a biorefinery framework.

DOI: 10.3390/foods11142002.

Referencia: Irene Gómez-Cruz, María del Mar Contreras, Inmaculada Romero, Belina Ribeiro, Luisa B. Roseiro, Luís C. Duarte, Florbela Carvalheiro, Eulogio Castro (2023). Strategies for the purification of hydroxytyrosol-rich extracts obtained from exhausted olive pomace. *Separation and Purification Technology*, 325, 124664.

Resumen: Exhausted olive pomace (EOP) is a residual biomass from which hydroxytyrosol can be recovered. This compound has applications in the food/pharma sectors, but its extraction yields complex extracts that require further purification for some applications.

This work explores purification strategies based on membrane technology, liquid–liquid extraction (LLE), and solid-phase extraction with adsorbents and resins. The hydroxytyrosol content, phenolic profile, antioxidant activity, and inhibition of α -glucosidase and α -amylase were monitored. Hydroxytyrosol stood out in all purified extracts. The best hydroxytyrosol recovery (88.8%) was achieved using LLE with ethyl acetate as the extractant, while the purest extracts in phenolic compounds, including hydroxytyrosol, were obtained using the latter solvent and C18 (529 mg/g), DSC-8 (873 mg/g), and Purosorb PAD910 (523 mg/g). Conversely, mannitol and glucose, at high concentrations in the extract, were selectively retained in the aqueous phases.

The developed strategies are discussed regarding their suitability to provide hydroxytyrosol-concentrated extracts, up to 291 mg/g, with antioxidant and antidiabetic functionalities.

DOI: 10.1016/j.seppur.2023.124664

