

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ ΜΕ ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ ΚΑΙ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΝΑΝΟΔΙΗΘΗΣΗΣ**Κ. Παπαγεωργίου¹, Ι. Ξηνταροπούλου¹, Π. Λυρή¹, Χ. Παρασκευά^{1,2,*}**¹Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, Ελλάδα²Ίδρυμα Τεχνολογία και Έρευνας/Ινστιτούτο Επιστημών Χημικής Μηχανικής (ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ), Σταδίου, Πλατάνι Αχαΐας, Πάτρα(*takisp@chemeng.upatras.gr)**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η απομόνωση υδροξυτυροσόλης από φύλλα ελιάς με απώτερο σκοπό τον σχεδιασμό μονάδας επεξεργασίας αποβλήτων ελαιοτριβείου, η οποία δε θα αφήνει καθόλου οργανικά υπολείμματα και θα απομονώνει συστατικά με μεγάλη προστιθέμενη αξία (εδώ υδροξυτυροσόλη) έτσι ώστε η διεργασία να είναι κυκλική και να αποφέρει κέρδος μέσα από απόβλητα. Η διαδικασία απομόνωσης της υδροξυτυροσόλης θα πρέπει να μπορεί να εφαρμοστεί εύκολα σε μεγάλη κλίμακα και για αυτό σημαντική παράμετρος στη μελέτη δεν είναι μόνο η απόδοση εκχύλισης και απομόνωσης της ουσίας αλλά και το κόστος της διεργασίας όπως και η δυνατότητά της να λειτουργεί συνεχώς. Στην συγκεκριμένη μελέτη βρέθηκε ότι είναι περισσότερο αποδοτικό να γίνεται η εκχύλιση και υδρόλυση ελαιοευρωπαϊνης σε ένα βήμα και στη συνέχεια να ακολουθούν τα στάδια καθαρισμού του προϊόντος. Τα στάδια καθαρισμού περιλαμβάνουν διηθήσεις μέσω μεμβρανών υπερδιήθησης (ultrafiltration) και νανοδιήθησης (nanofiltration) και εκχυλίσεις υγρού-υγρού με οξικό αιθυλεστέρα για οργανικό διαλύτη. Με κατάλληλη ρύθμιση του pH μπορούμε να επιλέξουμε ποιες ουσίες θα οδηγηθούν στην οργανική φάση και στην περίπτωση μας θέλουμε η απόδοση σε υδροξυτυροσόλη να είναι μεγάλη. Ο οξικός αιθυλεστέρας μπορεί να απομακρυνθεί αρκετά εύκολα λόγω της πτητικότητάς του και να ανακυκλωθεί στη διεργασία. Με σωστό σχεδιασμό των παραπάνω βημάτων μπορεί να απομονωθεί ένα προϊόν μεγάλης προστιθέμενης αξίας από πρώτη ύλη με μηδενικό έως πολύ μικρό κόστος αγοράς. Μεγάλο κέρδος σε αυτό το στάδιο θα δώσει περιθώριο στα υπόλοιπα στάδια επεξεργασίας των αποβλήτων στο να είναι συνεπή χωρίς απαραίτητα να αποφέρουν κέρδος.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η βιομηχανία παραγωγής ελαιόλαδου στην Ελλάδα αποτελείται κυρίως από οικογενειακές επιχειρήσεις μικρής κλίμακας και για το λόγο αυτό δεν υπάρχει σωστός έλεγχος ως προς τη διαχείριση αποβλήτων με μεγάλο οργανικό φορτίο. Τα πιο συνήθη απόβλητα είναι τα υδατικά απόβλητα ελαιοτριβείου (τριφασικό απόβλητο), ο πυρήνας ελαιοτριβείου (διφασικό απόβλητο), το απόβλητο πυρηνελαιουργείου (πυρηνόξυλο), τα φύλλα ελιάς και τα κλαδιά που μένουν στα χωράφια μετά τη συγκομιδή και το κλάδεμα των ελιών. Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται σε ένα από αυτά τα απόβλητα, τα φύλλα της ελιάς. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιείται μελέτη πάνω στην απομόνωση υδροξυτυροσόλης από τα φύλλα ελιάς με σκοπό την παραγωγή ενός προϊόντος μεγάλης καθαρότητας, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επιπρόσθετο σε διάφορες βιομηχανίες όπως αυτή των τροφίμων, καλλυντικών, πλαστικών κ.α. Η υδροξυτυροσόλη είναι ένα φαινολικό μόριο με μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα και ευεργετικές ιδιότητες για τον άνθρωπο^[1]. Οι κυριότερες δράσεις που έχουν αναφερθεί είναι οι αντιφλεγμονώδεις, η υποστήριξη του καρδιαγγειακού συστήματος και γενικότερα η δράση κατά του οξειδωτικού στρες, που προέρχεται από δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και άλλα οξειδωτικά. Η διεργασία διαχωρισμού πραγματοποιείται μετά την διαδικασία της εκχύλισης των ουσιών από τα φύλλα. Σε αυτήν πραγματοποιείται και χημική υδρόλυση (όξινη ή αλκαλική) είτε κατά την εκχύλιση είτε μετά από αυτήν. Σε άλλη εργασία που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας, μελετήθηκαν οι συνθήκες τις

εκχύλισης για εύρεση βέλτιστων συνθηκών. Στην παρούσα μελέτη το εκχύλισμα υπόκειται σε μία σειρά διηθήσεων με συστοιχία μεμβρανών. Πρώτο στάδιο είναι ο διαχωρισμός των στερεών και μεγάλων μακρομορίων με υπερδιήθηση (Ultrafiltration). Το δεύτερο στάδιο είναι η περαιτέρω απομόνωση των απλών φαινολικών και σακχάρων με κατάλληλη μεμβράνη νανοδιήθησης η οποία θα απορρίψει μεγάλα μόρια όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, χρωστικές και μεγάλα φαινολικά όπως ταννίνες, αφήνοντας στο διήθημα μικρά φαινολικά, απλά σάκχαρα και κυρίως το μόριο της υδροξυτυροσόλης. Τελικό στάδιο της διεργασίας είναι ο περαιτέρω καθαρισμός της υδροξυτυροσόλης με εκχύλιση υγρού-υγρού με οξικό αιθυλεστέρα. Με ρύθμιση του pH της υδατικής φάσης μπορούμε να παραλάβουμε την υδροξυτυροσόλη στην οργανική φάση. Με εξάτμιση του διαλύτη μπορούμε να παραλάβουμε αυτήν σε αρκετά μεγάλη καθαρότητα. Η παραπάνω διεργασία αποτελεί ένα σημαντικό μέρος του σχεδιασμού μιας μονάδας επεξεργασίας φύλλων ελιάς και θέτει τα θεμέλια για την μετάβαση στην πιλοτική κλίμακα. Το μεγάλο ενδιαφέρον για την υδροξυτυροσόλη προέρχεται από το γεγονός ότι αυτή είναι μια ουσία με πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα και μπορεί να κάνει την διεργασία επεξεργασίας των αποβλήτων ελαιοτριβείου πολύ επικερδή. Αυτό θα αποτελέσει επιπλέον κίνητρο για την εφαρμογή της μεθόδου σε βιομηχανική κλίμακα.

ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

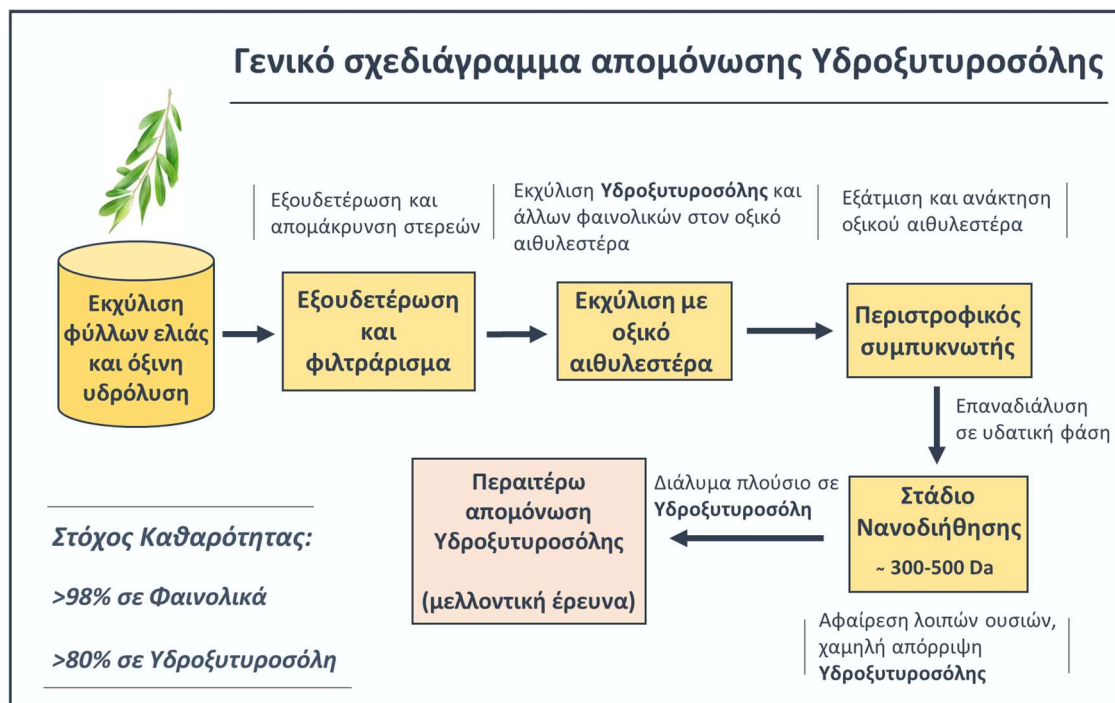
Τα φύλλα ελιάς όπως κάθε άλλη πηγή βιομάζας περιέχουν πληθώρα ουσιών όπως σάκχαρα, φαινολικά, πρωτεΐνες, χρωστικές κ.α. Η αρχική εκχύλιση των ουσιών από την φυτική μάζα θα πρέπει να έχει μεγάλη ανάκτηση στην ουσία ενδιαφέροντος. Οι μέθοδοι ανάκτησης παρόλα αυτά δεν είναι αρκετά εκλεκτικές και πολλές φορές μεγάλη ανάκτηση σε μια ουσία σημαίνει μεγάλη ανάκτηση και στις υπόλοιπες. Επειδή θα δοθεί βαρύτητα στις μεθόδους διαχωρισμού της ουσίας ενδιαφέροντος σε πρώτη φάση δεν θα επιδιωχθεί μεγάλη εκλεκτικότητα στην πρώτη εκχύλιση αλλά στην μεγιστοποίηση της απόδοσης σε ελαιοευρωπαϊνή, υποθέτοντας ότι αυτή είναι η φαινολική ουσία σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα στους ιστούς των φύλλων, η οποία περιέχει το μόριο της υδροξυτυροσόλης. Ως ανιχνευτικές μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν δύο από τις πιο γνωστές φωτομετρικές μεθόδους, η πρώτη για προσέγγιση των ολικών φαινολικών (Total Phenolics) με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu^[2] και η δεύτερη για μέτρηση ολικών σακχάρων και πολυσακχαριτών με αντιδραστήριο τρυπτοφάνης-βορικού οξέος σε θειικό οξύ^[3]. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε υδροξυτυροσόλη υπολογίζεται με ποσοτικές αναλύσεις HPLC. Επειδή η υδροξυτυροσόλη εμπεριέχεται σε διάφορες ουσίες όπως η ελαιοευρωπαϊνή, το verbascoside, ισομερή της ελαιοευρωπαϊνής και άλλους γλυκοζίτες, πριν της ανάλυσης πραγματοποιήθηκε ένα στάδιο χημικής υδρόλυσης έτσι ώστε να υπολογίζεται κάθε φορά μόνο η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης^[4]. Συμπληρωματικά με τα παραπάνω, εφαρμόζεται η μέθοδος ORAC για μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων^[5]. Η ORAC εισέρχεται ως συμπληρωματική της Folin-Ciocalteu και αποσκοπεί στο να προσδώσει παραπάνω κύρος στα αποτελέσματα δεδομένου του ότι η δεύτερη μπορεί να επηρεάζεται και από άλλες ουσίες ικανές να ανάγουν το αντιδραστήριο και να δώσουν φωτομετρικό σήμα στα 760 nm. Επιπλέον, μπορεί κάθε φορά να εξεταστεί η σχετική μεταβολή της μέτρησης ORAC σε σχέση με την μέτρηση Folin-Ciocalteu. Για παράδειγμα μια αύξηση του λόγου ORAC προς ολικά φαινολικά θα ήταν μια ακόμη ένδειξη ότι η περιεκτικότητα σε υδροξυτυροσόλη σε σχέση με τις υπόλοιπες ουσίες αυξάνεται καθώς αυτή έχει αντιοξειδωτική ικανότητα μεγαλύτερη από αυτή του προτύπου της μεθόδου (Trolox).^[6]

Με βάση τις παραπάνω αναλύσεις δοκιμάστηκαν διάφορες μέθοδοι εκχύλισης στερεού-υγρού για ανάκτηση ελαιοευρωπαϊνής από τα φύλλα. Παράλληλα εξετάστηκαν οι συνθήκες υδρόλυσης ώστε να μεγιστοποιηθεί η περιεκτικότητα υδροξυτυροσόλης στο εκχύλισμα. Οι μέθοδοι εκχύλισης που εξετάστηκαν είναι: (1) εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, (2) εκχύλιση με μίγματα αιθανόλης νερού, (3) εκχύλιση με νερό παρουσία οξέος, (4) εκχύλιση με νερό παρουσία βάσης, (5)

εκχύλιση με νερό σε αυξημένες θερμοκρασίες έως 100°C, (6) υδροθερμική κατεργασία σε αυξημένες θερμοκρασίες και πιέσεις^[7], (7) συνδυασμός επίδρασης διαλύτη και θερμοκρασίας, (8) συνδυασμός επίδρασης διαλύτη και pH, (9) συνδυασμός επίδρασης διαλύτη, θερμοκρασίας και pH. Για να έχουν οι αναλύσεις HPLC κοινή βάση αλλά και τα εκχυλίσματα να είναι και απαλλαγμένα από ιστούς, συστατικά της βιομάζας και πρωτεΐνες πραγματοποιείται εκχύλιση υγρού-υγρού με οξικό αιθυλεστέρα έτσι ώστε να εκχυλιστεί η υδροξυτυροσόλη στον οργανικό διαλύτη^[8]. Για την εκχύλιση υγρού-υγρού δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες pH της υδατικής φάσης ώστε να επιλεγεί αυτή με τη μεγαλύτερη ανάκτηση σε υδροξυτυροσόλη και την ελάχιστη ανάκτηση σε άλλα συστατικά.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το πρώτο στάδιο της διεργασίας είναι η εκχύλιση των φύλλων ελιάς (Σχήμα 1). Έχει προηγηθεί η ξήρανση των φύλλων έτσι ώστε να επιτευχθεί καλύτερο άλεσμα σε σωματίδια μικρότερα από 710 μm. Το άλεσμα των φύλλων μειώνει κατά πολύ τον απαιτούμενο χρόνο εκχύλισης καθώς αυξάνεται η επιφάνεια επαφής του διαλύτη με το στερεό. Το στάδιο μπορεί να επιτευχθεί με δύο τρόπους: 1) με εκχύλιση και έπειτα υδρόλυση του διαλύματος μετά από αφαίρεση του στερεού από την υγρή φάση και 2) με εκχύλιση και υδρόλυση σε ένα βήμα. Η δεύτερη αναμένεται να περιλαμβάνει επιπλοκές από την μερική υδρόλυση των συστατικών της βιομάζας όπως η ημι-κυτταρίνη και να οδηγεί σε απελευθέρωση οργανικών οξέων και πιθανώς να απαιτεί επιπλέον στάδια επεξεργασίας για την παραλαβή υδροξυτυροσόλης. Οι εκχυλίσσεις λαμβάνουν χώρα υπό ανάδευση σε ανοιχτά δοχεία στην περίπτωση θερμοκρασίας περιβάλλοντος και στις περιπτώσεις που το σύστημα βρίσκεται υπό βρασμό η εκχύλιση λαμβάνει χώρα υπό αναρροή έτσι ώστε να μην απομακρύνεται ο διαλύτης. Στην περίπτωση υδροθερμικής κατεργασίας το σύστημα είναι κλειστό, κατασκευασμένο από ανοξείδωτο χάλυβα και ικανό να αντέξει θερμοκρασίες έως 350°C και πιέσεις έως 100 bar.



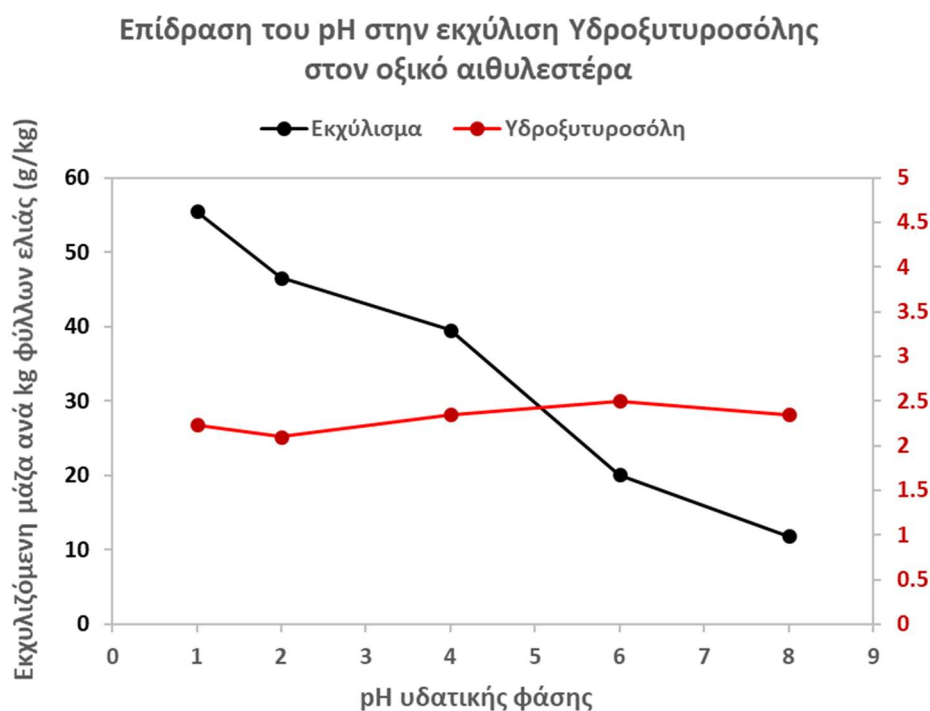
Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση προτεινόμενης μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε για την εκχύλιση και απομόνωση υδροξυτυροσόλης

Μετά το στάδιο της υδρόλυσης το σύστημα εξουδετερώνεται και το pH ορίζεται κατάλληλα έτσι ώστε κατά το στάδιο της εκχύλισης με οξικό αιθυλεστέρα να μεγιστοποιείται η ανάκτηση υδροξυτυροσόλης στην οργανική φάση. Ο οργανικός διαλύτης μπορεί να απομακρυνθεί με

εξάτμιση υπό κενό και το συμπύκνωμα να επαναδιαλυθεί σε υδατικό μέσο έτσι ώστε να ακολουθήσει η διήθηση μέσω μεμβρανών νανοδιήθησης. Σε αυτό το στάδιο τα φαινορικά που αναμένεται να έχουν ανακτηθεί έχουν μοριακά βάρη 150-300 Da και 10-20 kDa. Ένας διαχωρισμός με μια “στενή” μεμβράνη 200-300 Da μπορεί να καθαρίσει σε μεγάλο βαθμό την υδροξυτυροσόλη από λοιπά φαινορικά και μεσαιού μοριακού βάρους προσμίξεις. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της υδροξυτυροσόλης πραγματοποιούνται μετρήσεις σε HPLC. Τα δείγματα που λαμβάνονται μετά την εξάτμιση του οξικού αιθυλεστέρα επαναδιαλύονται σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 1 mg/ml. Η αναλύσεις HPLC πραγματοποιήθηκαν σε στήλη Prodigy C18 ODS3 100A με διαλύτες 0.1% TFA (A) και Acetonitrile (B). Η μέθοδος παρέμεινε σε 10% A για 10 min έτσι ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός της υδροξυτυροσόλης και να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί. Σχετικά με τις μετρήσεις ORAC, Folin-Ciocalteu και ολικών σακχάρων, τα δείγματα μετρήθηκαν κατευθείαν μετά την εκχύλιση, μετά την υδρόλυση και μετά την εκχύλιση υγρού-υγρού έτσι ώστε να παρατηρηθούν μεταβολές κατά την επεξεργασία.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα αναμένεται να έχουν ικανοποιητικότερες αποδόσεις στις πιο σκληρές συνθήκες (π.χ. υδροθερμική κατεργασία). Σημαντικό μέρος της παρούσας μελέτης είναι να επιλεχθούν συνθήκες αρχικής εκχύλισης με μεγάλη απόδοση και στη συνέχεια κατάλληλα στάδια διαχωρισμού με εκλεκτικότητα ως προς την υδροξυτυροσόλη.



Σχήμα 2. Μάζα συμπυκνώματος και υδροξυτυροσόλης που παραλαμβάνεται μετά από εξάτμιση του οξικού αιθυλεστέρα σε συνάρτηση με το pH της υδατικής φάσης

Στην περίπτωση που παρουσιάζεται στο Σχήμα 2 πραγματοποιήθηκε εκχύλιση και υδρόλυση σε ένα στάδιο με 3M υδροχλωρικό οξύ για 15 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε εξουδετέρωση του διαλύματος με καυστικό νάτριο και το pH ρυθμίστηκε κατάλληλα για να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες αύξησης καθαρότητας της υδροξυτυροσόλης. Από το σχήμα φαίνεται ότι η ποσότητα των εκχυλιζόμενων ουσιών μεταβάλλεται δραματικά αν η υδατική φάση ρυθμιστεί εξ' αρχής σε συγκεκριμένες τιμές του pH. Αν η υδατική παραμείνει όξινη, στην οργανική φάση θα καταλήξουν οργανικά και φαινορικά οξέα με χαμηλό pK_a. Αν όμως το pH ρυθμιστεί στο 7-9, τότε η ποσότητα της υδροξυτυροσόλης παραμένει σταθερή αλλά η ποσότητα των άλλων ουσιών μειώνεται σε

μεγάλο βαθμό. Έτσι, με ένα αρκετά απλό στάδιο έγινε δυνατή η αύξηση του ποσοστού της υδροξυτυροσόλης στο 20-25% και κρίθηκε έτσι απαραίτητη η εξουδετέρωση του διαλύματος πριν την εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Τα επόμενα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αναμένεται να δώσουν επιπλέον στοιχεία για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης και διαχωρισμό της υδροξυτυροσόλης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στην απομόνωση υδροξυτυροσόλης από τα φύλλα ελιάς. Τα διάφορα στάδια και παράμετροι της διεργασίας μελετήθηκαν εκτενώς με σκοπό να συλλεχθούν αρκετά δεδομένα για το σχεδιασμό μιας μονάδας επεξεργασίας αυτών των αποβλήτων όπου θα παράγει υδροξυτυροσόλη μεγάλης καθαρότητας για αξιοποίηση της σε τρόφιμα, προϊόντα περιποίησης και συμπληρώματα διατροφής. Αν και η μελέτη πραγματοποιήθηκε μόνο για τα φύλλα, η ίδια μεθοδολογία μπορεί να αναπτυχθεί και για τα υπόλοιπα παραπροϊόντα της επεξεργασίας και συγκομιδής της ελιάς. Η υδροξυτυροσόλη είναι ένα φαινολικό μόριο με μια από τις πιο ισχυρές αντιοξειδωτικές ικανότητες και ο καθαρισμός της από απόβλητα με σκοπό την εμπορευματοποίησή της μπορεί να κάνει την διεργασία επεξεργασίας των αποβλήτων και παραπροϊόντων της ελιάς κερδοφόρα. Ο σχεδιασμός μιας κερδοφόρας διεργασίας, η οποία θα συμβάλει στην κυκλική οικονομία και στην αξιοποίηση αγροτικών πόρων αναμένεται να προσελκύσει το απαραίτητο ενδιαφέρον από άλλους ερευνητές και επενδυτές έτσι ώστε να μπορέσει να εφαρμοστεί στον ελληνικό χώρο.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «INVALOR: Ερευνητική Υποδομή για την Αξιοποίηση Αποβλήτων και Αειφόρου Διαχείρισης Φυσικών Πόρων» (MIS 5002495) που εντάσσεται στη Δράση «Ενίσχυση των Υποδομών Έρευνας και Καινοτομίας» και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Visioli, F.; Galli, C., Olive oil phenols and their potential effects on human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, **46**(10), pp4292-4296.
2. Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology*, Elsevier: 1999; Vol. 299, pp 152-178.
3. Josefsson, B.; Uppström, L.; Östling, G. In *Automatic spectrophotometric procedures for the determination of the total amount of dissolved carbohydrates in Sea Water*, Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts, Elsevier: 1972; pp385-395.
4. Ozkan, M.; Muftuler, F. B.; Kilcar, A. Y.; Medine, E.; Unak, P., Isolation of hydroxytyrosol from olive leaves extract, radioiodination and investigation of bioaffinity using in vivo/in vitro methods. *Radiochimica Acta*, 2013, **101**(9), pp585-593.
5. Gillespie, K. M.; Chae, J. M.; Ainsworth, E. A., Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants. *Nature Protocols*, 2007, **2**(4), p867.

6. Warleta, F.; Quesada, C. S.; Campos, M.; Allouche, Y.; Beltrán, G.; Gaforio, J. J., Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients* 2011, **3** (10), pp839-857.
7. Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, G.; Rodríguez, R.; Heredia, A.; Guillén, R.; Jiménez, A., Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid– solid waste of two-phase olive oil processing or “Alperujo”. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2002, **50** (23), 6804-6811.
8. De Marco, E.; Savarese, M.; Paduano, A.; Sacchi, R., Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*, 2007, **104** (2), 858-867.