

Financiado por:



Junta de Andalucía

Consejería de Transformación Económica,
Industria, Conocimiento y Universidades



TECNOLOGÍAS DE VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS DEL SECTOR OLEÍCOLA

*EXTRACCIÓN DE
COMPUESTOS BIOACTIVOS*



Elaborado por:



**CIT
OLIVA**
CENTRO TECNOLÓGICO
DEL OLIVAR Y
EL ACEITE

INDICE

1.	Los compuestos bioactivos	3
1.1.	Compuestos fenólicos	3
1.1.1.	Compuestos fenólicos en el aceite de oliva	4
1.2.	Ácidos triterpénicos	6
1.2.1.	Ácidos triterpénicos en el aceite de oliva	6
1.3.	Otros compuestos	6
1.4.	Técnicas de extracción de compuestos bioactivos	8
1.4.1.	Técnicas de extracción convencional	8
1.4.2.	Técnicas de extracción modernas	9
2.	Subproductos de la industria oleícola útiles para la extracción de compuestos bioactivos	12
2.1.	Alperujo.....	12
2.2.	Poda y Hojín	14
2.3.	Aguas de lavado	15
3.	Industria andaluza dedicada a la extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industria oleícola.....	16
4.	Patentes sobre técnicas dedicadas a la extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industria oleícola	17
5.	Proyectos de investigación sobre la tecnología de extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industria oleícola en Andalucía.....	26
6.	Estimación del retorno económico en la valorización de subproductos de la industria oleícola para la extracción de compuestos bioactivos.....	30
6.1.	Precio aproximado que la industria de extracción de compuestos bioactivos paga por subproductos oleícolas.....	30
6.2.	Estimación del retorno económico.....	31
7.	Bibliografía.....	32

1. Los compuestos bioactivos

Biesalski et al. (2009) definieron los compuestos bioactivos como compuestos, esenciales y no esenciales, que se encuentran en la naturaleza, forman parte de la cadena alimentaria y se ha demostrado que tienen un efecto sobre la salud humana.

1.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen una clase principal de metabolitos secundarios presentes en plantas, caracterizados por la presencia de uno (ácidos fenólicos) o varios (polifenoles) anillos aromáticos. Estos compuestos se hallan combinados con mono y polisacáridos unidos a uno o varios anillos fenólicos, lo que implica la presencia del grupo hidroxilo (-OH) vinculado a un anillo de seis carbonos.

Los compuestos fenólicos pueden categorizarse de diversas maneras según su diversidad estructural. Los grupos principales de polifenoles incluyen ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones et al., 2012).

Investigadores de todo el mundo han confirmado su alta capacidad antioxidante y otros efectos beneficiosos para la salud (Özcan y Matthäus, 2017). Además, ante la preocupación por los posibles efectos tóxicos de los antioxidantes sintéticos, tanto la industria alimentaria como la comunidad científica han explorado el uso de extractos de hoja de olivo como antioxidantes en grasas y aceites durante el procesamiento y almacenamiento (Rahmanian et al., 2015). Estos compuestos fenólicos ofrecen actividades antioxidantes y antimicrobianas naturales, actuando como mecanismos de defensa contra microorganismos y la radiación ultravioleta. Además, se ha demostrado que poseen beneficios para la salud, como la reducción de la hipertensión, la prevención de problemas cardiovasculares y la supresión de diversos tipos de cáncer y enfermedades virales (Huang et al., 1992; Angerosa et al., 2000; Cifuentes Cabezas, 2017). Debido a esto, industrias como la alimentaria, cosmética y farmacéutica están mostrando un interés especial en ellos, ya que pueden ser utilizados en la creación de suplementos alimenticios o como conservantes naturales de alimentos (İlbay et al., 2014). Estos compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento normal de las plantas, su reproducción y su protección contra patógenos y otras amenazas ambientales.

Tabla 1. Efectos beneficiosos atribuidos a los compuestos fenólicos (Creus, 2004).

Efectos beneficiosos atribuidos a los compuestos fenólicos	Disminución de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL).
	Disminución del proceso inflamatorio en la placa de ateroma.
	Inhibición de la agregación plaquetaria.
	Estimulación de la síntesis de óxido nítrico.
	Estabilización de las fibras de colágeno de la pared arterial.
	Inhibición del daño oxidativo del ADN.
	Activación de las enzimas de detoxificación de

carcinógenos.

De entre todos los compuestos fenólicos, la oleuropeína y el hidroxitirosol han despertado un gran interés tanto en la comunidad científica como en diversas industrias (alimentaria, farmacéutica, cosmética, entre otras). La oleuropeína protege las membranas celulares contra la oxidación de lípidos, lo que ayuda a prevenir enfermedades cardíacas. Su actividad biológica principal, además de sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios, incluye el tratamiento de enfermedades relacionadas con procesos oxidantes e inflamatorios, como el cáncer, la obesidad, trastornos hepáticos, diabetes y enfermedades cardiovasculares. También se ha demostrado que es eficaz como agente fotoprotector, antimutagénico y antioxidante. La luteolina y la apigenina también tienen propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y antioxidantes (Žugčić et al., 2019).

1.1.1. Compuestos fenólicos en el aceite de oliva

La composición fenólica de las aceitunas varía según su variedad, grado de madurez y las condiciones climáticas de la cosecha (Romero, 2001). En las aceitunas se encuentran una amplia variedad de compuestos fenólicos, entre los que destacan los secoiridoides como la oleuropeína (compuesta por ácido elenólico, hidroxitirosol y glucosa), verbascósido y ligustrósido. Además, se encuentran grupos de compuestos fenólicos derivados de ácido cinámico (ácido ferúlico, cafeico, p-cumárico) y ácido benzoico (ácidos 3,4-dihidroxifenilacético, 4-hidroxibenzoico), así como otros fenoles como flavonoides, fenilalcoholes (tirosoles, hidroxitirosol) y pigmentos antocianos (cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido), responsables del color violáceo de las aceitunas maduras (Ryan et al., 2002).

A continuación, se detalla la clasificación y concentración de polifenoles en el aceite de oliva por HPLC (Tsimidou, et al. 1992; Brenes et al., 2000; Owen et al., 2000; Brenes et al., 2002; Hrnčirik y Fritsche, 2004; De la Torre-Carbot, et al., 2005; Oliveras-López et al., 2007; Gómez-Rico et al., 2008; Suárez et al., 2008; García-Villalba et al., 2010; Lozano Sánchez, 2013; Puy Torres, 2013; Sánchez-Ortiz et al., 2016; Moreno González, 2020; Das et al., 2021):

Tabla 2. Concentración de polifenoles en el aceite de oliva por HPLC.

Familia de compuestos fenólicos	Nombre compuesto fenólico	Concentración en aceite de oliva (mg/kg)
Ácidos fenólicos: grupo benzoico	p-Hidroxibenzoico	< 1
	Protocatecuico	
	Vanílico	
	Siríngico	
	Gálico	
Ácidos fenólicos: grupo cinámico	p-Cumárico	
	Cafeico	
	Ferúlico	
	Sinápico	

Lignan	(+)-1-Pinoresinol	2-95
	(+)-1-AcetoxiPinoresinol	20-160 (ausente en variedad 'Picual')
	Hidroxipinoresinol	ND
	Siringaresinol	
Flavonoides	Luteolina	0,5-10
	Apigenina	
	Metoxiluteolina	
	(+)-Taxifolina	ND
	Rutina	
	Quercetina	
Alcoholes fenólicos	Hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol ó 3,4- DHPEA)	1,8-64
	Tirosol (p-hidroxifeniletanol ó p-HPEA)	1,2-24
	Hidroxitirosol acetato	ND
	Tirosol acetato	
Derivados esterificados del ácido cafeico	Verbascósido	ND
Secoiridoideos	Oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EA)	> 100-1.742
	Ligustrósido aglicona (p-HPEA-EA)	
	Hidroxioleuropeína aglicona	
	Metiloleuropeína aglicona	
	Decarboximetiloleuropeína aglicona u oleaceína (3,4-DHPEA-EDA)	

La oleuropeína es el compuesto más abundante, y durante el proceso de fermentación, junto con otros compuestos fenólicos, se hidroliza para producir tirosol y hidroxitirosol (Carbonell Alcaina, 2017).

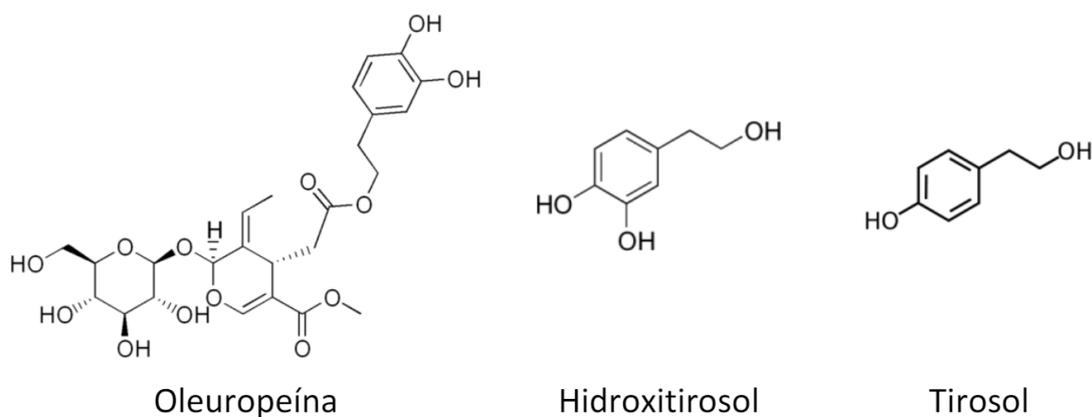


Figura 1. Estructura de los principales polifenoles presentes en la aceituna (Carbonell Alcaina, 2017).

En el caso del alperujo, este se considera una valiosa fuente de compuestos bioactivos. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha potenciado su uso para la obtención de compuestos fenólicos de alto interés para la industria alimentaria y farmacéutica (Arenas Nemoga, 2020).

1.2. Ácidos triterpénicos

Otros componentes notables de la fracción minoritaria del aceite de oliva son los ácidos triterpénicos, siendo los más destacados el uvaol, el eritrodiol, el ácido oleanólico y el ácido maslínico. En los últimos años, estos triterpenos han despertado un gran interés debido a la diversidad de actividades biológicas en las que pueden estar implicados. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la mayor concentración de triterpenos se encuentra en el fruto y las hojas, no en el aceite. Además, los residuos sólidos resultantes del proceso de molienda de la aceituna contienen una cantidad significativa de ácido oleanólico y ácido maslínico, independientemente del método de extracción utilizado (ya sea de 2 o 3 fases, o prensado).

Los triterpenoides son objeto de estudio debido a sus efectos hepatoprotectores, cardioprotectores, antiinflamatorios e inmunomoduladores, entre otros.

1.2.1. Ácidos triterpénicos en el aceite de oliva

Los ácidos triterpénicos han sido cuantificados en el aceite de oliva, y los siguientes resultados se obtuvieron para tres variedades ampliamente distribuidas, así como para la variedad 'Lechín de Granada', que, según la publicación de Allouche et al. (2009), es la que presenta el mayor contenido de triterpenos:

Tabla 3. Ácidos triterpénicos encontrados en el aceite de oliva de las variedades 'Lechín de Granada', 'Picual', 'Cornicabra' y 'Arbequina'.

Ácidos triterpénicos (mg/kg)	Variedad 'Lechín de Granada'	Variedad 'Picual'	Variedad 'Cornicabra'	Variedad 'Arbequina'
Ácido oleanólico	84-73	18-6	42-38	11
Ácido maslínico	35-30	26-8	26-19	21-15
Ácido ursólico	1	1	ND	4-2

1.3. Otros compuestos

Aparte de los polifenoles y ácidos triterpénicos mencionados, en el aceite de oliva y sus subproductos se pueden hallar los siguientes compuestos, que forman parte de la fracción minoritaria del aceite de oliva (Lozano Sánchez et al., 2010; Ghanbari et al., 2012):

Tabla 4. Componentes de la fracción minoritaria del aceite de oliva.

Compuestos de la fracción minoritaria			Composición(mg/Kg)
No relacionados	Hidrocarburos	Hidrocarburos terpénicos (escualeno, β -caroteno o	1500-8000 total

con ácidos grasos		vitamina A)	
		Hidrocarburos esteroides (estigmasta-3,5-dieno)	1250-7500 escualeno
		Hidrocarburos policíclicos aromáticos (fenantreno, naftaleno)	0,3-1 β-caroteno
	Alcoholes alifáticos	Monoconasol, Diconasol, Triconasol, Tetraconasol, Pentaconasol, Hexaconasol, Heptaconasol, Octaconasol	60-200 total
	Alcoholes triterpénicos	24-metilcicloartenol, β-amirina, butirospermol, cicloartenol	1000-1500 total
	Dialcoholes triterpénicos	Eritrodiol, uvaol	10-200 total
	Esteroles	β-sitosterol, Δ-5-avenasterol, campesterol, estigmasterol	800-2400 total (β-sitosterol 75-95%)
	Tocoferoles	α-tocoferol o vitamina E, β/γ-tocoferol Tocotrienoles	70-300 tocoferoles (α-tocoferol >93%)
	Pigmentos	Clorofilas (clorofila a, clorofila b, feofitinas) Carotenos (β-caroteno o vitamina A*, xantofila)	1-10 total
		Compuestos volátiles	Alcoholes Cetonas Aldehidos Ácidos Ésteres
Relacionados	Fosfolípidos	Fosfatidilcolina	40-135 total

con ácidos grasos		Fosfatidiletanolamina		
		Fosfatidilinositol		
		Fisfatidilserina		
	Ceras	Ésteres C-36 a C-46	100-250 total	
	Ésteres de esteroides		Sitosterol	100-250 total
			Campesterol	
		Estigmaterol		

1.4. Técnicas de extracción de compuestos bioactivos

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

1.4.1. Técnicas de extracción convencional

Los métodos convencionales de extracción de compuestos bioactivos se fundamentan en la capacidad de diversos disolventes para extraer estos compuestos, a menudo combinados con calor y/o la mezcla de distintos disolventes. Entre las técnicas usuales se encuentran la extracción sólido-líquido discontinua, la extracción Soxhlet (sólido-líquido continua), la hidrodestilación y la maceración.

Extracción sólido-líquido

Esta técnica se fundamenta en la separación de compuestos de un sólido aprovechando las diferencias de solubilidad en un disolvente específico. Esto implica que uno o varios compuestos de interés sean solubles en el disolvente orgánico y puedan extraerse del sólido para su posterior separación. Para llevar a cabo este proceso, generalmente se añade el disolvente a la mezcla sólida contenida en un recipiente, ya sea en frío o en caliente. Luego se agita o tritura la mezcla y se separa por filtración la disolución que contiene el producto extraído de la fracción insoluble que contiene las impurezas. Después, se procede a separar el disolvente del compuesto de interés para aumentar su pureza y, de esta forma, recuperar el disolvente para futuras extracciones (Shahid, et al., 2016).

Extracción de Soxhlet

La técnica de extracción de Soxhlet fue desarrollada por el químico agrícola alemán Franz Ritter en 1879 con el propósito inicial de extraer grasa de la leche. En la actualidad, esta técnica se emplea ampliamente para extraer valiosos compuestos bioactivos de diversas fuentes naturales. En este método, se coloca una muestra seca en el portamuestras del aparato Soxhlet, mientras que el matraz que contiene el disolvente se calienta para extraer los compuestos de interés. Los vapores del disolvente ascienden por una columna y se condensan en un refrigerante, goteando sobre la muestra en el cartucho. Cuando el cartucho se llena y desborda, el líquido resultante se aspira por un sifón y se devuelve al

matraz de destilación, llevando consigo los compuestos extraídos en el disolvente. Este proceso se repite hasta que se completa la extracción (ver Figura 2) (Shahid, et al., 2016).

Aunque la técnica de Soxhlet es relativamente simple y puede ofrecer mejores rendimientos de extracción en comparación con otras técnicas, presenta algunas desventajas, como el tiempo prolongado necesario para completar la extracción y el desperdicio de grandes cantidades de disolvente, lo cual puede ser difícil de eliminar y causar problemas ambientales adicionales.

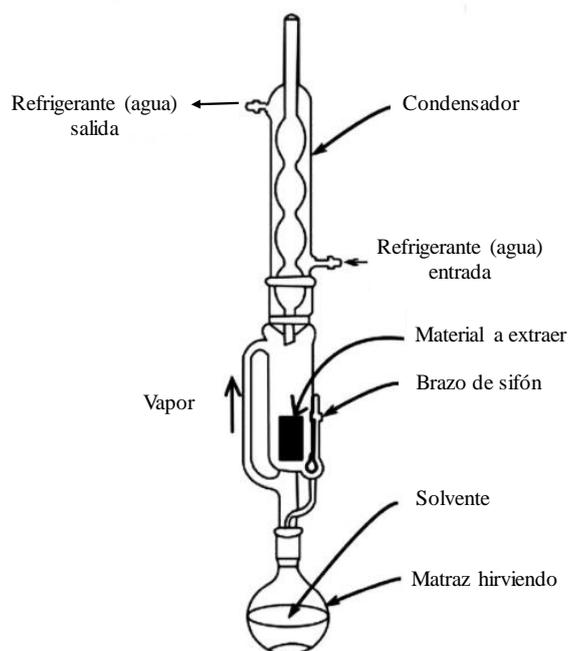


Figura 2. Modelo sistemático de extracción de Soxhlet (Shahid, et al., 2016).

1.4.2. Técnicas de extracción modernas

Las limitaciones inherentes a las técnicas de extracción convencionales, tales como el tiempo requerido para la extracción, el uso de disolventes costosos y de alta pureza, la baja selectividad de extracción, las dificultades asociadas a la eliminación del disolvente y la posible descomposición térmica de compuestos termolábiles, han impulsado el desarrollo de métodos alternativos como la extracción asistida por ultrasonido (UAE), la extracción asistida por microondas (MAE), la combinación de ultrasonidos y microondas (UMAE), y la extracción con fluidos supercríticos (SFE), entre otros. A continuación, se describen algunas de estas técnicas.

- **Extracción asistida de ultrasonido (UAE):** La extracción asistida por ultrasonido (UAE) es una técnica utilizada para extraer compuestos fenólicos de plantas. Las ondas generadas tienen una frecuencia alta, superior a la capacidad auditiva humana (>20kHz), lo que les permite atravesar medios sólidos, líquidos y gaseosos. Estas ondas inducen cavitación en el medio líquido (disolvente), lo que facilita la penetración de este a través del compuesto, aumentando la solubilización de los compuestos de interés (compuestos bioactivos) y, por ende,

mejorando su extracción con un mayor rendimiento (ver Figura 3) (Shahid, et al., 2016).

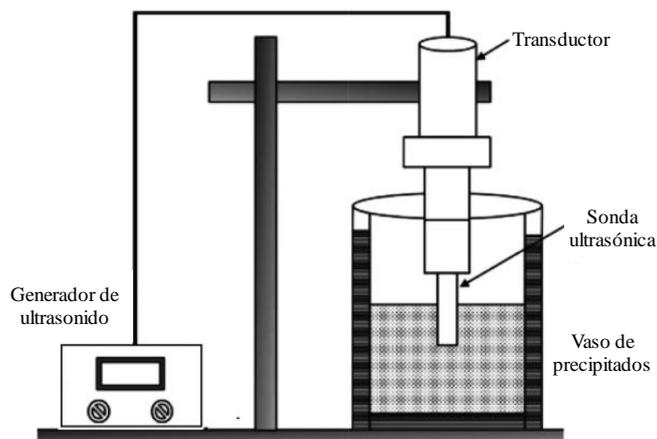


Figura 3. Modelo esquemático de extracción asistida por ultrasonido (Shahid, et al., 2016).

- **Extracción asistida por microondas (MAE):** Las microondas son una forma de energía electromagnética no ionizante con frecuencias que oscilan entre los 300 MHz y los 300 GHz. La energía emitida por estas ondas penetra en la materia y entra en interacción con las moléculas polares de los disolventes, generando calor que facilita la extracción de los compuestos de interés. Esta técnica posibilita la extracción de compuestos fenólicos con velocidades de calentamiento rápidas, tiempos de extracción reducidos y una disminución en el uso de disolventes orgánicos (Rubio García, 2018).

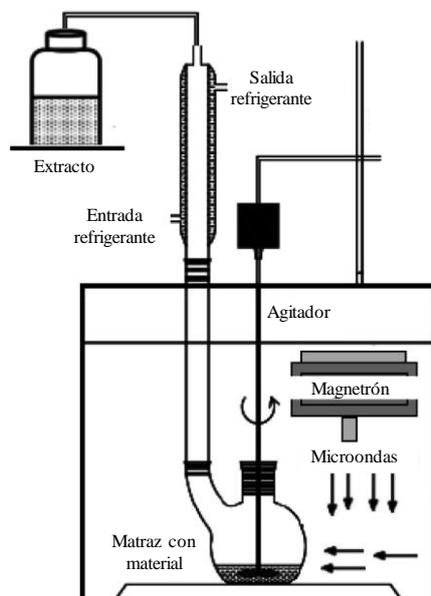


Figura 4. Modelo esquemático de extracción asistida por microondas (Shahid, et al., 2016).

- **Extracción asistida Ultrasonidos-Microondas (UMAE):** Esta técnica se fundamenta en la combinación de las dos técnicas de radiación mencionadas

anteriormente, lo que permite acelerar notablemente el proceso de extracción de compuestos bioactivos, al mismo tiempo que se reduce el consumo de disolventes y se logran rendimientos de extracción superiores a los obtenidos con la extracción convencional, MAE y UAE. El esquema del sistema se muestra en la figura 5.

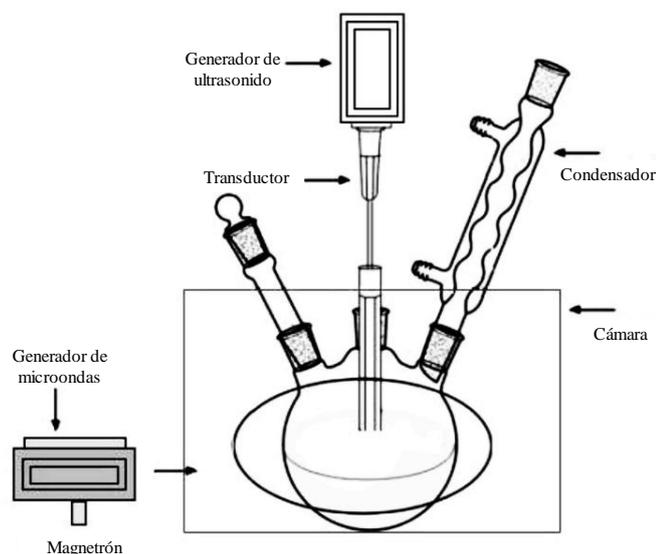


Figura 5. Modelo esquemático de la extracción asistida de ultrasonido-microondas (Shahid, et al., 2016).

- **Extracción con fluidos supercríticos (SFE):** Esta técnica (figura 6) aprovecha el dióxido de carbono, sometiéndolo a condiciones específicas de temperatura y presión que lo convierten en un fluido supercrítico. Este estado, alcanzado por encima de su punto crítico termodinámico, le otorga propiedades únicas: puede penetrar sólidos como un gas y disolver materiales como un líquido. Los fluidos supercríticos son capaces de extraer ciertos compuestos químicos de muestras sólidas complejas utilizando solventes específicos bajo condiciones precisas de temperatura y presión. Posteriormente, estos compuestos extraídos pueden ser fácilmente separados utilizando técnicas cromatográficas como la cromatografía de fluidos supercríticos, la cromatografía de gases o la cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

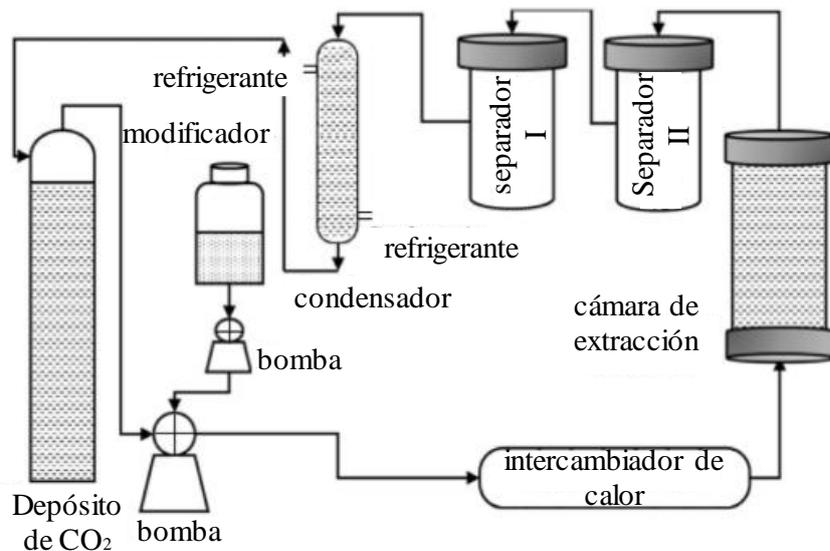


Figura 6. Modelo esquemático de la extracción con fluidos supercríticos (SFE) (Shahid, et al., 2016).

- **Hidrólisis ácida:** La hidrólisis ácida es una técnica utilizada para descomponer biomásas lignocelulósicas o liberar compuestos bioactivos mediante el uso de ácidos fuertes (como H_2SO_4 o HCl) en condiciones controladas de temperatura y presión. En este proceso, el ácido rompe enlaces glicosídicos presentes en polisacáridos complejos, permitiendo la liberación de azúcares simples o compuestos bioactivos de interés. Aunque es eficaz, presenta desafíos como la generación de productos secundarios indeseados, la corrosión de los equipos y la necesidad de neutralización de residuos ácidos. Sin embargo, ha demostrado ser una técnica eficiente en la obtención de precursores para biocombustibles y compuestos bioactivos de interés en industrias farmacéutica y alimentaria.

2. Subproductos de la industria oleícola útiles para la extracción de compuestos bioactivos

2.1. Alperujo

La composición de compuestos fenólicos en el alperujo es muy variable, al igual que en el aceite, y está influenciada por diversos factores como la variedad de aceituna, el grado de maduración, las condiciones climáticas y el proceso de extracción. La siguiente tabla esquematiza el contenido aproximado, determinado por HPLC, de algunos compuestos fenólicos en el alperujo, la mayoría de los cuales también se encuentran presentes en el aceite, según Morsi et al. (2016):

Tabla 5. Compuestos fenólicos en extractos metanólicos de alperujo. Técnica 1: metanol/orujo 20:1 7 min. Técnica 2: metanol/orujo 40:1 30 min.

Compuestos	Rendimiento (mg/g)	
	Técnica de extracción 1	Técnica de extracción 2
Polifenoles		

Ácido siríngico	1,243	0,574
Ácido gálico	0,016	0,196
Pirogalol	4,590	12,834
Ácido 4-aminobenzoico	0,033	0,484
3-Hidroxitirosol	10,70	13,028
Ácido protocatéuico	0,600	1,213
Catequina	0,333	1,347
Ácido clorogénico	0,247	0,909
Catecol	0,387	4,976
Epicatequina	0,815	1,675
Cafeína	0,498	0,254
Ácido 4-hidroxibenzoico	1,107	3,991
Ácido cafeico	0,343	0,179
Ácido vanílico	0,842	1,862
Ácido p-cumárico	0,104	0,833
Ácido ferúlico	0,126	1,181
Oleuropeína	2,383	13,112
Ácido elágico	1,400	2,374
Ácido benzoico	2,030	2,992
Cumarina	0,232	0,169
Ácido salicílico	0,310	0,630
Flavonoides		
Naringina	0,723	2,342
Rutina	0,937	0,570
Hesperidina	2,709	4,413
Ácido rosmarínico	0,181	0,178
Quercitrina	0,281	0,031
Quercetina	0,161	0,230
Naringenina	0,035	0,274
Hesperetina	0,241	1,671
Kaempferol	0,360	0,064
Rhamnetin	1,830	0,065
Apigenina	0,005	0,031

En el caso de los triterpenos, estos se encuentran principalmente en la piel de la aceituna, lo que hace que el alperujo sea una fuente muy rica en estos compuestos (120g/kg) (Romero Barranco et al., 2018). Es posible obtener alrededor del 0,4% de ácido oleanólico y el 0,8% de ácido maslínico a partir de alperujo mediante el método tradicional de extracción con Soxhlet.

Además, en el alperujo se han observado considerables cantidades de celulosa (30%), polisacáridos pécticos (39%), y polímeros de hemicelulosa ricos en xilanos y glucuronoxilanos (14%), xiloglucanos (15%), y manano oligosacáridos (2%) (Rodrigues et al., 2015). Además, el alperujo contiene escualeno, el cual también se encuentra en el

aceite de oliva y posee propiedades cosméticas bien documentadas (Rodrigues et al., 2015).

2.2. Poda y Hojín

El perfil fenólico de las hojas de olivo se ve influenciado por diversos factores agronómicos y tecnológicos, como la edad de las hojas, el grado de madurez, el origen geográfico, el método de cultivo, la proporción de ramas en el árbol, el contenido de humedad, el nivel de contaminación del suelo y los procesos industriales empleados para la extracción, todos los cuales afectan al contenido de oleuropeína en las hojas (Şahin et al., 2011).

Se ha constatado que las hojas poseen un contenido más elevado de flavonoides y compuestos fenólicos que el aceite de oliva virgen extra o la aceituna (Lama-Muñoz et al., 2020).

Tabla 6. Concentración de los principales compuestos fenólicos presentes en extractos de hoja de olivo (Luo, 2011).

Compuestos	Concentración (mg/kg)
3-Hidroxitirosol	919
Tirosol	312
Ácido cafeico	75
Ácido ferúlico	524
Verbacósido	2406
Rutina	4221
Luteolina-7-O-glucósido	6003
Oleuropeína	22708
Luteolina-4-O-glucósido	6471
Apigenina-7-O-glucósido	4537
Luteolina	820
Apigenina	2245
Ácido vanílico	ND
Ácido p-cumárico	ND
Ácido O-cumárico	ND

De todos los compuestos fenólicos, la oleuropeína es el más abundante, seguido por el hidroxitirosol, el luteolina-7-glucósido, el apigenina-7-glucósido y el verbascósido (Vogel et al., 2015).

La oleuropeína presente en las hojas es abundante en la etapa temprana de los frutos jóvenes y disminuye rápidamente a lo largo del proceso de maduración, siendo esta degradación gradual atribuida a la actividad de la enzima β -glucosidasa (Soler-Rivas et al., 2000). El color verde intenso característico de la etapa de desarrollo corresponde al mayor contenido de oleuropeína y al potencial antioxidante, mientras que las hojas que presentan tonalidades verde-amarillentas y notoriamente amarillas tienen un contenido menor de oleuropeína. Sin embargo, este contenido no se ve influenciado por el

momento de la recolección, ya que no se observan diferencias significativas entre las hojas recolectadas en primavera y otoño (Ranalli et al., 2006).

Además, se ha informado que las hojas pueden contener hasta 20 g/kg de ácidos triterpénicos, siendo el ácido oleanólico el más predominante entre ellos (Romero et al., 2017).

2.3. Aguas de lavado

Las aguas de lavado generadas en el proceso de extracción de aceite de oliva mediante el sistema de dos fases contienen una notable cantidad de compuestos bioactivos, en particular compuestos fenólicos y triterpenos, que poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas. Estos compuestos se derivan principalmente de la pulpa y las pieles de las aceitunas, transferidos al agua durante las etapas de lavado y purificación del aceite.

Entre los compuestos fenólicos más abundantes en las aguas de lavado se encuentran el hidroxitirosol, el tirosol, el ácido cafeico y el ácido p-cumárico (Roig et al., 2006). Estos compuestos se destacan por su alta solubilidad en agua, lo que facilita su transferencia desde la matriz sólida de la aceituna a la fase acuosa durante el proceso de extracción (El-Abbassi et al., 2017; García y Hodaifa, 2017). La Tabla 7 muestra la proporción de estos compuestos en las aguas residuales del sistema de dos fases.

Tabla 7. Proporción de compuestos fenólicos en las aguas residuales del sistema de dos fases en la producción de aceite de oliva (El-Abbassi et al., 2017; García y Hodaifa, 2017).

Compuestos fenólicos	%
Hidroxitirosol	0,5% - 1%
Tirosol	0,3% - 0,7%
Ácido Cafeico	0,1% - 0,3%
Ácido p-Cumárico	0,1% - 0,2%

Un aspecto relevante es la presencia de la oleuropeína en las aguas de lavado, aunque en concentraciones inferiores a las observadas en las hojas de olivo. Durante el proceso de extracción, la oleuropeína se degrada en hidroxitirosol y otros derivados fenólicos, lo que otorga a las aguas de lavado una notable capacidad antioxidante (Wlassics, 1992; Borja et al., 2006).

No obstante, la presencia de estos compuestos bioactivos, si bien aporta un valor añadido desde el punto de vista de la valorización de subproductos, también representa un desafío para el tratamiento de las aguas de lavado debido a la dificultad que presentan estos compuestos para ser biodegradados, aumentando la fitotoxicidad del efluente y complicando su gestión ambiental (Huertas et al., 2013).

3. Industria andaluza dedicada a la extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industria oleícola

En el presente apartado se hace una recopilación de las principales empresas dedicadas a la extracción y utilización de compuestos bioactivos procedentes de los subproductos del olivar. También se recogen las patentes encontradas sobre técnicas asociadas a la obtención de estos productos de valorización.

Tabla 8. Empresas andaluzas dedicadas a la extracción de compuestos bioactivos.

CIF	Razón Social	Domicilio	Teléfono	CP	Municipio	Provincia
B18770289	Biomaslinic SL	Calle Juncarillo (Pq metropolitano industrial y tecnológico)	958357807	18130	Escúzar	Granada
B92284512	Genosa I+D SL	Calle Ivan Pavlov, nº 8 - Bl. 1 Bajo	952028580	29590	Málaga	Málaga

4. Patentes sobre técnicas dedicadas a la extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industria oleícola

Tabla 9. Principales patentes sobre la extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industria oleícola en Andalucía.

N.º de publicación	Título	Solicitantes	Inventores	Descripción	Fecha de publicación
ES2395317	Procedimiento para la obtención de extracto de hidroxitirosol, extracto mezcla de hidroxitirosol y 3,4-dihidroxifenilglicol, y extracto de acetato de hidroxitirosilo, a partir de subproductos del olivo y su purificación.	Consejo superior de investigaciones científicas (CSIC); Universidad de Sevilla	Juan Fernández-Bolaños Guzmán; Guillermo Rodríguez Gutiérrez; Antonio Lama Muñoz; Fátima Senent Rubio; José M ^a Fernández-Bolaños Guzmán; Inés Maya Castilla; Oscar López López; Azucena Maset Castro	El procedimiento describe la obtención y purificación de extractos de hidroxitirosol, incluyendo hidroxitirosol acetilado o en mezcla con 3,4-dihidroxifenilglicol, a partir de subproductos del olivo. Incluye al menos una cromatografía en columna utilizando una mezcla de resinas iónicas. La primera fase produce una fuente líquida rica en fenoles, la segunda fase un extracto enriquecido en hidroxitirosol, y la tercera fase hidroxitirosol muy puro, 3,4-dihidroxifenilglicol y acetato de hidroxitirosilo. Cada fase implica	16/04/2014

				extracción, reacción, concentración, adsorción y desorción utilizando mezclas de resinas de intercambio iónico, adsorción en resinas no iónicas, y otros procesos como membranas de ósmosis inversa y evaporadores.	
ES2199069	Procedimiento de extracción de compuestos fenólicos a partir de un material vegetal residual mediante un tratamiento hidrotérmico.	Centro de investigaciones energéticas, medioambientales y tecnológicas (C.I.E.M.A.T.)	Mercedes Ballesteros Perdices; María José Negro Álvarez; Paloma Manzanares Secades; Ignacio Ballesteros Perdices; José Miguel Oliva Domínguez	La invención describe un procedimiento para extraer los compuestos fenólicos predominantes en materiales vegetales residuales, especialmente en el residuo bruto del proceso de obtención de aceite de oliva conocido como "alperujo", utilizando un tratamiento hidrotérmico con agua caliente en fase líquida. Este método permite la extracción del hidroxitirosol y tirosol presentes en el alperujo, lo	01/02/2004

				que permite determinar su contenido. Estos compuestos son valiosos antioxidantes en la industria alimentaria y farmacéutica.	
ES2341526	Procedimiento de purificación de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) a partir de productos vegetales.	Consejo superior de investigaciones científicas (CSIC)	Guillermo Rodríguez Gutiérrez; Ana Jiménez Araujo; Rocío Rodríguez Arcos; Antonio Lama Muñoz; Juan Fernández-Bolaños Guzmán; Rafael Guillén Bejarano	El procedimiento describe la purificación de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) a partir de productos vegetales, incluyendo cualquier parte de la planta, productos o subproductos derivados del olivo u otras plantas de varias familias. Implica una o más etapas donde se introduce el producto en al menos una columna de resina iónica, seguido de posibles etapas donde el producto eluido se introduce en una columna de resina iónica y/o de adsorción no iónica. También hace referencia al extracto de DHFG obtenido	21/06/2010

				y sus posibles aplicaciones.	
ES2451011	Procedimiento para la producción de un extracto que contiene hidroxitirosol a partir de aceitunas y sólidos que contienen residuos de la extracción de aceite de oliva.	Probelte Pharma, S.A.	José A. López Mas; Sergio A. Streitenberger; Marcos Penalver Mellado; Pedro Martinez Ortiz	Proceso que implica la hidrólisis ácida de materiales seleccionados de aceitunas o residuos de orujo de aceituna, seguido de la purificación de la solución resultante. Se realiza a temperaturas hasta 140°C, con presiones atmosféricas, y un pH entre 1,0 y 6,0. Se eliminan los sólidos suspendidos, se carga el producto en una columna cromatográfica de resina aniónica, se eluyen los productos retenidos con agua y se cargan en una segunda columna con resina no iónica para retener el hidroxitirosol. Los productos retenidos se eluyen con agua sin disolventes orgánicos polares.	26/03/2014

ES2634333	Procedimiento para el tratamiento de residuos y obtención de subproductos de almazara.	Universidad de Granada	Javier Miguel Ochando Pulido; Antonio Martínez Férez	Procedimiento de tratamiento de residuos de almazaras y obtención de subproductos de interés industrial que comprende una etapa de mezclado de residuos sólidos y líquidos que contribuye a mejorar el proceso extractivo, una etapa de extracción y una etapa de separación sólido-líquido	06/07/2018
ES2686279	Procedimiento para la extracción de compuestos fenólicos a partir de agua de vegetación de aceituna y preparación de extracto valorado en polifenoles de aceituna y de uva.	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD); Grap'sud ; Institut National d'Etudes Supérieures Agronomiques de Montpellier (Montpellier SupAgro)	Nelly Urban; Manuel Dornier; Dominique Pallet ; Max Reynes	Procedimiento para la extracción de compuestos fenólicos de pequeña masa molecular, a partir de aguas de vegetación de aceituna. Además, la invención se refiere a un procedimiento para el secado de dichas composiciones por atomización, mediante el empleo de extractos de polifenoles de uva como ayuda al secado, así como a los polvos valorados en compuestos fenólicos de	17/10/2018

				aceituna y de uva obtenidos después del secado.	
ES2813774	Procedimiento para la extracción en hoja de olivo de oleuropeína en una fracción fenólica, composición alimentaria funcional y uso.	Universidad de Sevilla	José M ^a Fernández-Bolaños Guzmán; Inés Maya Castilla; Óscar López López; Paloma Begines Aguilar	La presente invención es un procedimiento para la extracción en hoja de olivo de una fracción fenólica que contiene oleuropeína, que comprende calentar una mezcla de hoja seca de olivo pulverizada y un disolvente eutéctico profundo de azúcares naturales comestibles y agua, y filtrar para obtener un precipitado y una fase acuosa en que dicha fase acuosa contiene la fracción fenólica con la oleuropeína. La invención también comprende una composición alimentaria funcional con un contenido	24/03/2021

				en oleuropeína del 80% - 85% en peso con respecto al peso del extracto fenólico total, y su uso en la industria alimentaria, cosmética o farmacéutica.	
ES2859617	Procedimiento de extracción de compuestos fenólicos.	Universite D'Avignon et Des Pays Du Vaucluse	Valérie Tomao; Aurelia Malapert	El procedimiento extrae al menos un compuesto fenólico de una fase acuosa mediante varias etapas: se provee una fase acuosa con una concentración inicial de compuestos fenólicos; se añade un sacárido en una cantidad determinada para formar una mezcla con agregados sólidos de compuesto fenólico-sacárido; y luego se filtran los agregados sólidos. Las condiciones incluyen una concentración de compuestos fenólicos de al menos 20 mM, un pH ácido, al menos 4 equivalentes molares de sacárido por equivalente	04/10/2021

				molar de compuesto fenólico, y una temperatura máxima de 40°C. El sacárido utilizado es una ciclodextrina.	
WO/2012/175771	Extracto fenólico de los subproductos de la aceituna tratados térmicamente.	Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)	Juan Fernández-Bolaños Guzmán; Guillermo Rodríguez Gutiérrez; Antonio Lama Muñoz; Fátima Senent Rubio	La invención presenta un extracto fenólico obtenido de subproductos de la extracción de aceite de oliva y/o la industria de aderezo de aceitunas, con una alta concentración media de alcoholes y ácidos fenólicos totales. Se detalla el proceso de obtención de este extracto y su aplicación como antioxidante en alimentos, cosméticos y/o productos farmacéuticos, así como su capacidad para inhibir la enzima L-tirosinasa y prevenir enfermedades coronarias al reducir la agregación plaquetaria.	27/12/2012

				Además, se describen las fracciones aisladas obtenidas a partir de este extracto fenólico.	
WO/2021/180996	Procedimiento para la obtención de un extracto fenólico procedente de alpeorujo.	Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)	Aranzazu García Borrego; Elisa María Rodríguez Juan, Cristina Rodríguez Romero; Rocío Abia González; Sara Jaramillo Carmona; María García Borrego; Alejandro Orozco Poncela; María de Itziar Aguirre Jiménez	La invención presenta un procedimiento para obtener un extracto rico en compuestos fenólicos a partir de alperujo fresco de oliva utilizando disolventes eutécticos naturales (NADES) de base ácida. Se explora el uso de este extracto fenólico como nutracéutico, aditivo alimentario y fitosanitario, especialmente para tratar enfermedades microbianas. Además, se propone el alperujo extraído para compostaje y vermicompostaje, principalmente como fertilizante y enmienda orgánica.	16/09/2021

5. Proyectos de investigación sobre la tecnología de extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industria oleícola en Andalucía

Tabla 10. Principales proyectos de investigación sobre la extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industria oleícola en Andalucía.

Nombre del proyecto	Entidades	Investigadores	Descripción	Fecha de ejecución
Grupo Operativo Athenea	Heral Enología S.L. ¹ ; Agroalimentaria Manchega de Biotecnología S.L. (AMBIotec) ² ; Fruyper S.A.; Viñaoliva; Centro Tecnológico del Olivar y del Aceite (CITOLIVA) ³	Manuel Álvarez Rangel ¹ ; Laura Rodríguez ² ; Jorge García ² ; José Alfonso Gómez Guzmán ³	Este proyecto busca la valorización de subproductos en las industrias de aderezo de aceitunas y almazaras, centrándose en la gestión sostenible de los residuos, especialmente las aguas residuales generadas durante la producción. Aunque aborda también el aprovechamiento de lejías y salmueras, así como la extracción de polifenoles.	Agosto 2024 – diciembre 2027
Ecobiolivo	Universidad de Granada ¹ ; Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (CIDAF) ² ; Cooperativas Agro-alimentarias de Granada; Fundación I+D del Software Libre (FIDESOL)	Antonio Segura ¹ ; Álvaro Fernández ¹ ; Asunción López ²	En este proyecto se pretende obtener ingredientes bioactivos del alperujo y el hojín, así como conocer el efecto que produce su consumo prolongado en el tiempo sobre los mecanismos biológicos relacionados con la inflamación.	Octubre 2021 - diciembre 2024
Phenoliva	Instituto de Agricultura Sostenible del Consejo Superior de Investigaciones Científicas ¹ ; Instituto de la Grasa ² ; Acesur ³ ; ETH Zürich-Laboratorio ⁴ ; Fraunhofer; Maspex; Puratos; Tymbark – MWS;	Manuel Anguita Maeso ¹ ; Blanca B. Landa ¹ ; José L. Trapero ¹ ; Cristina Estudillo Cazorla ¹ ; María José Párraga Viúdez ¹ ; Guillermo León-Ropero ¹ ; Juan A. Navas-	El proyecto Phenoliva busca aprovechar completamente el alperujo para extraer antioxidantes fenólicos, mejorar la calidad del suelo y la salud de las plantas, y generar energía a través de la digestión anaerobia. A largo plazo, su objetivo es establecer una	Enero 2020 – diciembre 2022

	PZZ Lubella	Cortés ¹ ; Fernando González Feroso ² ; Guillermo Rodríguez Gutierrez ² ; Melchor Martínez García ³ ; Lola Perez Colodrero ³ ; Claudio Reinhar ⁴	empresa que gestione los residuos del aceite de oliva según el concepto de economía circular. Esta empresa comercializará productos basados en antioxidantes naturales y explorará oportunidades adicionales, como la producción de fertilizantes orgánicos, biogás y conservantes para la industria cosmética.	
Life Olea Regenera	Centro de investigación CEBAS-CSIC ¹ ; Fyneco ² ; Orujo Frío ³ ; Olivais Do Sul ⁴	Vicente Martinez Lopez ¹ ; Teresa Maestre ¹ ; Yolanda Risueño ² ; Mar López ³ ; Alberto González ⁴	Se pretende desarrollar un proceso de revalorización del alperujo, mediante técnicas de separación y concentración de este subproducto, con las que se obtienen una fase sólida, rica en grasas monoinsaturadas, útil para la suplementación animal; y una fase líquida con alto contenido fenólico, adecuada para su uso como bioestimulante en la industria agrícola.	Septiembre 2018 – marzo 2022
Innoleaf	Universidad de Granada ¹ ; Innovaoleo S.L.; Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (CIDAF); Estación Experimental del Zaidín-CSIC; Cooperativa Oleícola el Tejar Nuestra Señora de Araceli	Antonio Segura Carretero ¹ ; David Arráez Román ¹	El proyecto pretende desarrollar nuevos métodos analíticos para la determinación de los compuestos fenólicos y triterpénicos contenidos en la hoja del olivo (hojín).	Abril 2018 - mayo 2020

<p>Oleaf4Value</p>	<p>Instituto Politecnico de Bragança¹; Universita degli studi di Firenze²; InnoRenew CoE³; Martin-Luther- Universitaet Halle-Wittenberg⁴; Natac Biotech S.L.; Oleicola El Tejar; Ingecor Agroforestal SL; Fundación Cener; Instituto Politecnico de Bragança; Biochemize SL; Nizo Food Research Bv; Havforskningsinstituttet (Imr); Mibelle Ag (Mbl); Eurizon SI (Innovarum); Zero Emissions Engineering; Nnfcc Limited; Mowi Feed As</p>	<p>Rolando Dias¹; Joana Amaral¹; Maria João Pereira¹; Getúlio Igrejas¹; Ayssata Almeida¹; Catarina Gomes¹; Claudia Martins¹; Maria Camilla Bergonzi²; Anna Sandak³; Jakub Sandak³; Albert Kravos³; Balázs Dávid³; Miklós Krés³; René Alexander Herrera Díaz³; Wim Wätjen⁴; Christian Büchter⁴; Maximilian Gross⁴</p>	<p>El objetivo del proyecto es establecer seis cadenas de valor para el aprovechamiento de la hoja de olivo, con las que se obtengan productos bioactivos de alto valor añadido.</p>	<p>Junio 2021 – Julio 2024</p>
<p>Innoextract</p>	<p>Domca S. A. ¹; Tecnova Centro Tecnológico²; Troil Vegas Altas S.C.; Citricos de Murcia S.A.; Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación (CTC); Centro Tecnológico Nacional Agroalimentario Extremadura.; Cooperativas Agroalimentarias de Extremadura</p>	<p>Lidia Gil Martínez¹; Guadalupe Gómez²</p>	<p>Desarrollar protocolos de extracción, alternativos al uso de disolventes orgánicos, para la obtención de diferentes compuestos de interés y en distintos subproductos agroalimentarios mediante la utilización de tecnologías limpias no agresivas con el medio ambiente y con rendimientos elevados y económicamente viables, para su aplicación en el sector agrícola, alimentario, cosmética y suplementos alimentarios.</p>	<p>Octubre 2019 – julio 2021</p>

6. Estimación del retorno económico en la valorización de subproductos de la industria oleícola para la extracción de compuestos bioactivos.

Para ofrecer una estimación detallada y profesional sobre los precios que las empresas dedicadas a la extracción de compuestos bioactivos pueden pagar por subproductos de la industria oleícola, se ha realizado una revisión exhaustiva de estudios de mercado y consultado con diversos actores clave del sector. A continuación, se presenta un análisis profundo que pretende determinar, de forma aproximada, el retorno económico, considerando todas las variables relevantes.

6.1. Precio aproximado que la industria de extracción de compuestos bioactivos paga por subproductos oleícolas

Como resultado de realizar diversas encuestas con actores del sector y llevar a cabo un análisis bibliográfico, se han identificado los siguientes valores aproximados que las empresas dedicadas a la extracción de compuestos bioactivos suelen pagar por los subproductos oleícolas:

- **Alperujo:** En situaciones y zonas donde el alperujo tiene una alta demanda, especialmente impulsada por la necesidad de industrias que lo utilizan como materia prima en la extracción de aceite de orujo de oliva crudo, el precio puede alcanzar valores de hasta 12 €/t, situándose en el extremo superior del rango observado. Por su parte, el rango inferior de precio observado se ha situado en 9 €/t. Sin embargo, es importante destacar que, históricamente, el alperujo ha tenido un valor económico bajo, e incluso nulo. En las campañas más recientes, sin embargo, las empresas revalorizadoras han comenzado a pagar un precio moderado por el alperujo, una tendencia influenciada por varias malas cosechas consecutivas que han reducido la producción de este subproducto. Este cambio en el mercado ha llevado a un incremento en su valor percibido. A pesar de las fluctuaciones, el precio medio de adquisición del alperujo durante la temporada 2022/2023 se situó en aproximadamente 10,27 €/t, lo que indica una tendencia hacia un precio moderado y relativamente estable, reflejando la creciente valorización de este subproducto en la industria.
 - Precio medio de adquisición por tonelada: 10,27 €/t.
 - Rango de precios observados: 10- 12 €/t.
- **Hojín:** En situaciones y/o lugares donde el hojín tiene una alta demanda, especialmente en aplicaciones relacionadas con la producción de biomasa, el precio puede posicionarse en el extremo superior del rango, llegando a aproximarse a los 4 €/t. Por otro lado, en escenarios donde su uso no está tan extendido o en aquellos casos en que los costos asociados a su procesamiento no justifican su aprovechamiento, el precio del hojín puede descender considerablemente, situándose en niveles cercanos al extremo inferior del rango,



alrededor de 0 €/t. En estas situaciones, el productor obtiene principalmente el beneficio de deshacerse de este subproducto, dado que el coste del transporte suele ser asumido por la empresa revalorizadora. Aunque no se han encontrado casos documentados donde el productor haya tenido que pagar el transporte, podría ser una posibilidad en años de cosecha excepcionalmente alta, donde la oferta de hojín supera significativamente la demanda. A pesar de estas fluctuaciones, el promedio observado del precio del hojín es de aproximadamente 3,27 €/t, lo que sugiere una tendencia general hacia un valor moderado en el mercado, dependiendo siempre de las condiciones locales y las dinámicas de valorización del subproducto.

- Precio medio de adquisición por tonelada: 3,27 €/t.
- Rango de precios observados: 0 - 4 €/t.
- **Aguas de Lavado:** Históricamente, las aguas de lavado no han tenido un valor económico directo, siendo tratadas más como un residuo que requiere gestión que como un subproducto valioso, lo que ha mantenido su precio de adquisición en 0 €/m³. La tendencia observada muestra que, a diferencia de otros subproductos, las aguas de lavado no han logrado una valorización económica en el mercado, permaneciendo su precio medio de adquisición en 0 €/m³ durante las últimas campañas. En el mejor de los casos, los productores pueden conseguir que las empresas valorizadoras asuman el coste del transporte de este subproducto.
 - Precio medio de adquisición por metro cúbico: 0 €/m³.
 - Rango de precios observados: 0 €/m³.

6.2. Estimación del retorno económico

Para calcular el retorno económico neto (R) que un productor puede obtener de la venta de subproductos a empresas dedicadas a la extracción de compuestos bioactivos, es fundamental considerar varios factores: el precio de venta, los costos de transporte y procesamiento, y la variación anual de los precios. Además, es crucial tener en cuenta quién asume los costos de transporte, ya que esto puede variar entre el productor y la empresa valorizadora.

1. **R:** Retorno económico neto en euros (€).
2. **Cantidad de Subproducto (Q):** Cantidad de subproducto en toneladas (t) o metros cúbicos (m³).
3. **Precio de Compra del Subproducto (P):** Precio que las empresas pagan por el subproducto, en euros por tonelada (€/t) o euros por metro cúbico (€/m³).
4. **Variación Anual de los Precios (V):** Tasa de variación anual del precio del subproducto, expresada como porcentaje (%).

5. **Costos de Transporte (T):** Costos asociados al transporte del subproducto desde el punto de origen hasta la planta de procesamiento, en euros por tonelada-kilómetro (€/t·km).
6. **Distancia al Destino (D):** Distancia en kilómetros (km) entre el punto de origen y la planta de procesamiento.
7. **Costos de Procesamiento (C):** Costos de procesamiento del subproducto en la planta, en euros por tonelada (€/t).
8. **Responsabilidad del Costo de Transporte (F):** Proporción del costo de transporte que asume el productor. Si el productor asume el 100% del costo, $F = 1$. Si lo asume completamente la empresa valorizadora, $F = 0$. Valores intermedios representan un costo compartido.

$$R = Q \times [(P \times (1 + 100V)) - (F \times T \times D + C)]$$

7. Bibliografía

- Allouche, Y., Jimenez, A., Uceda, M., Aguilera, M. P., Gaforio, J. J., & Beltran, G. (2009). Triterpenic content and chemometric analysis of virgin olive oils from forty olive cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(9), 3604-3610.
- Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., & Vito, R. (2000). Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chemistry*, 68(3), 283-287.
- Arenas Nemoga, S. A. (2020). Extracción de compuestos fenólicos mediante el uso de disolventes orgánicos a partir del subproducto obtenido en la elaboración de aceite de oliva virgen (alperujo).
- Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., ... & Weber, P. (2009). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25(11-12), 1202-1205.
- Brenes, M., García, A., Rios, J. J., García, P., & Garrido, A. (2002). Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *International journal of food science & technology*, 37(6), 615-625.
- Brenes, M., Hidalgo, F. J., García, A., Rios, J. J., García, P., Zamora, R., & Garrido, A. (2000). Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 715-720.
- Carbonell Alcaina, C. (2017). Recuperación de compuestos fenólicos contenidos en la salmuera residual del proceso de fermentación de las aceitunas de mesa mediante procesos de membrana: combinación de la ultrafiltración y la nanofiltración (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
- Cifuentes Cabezas, M. S. (2017). Recuperación de polifenoles de aguas residuales del procesado de aceituna de mesa mediante membranas.
- Creus, E. G. (2004). Compuestos fenólicos. *Offarm*, 23(6), 80-84.

- Das, A., Baidya, R., Chakraborty, T., Samanta, A. K., & Roy, S. (2021). Pharmacological basis and new insights of taxifolin: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 112004.
- De la Torre-Carbot, K., Jauregui, O., Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., & López-Sabater, M. C. (2005). Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(11), 4331-4340.
- García-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferraro, C., Vázquez-Martín, A., Menéndez, J. A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 416-429.
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A. H., & Saari, N. (2012). Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)—a review. *International journal of molecular sciences*, 13(3), 3291-3340.
- Gómez-Rico, A., Fregapane, G., & Salvador, M. D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, 41(4), 433-440.
- Hrcirik, K., & Fritsche, S. (2004). Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *European journal of lipid science and technology*, 106(8), 540-549.
- Huang, M. T., Ho, C. T., & Lee, C. Y. (1992). Phenolic compounds in food and their effects on health II (Vol. 2, p. 507). Washington, DC: American Chemical Society.
- İlbay, Z., Şahin, S., & Büyükkabasakal, K. (2014). A novel approach for olive leaf extraction through ultrasound technology: Response surface methodology versus artificial neural networks. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 31, 1661-1667.
- Lama-Muñoz, A., del Mar Contreras, M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., & Castro, E. (2020). Content of phenolic compounds and mannitol in olive leaves extracts from six Spanish cultivars: Extraction with the Soxhlet method and pressurized liquids. *Food Chemistry*, 320, 126626.
- Lama-Muñoz, A., del Mar Contreras, M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., & Castro, E. (2020). Content of phenolic compounds and mannitol in olive leaves extracts from six Spanish cultivars: Extraction with the Soxhlet method and pressurized liquids. *Food Chemistry*, 320, 126626.
- Lozano Sánchez, J. (2013). *Aceite de oliva como alimento funcional: nuevas perspectivas analíticas y tecnológicas*. Universidad de Granada.
- Lozano Sánchez, J., Segura Carretero, A., & Fernández Gutiérrez, A. (2010). El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía. Capítulo, 7, 1-6.

- Luo, H. (2011). *Extraction of antioxidant compounds from olive (Olea europaea) leaf: a thesis present [ie presented] in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Technology in Food Technology at Massey University, Albany, New Zealand* (Doctoral dissertation, Massey University).
- Moreno González, R. (2020). Determinación por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de polifenoles y triterpenos pentacíclicos en aceituna de mesa y aceite de oliva. Estudio de su ingesta en ratas: concentración de dichos compuestos en plasma y contenido intestinal y efecto de la aceituna de mesa sobre lesiones preneoplásicas en el colon.
- Morsi, M. K. S., Galal, S. M., & Alabdulla, O. (2016). Antioxidative activity of olive pomace polyphenols obtained by ultrasound assisted extraction. *J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol*, 10, 95-100.
- Oliveras-López, M. J., Innocenti, M., Giaccherini, C., Ieri, F., Romani, A., & Mulinacci, N. (2007). Study of the phenolic composition of spanish and italian monocultivar extra virgin olive oils: Distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. *Talanta*, 73(4), 726-732.
- Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000). Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry*, 46(7), 976-988.
- Özcan, M. M., & Matthäus, B. (2017). A review: Benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology*, 243, 89-99.
- Puy Torres, S. (2013). Fermentación colónica in vitro de compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Rahmanian, N., Jafari, S. M., & Wani, T. A. (2015). Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends in Food Science & Technology*, 42(2), 150-172.
- Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., & Di Fonzo, V. (2006). Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(2), 434-440.
- Rodrigues, F., Pimentel, F. B., & Oliveira, M. B. P. (2015). Olive by-products: Challenge application in cosmetic industry. *Industrial Crops and Products*, 70, 116-124.
- Roig, A., Cayuela, M. L., & Sánchez-Monedero, M. A. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste management*, 26(9), 960-969.
- Romero Barranco, C., Medina Pradas, E., Mateo, M. A., & Brenes Balbuena, M. (2018). New by-products rich in bioactive substances from the olive oil mill processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(1), 225-230.

- Romero, A. S. (2001). Diagnóstico y estudio de los diferentes sistemas de gestión de alpechines, orujos y alperujos en las almazaras: características de los residuos.
- Romero, C., Medina, E., Mateo, M. A., & Brenes, M. (2017). Quantification of bioactive compounds in Picual and Arbequina olive leaves and fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(6), 1725-1732.
- Rubio García, J. (2018). Extracción de compuestos bioactivos mediante pretratamiento con microondas de subproductos vitivinícolas. Valorización del raspón de la uva.
- Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Lavee, S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92(2), 147-176.
- Şahin, S., Bilgin, M., & Dramur, M. U. (2011). Investigation of oleuropein content in olive leaf extract obtained by supercritical fluid extraction and soxhlet methods. *Separation Science and Technology*, 46(11), 1829-1837.
- Sánchez-Ortiz, A., Bejaoui, M. A., Herrera, M. P. A., Jiménez Márquez, A., & Beltrán Maza, G. (2016). Application of oxygen during olive fruit crushing impacts on the characteristics and sensory profile of the virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(7), 1018-1029.
- Shahid, M., Yusuf, M., & Mohammad, F. (2016). Plant phenolics: A Review on Modern extraction techniques. *Recent Progress in Medicinal Plants*, 41, 265-287.
- Soler-Rivas, C., Espín, J. C., & Wichers, H. J. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1013-1023.
- Suárez, M., Macià, A., Romero, M. P., & Motilva, M. J. (2008). Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Chromatography A*, 1214(1-2), 90-99.
- Tsimidou, M., Papadopoulos, G., & Boskou, D. (1992). Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection. *Food Chemistry*, 44(1), 53-60.
- Vogel, P., Machado, I. K., Garavaglia, J., Zani, V. T., de Souza, D., & Dal Bosco, S. M. (2015). Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health. *Nutrición hospitalaria*, 31(3), 1427-1433.
- Žugčić, T., Abdelkebir, R., Alcantara, C., Collado, M. C., García-Pérez, J. V., Meléndez-Martínez, A. J., ... & Barba, F. J. (2019). From extraction of valuable compounds to health promoting benefits of olive leaves through bioaccessibility, bioavailability and impact on gut microbiota. *Trends in food science & technology*, 83, 63-77.
- El-Abbassi, A., Saadaoui, N., Kiai, H., Raiti, J., & Hafidi, A. (2017). Potential applications of olive mill wastewater as biopesticide for crops protection. *Science of the Total Environment*, 576, 10-21.

-
- García, C. A., & Hodaifa, G. (2017). Real olive oil mill wastewater treatment by photo-Fenton system using artificial ultraviolet light lamps. *Journal of Cleaner Production*, 162, 743-753.
- Wlassics, I. (1992). Isolation of the phytotoxic and biotoxic components in waste waters from olive oil processing. Their oxydation by means of the peroxidase+ H₂O₂ system. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 69(5).
- Borja, R., Raposo, F., & Rincón, B. (2006). Treatment technologies of liquid and solid wastes from two-phase olive oil mills. *Grasas y Aceites*, 57(1), 32-46.
- Huertas, R., Marcos, C., Ibarguren, N., & Ordás, S. (2013). Guía práctica para la depuración de aguas residuales en pequeñas poblaciones. *Duero Hydrographic Confederation. Spanish Ministry of Environment*.