



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**METODOLOGÍAS MÁS
SOSTENIBLES PARA LA
DETERMINACIÓN DE LA
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
DE RESIDUOS
AGROALIMENTARIOS**

Alumno/a: Claudia Higuera Cabrera

Octubre, 2023



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Trabajo Fin de Grado

METODOLOGÍAS MÁS SOSTENIBLES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE RESIDUOS AGROALIMENTARIOS

Alumna: Claudia Higuera Cabrera

Jaén, octubre, 2023

Tabla de contenido

1. RESUMEN/ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Residuos agroalimentarios	2
2.2. Caracterización y clasificación de compuestos fenólicos	4
2.3. Extracción de compuestos fenólicos	7
2.3.1. <i>Pretratamiento de la muestra</i>	<i>7</i>
2.3.2. <i>Metodologías de extracción</i>	<i>8</i>
2.4. Solventes convencionales en extracción sólido-líquido	10
2.5. Solventes verdes como alternativa a solventes convencionales .	11
2.5.1. <i>Fluidos supercríticos</i>	<i>12</i>
2.5.2. <i>Agua subcrítica</i>	<i>13</i>
2.5.3. <i>Líquidos iónicos (Ils)</i>	<i>13</i>
2.5.4. <i>Disolventes eutécticos profundos (DES)</i>	<i>15</i>
2.5.5. <i>Disolventes eutécticos profundos naturales (NADES)</i>	<i>16</i>
2.6. Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante	17
2.6.1. <i>Método de Folin-Ciocalteu</i>	<i>17</i>
2.6.2. <i>Método ORAC</i>	<i>18</i>
2.6.3. <i>Método FRAP</i>	<i>19</i>
2.6.4. <i>Método ABTS</i>	<i>19</i>
2.6.5. <i>Método DPPH</i>	<i>19</i>
3. Residuos en los que se basa el estudio.....	20
4. OBJETIVOS.....	23
5. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE SUBPRODUCTOS AGROALIMENTARIOS	23
6. CONCLUSIONES	43
7. BIBLIOGRAFÍA	44

1. RESUMEN/ABSTRACT

La industria agroalimentaria genera diversos residuos, esto es inevitable debido a la cantidad de procesos por los que debe pasar una materia prima para llegar a producirse a partir de ella un producto apto para el consumo humano.

Las metodologías convencionales de extracción han sido ampliamente utilizadas en la caracterización de compuestos antioxidantes en muestras agroalimentarias, pero a menudo implican el uso de disolventes orgánicos tóxicos y procesos largos que pueden tener un impacto ambiental significativo. Sin embargo, los disolventes eutécticos profundos (DES) y los disolventes eutécticos profundos naturales (NADES) son alternativas verdes y sostenibles que se han propuesto recientemente como solventes más seguros y amigables con el medio ambiente.

En este Trabajo Fin de Grado se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica centrada en la evaluación de varios parámetros, como la eficiencia de extracción, la selectividad y la capacidad para preservar los compuestos antioxidantes presentes en los residuos agroalimentarios como el kiwi, naranja, arándano, cereza, uva y aceituna.

Palabras clave: Residuos agroalimentarios, compuestos fenólicos, DES, capacidad antioxidante, metodologías.

The agri-food industry generates various waste, this is inevitable due to the number of processes that a raw material must go through in order to produce a product suitable for human consumption from it.

Conventional extraction methodologies have been widely used in characterizing antioxidant compounds in agri-food samples but often involve the use of toxic organic solvents and lengthy processes that can have a significant environmental impact. In contrast, DES and NADES are green and sustainable alternatives that have recently been proposed as safer and more environmentally friendly solvents.

In this Final Degree Project, a literature review has been carried out focusing on the evaluation of several parameters, such as extraction efficiency, selectivity and the ability to preserve antioxidant compounds present in agri-food residues such as kiwi, orange, blueberry, cherry, grape and olive.

Key words: Agri-food wastes, phenolic compounds, DES, antioxidant capacity, methodologies.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Residuos agroalimentarios

La industria agroalimentaria genera cantidades importantes de subproductos durante la producción o procesamiento de los productos principales que se desechan suponiendo un grave problema medioambiental debido a su inadecuada gestión.

Los residuos agroalimentarios son aquellos que son generados por las industrias del sector agroalimentario, en cualquiera de las fases de sus procesos, es decir, desde la cosecha/crianza hasta el producto terminado. Pueden clasificarse en dos grupos, como se indica en la figura 2.1. (Castro-Muñoz et al., 2022).

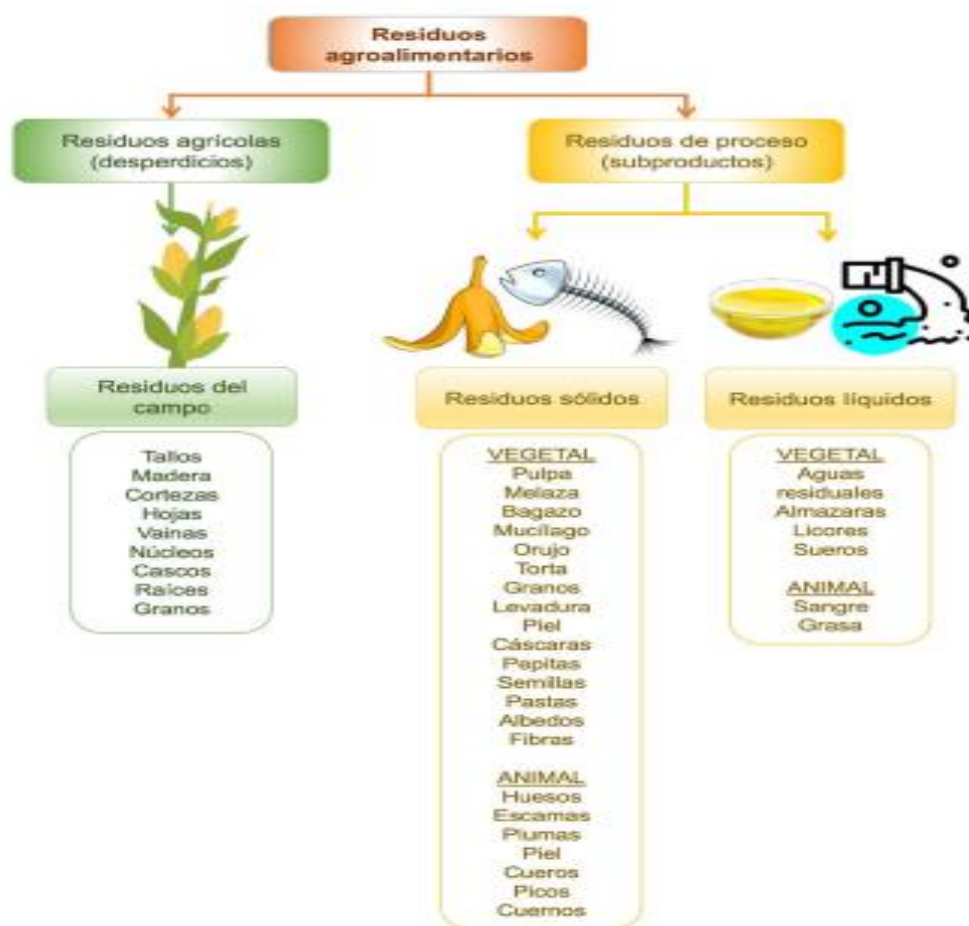


Fig 2.1: Clasificación de los residuos agroalimentarios de la industria agroalimentaria.

Fuente: (Castro-Muñoz et al., 2022)

Los residuos agroalimentarios, también conocidos como subproductos, aunque no son el objetivo principal de la producción, todavía pueden tener valor y utilidad en otras aplicaciones, ya sea que tienen un alto potencial para su aprovechamiento en la

producción de alimentos para animales, su uso en compost como fertilizante natural, energía renovable o biocombustibles, entre otros (*Saini et al., 2022*).

En la actualidad, la conciencia sobre la sostenibilidad y la reducción de desechos ha impulsado un mayor interés en los residuos agroalimentarios. Estos subproductos poseen un potencial económico significativo y pueden desempeñar un papel crucial en una economía circular. En esta economía, se minimiza el consumo de materiales y la generación de residuos, lo que a su vez reduce la contaminación ambiental y las emisiones de gases de efecto invernadero y fomenta el reciclaje (*Mir-Cerdà et al., 2023; Socas-Rodríguez et al., 2021*). Al dar valor a los subproductos, se fomenta la innovación y diversificación de productos, generando nuevas oportunidades de negocio y promoviendo una agricultura más sostenible y eficiente (*Berbel et al., 2018*). El manejo efectivo de los residuos agroalimentarios plantea un desafío significativo debido a la variabilidad inherente de estos productos y su propensión a deteriorarse con el tiempo. La clave para abordar este desafío reside en buscar un equilibrio entre las prácticas de gestión tradicionales, que incluyen métodos de eliminación como vertederos o compostaje convencional, y la adopción de tecnologías emergentes. Estas tecnologías permiten la recuperación de recursos valiosos, como biogás, fertilizantes orgánicos de alta calidad, productos químicos y bioplásticos, a partir de los residuos agroalimentarios. Además, la digitalización y la monitorización avanzada pueden ayudar a optimizar los procesos y reducir los desperdicios (*Blázquez Alonso, 2020*).

La valorización de los subproductos agroalimentarios implica la extracción de compuestos valiosos como antioxidantes, entre los que destacamos los compuestos fenólicos, fibras y aceites esenciales, que pueden aplicarse en la producción de suplementos nutricionales, productos cosméticos y farmacéuticos. (*Díaz-Montes, 2022*)

Los compuestos fenólicos son una clase de compuestos bioactivos que se encuentran en una variedad de alimentos de origen vegetal, como frutas, verduras, frutos secos, hierbas y especias siendo responsables de características como color, sabor y aroma. Estos compuestos han despertado gran interés en la comunidad científica y la industria de la alimentación debido a sus múltiples beneficios para la salud, en particular, su actividad antimicrobiana y antioxidante, que está relacionada con la prevención de diversas enfermedades, incluyendo el cáncer, los trastornos inflamatorios y las enfermedades cardiovasculares (*Espino et al., 2018*).

2.2. Caracterización y clasificación de compuestos fenólicos

En el caso de la actividad antioxidante, los compuestos fenólicos actúan como “cazadores” de radicales libres en el cuerpo, neutralizando así los efectos dañinos que estos producen al afectar a células y el ADN. La acumulación de daño oxidativo se ha relacionado con el envejecimiento y el desarrollo de enfermedades crónicas (*Durán & Borja, 1993*).

Los compuestos fenólicos se caracterizan por tener al menos un anillo aromático en su estructura química. Esta puede presentar diversas modificaciones y variaciones, lo que da lugar a una gran diversidad de compuestos en términos de estructuras y propiedades.

La clasificación de los compuestos fenólicos puede realizarse de varias maneras, y dependiendo de diversos criterios, como su estructura química y las propiedades biológicas. A continuación, se mencionan los distintos compuestos fenólicos clasificados en dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides. (*Albuquerque, et al, 2021*)

Los flavonoides son los principales compuestos fenólicos que se encuentran en los subproductos agroalimentarios. Su estructura consta de 15 carbonos. Dentro de este grupo de compuestos, podemos encontrar: (*Vuolo et al., 2019*).

- Flavonoles
- Flavonas
- Flavanonas
- Isoflavonas
- Flavanonoles
- Antocianinas

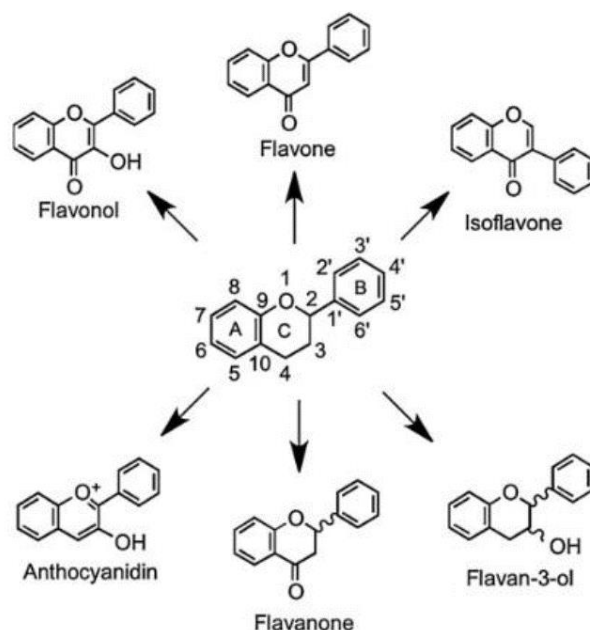


Figura 2.2: Estructura básica de los flavonoides. **Fuente:** (Nishiumi *et al.*, 2011).

Por otra parte, los **no flavonoides** tienen una diversidad estructural superior, a pesar de su menor complejidad en comparación con los flavonoides. Entre ellos podemos diferenciar:

Ácidos fenólicos: Este grupo representa la mayoría de los compuestos fenólicos y es el más abundante entre los no flavonoides. Estos compuestos se clasifican en ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, según el tipo de ácido del que se derivan (*de la Rosa et al.*, 2019).

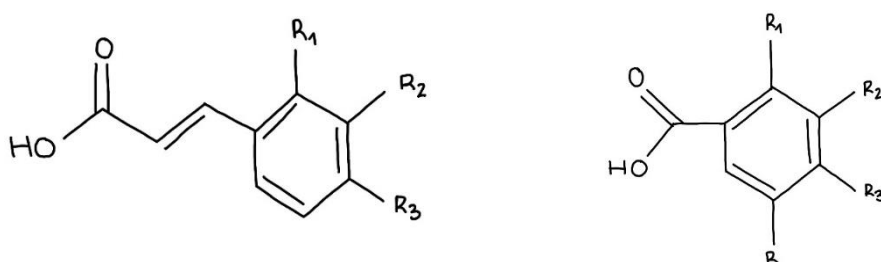


Fig 2.3.: Estructura de los ácidos fenólicos: izq- ácido hidroxicinámico y derecha- ácido hidroxibenzoico.

Cumarinas: son compuestos que se caracterizan por tener un anillo de benceno unido a un anillo de pirona. Estas sustancias poseen un alto potencial en el campo farmacéutico debido a sus múltiples propiedades antioxidantes y antibacterianas (*Camacho*, 2020).

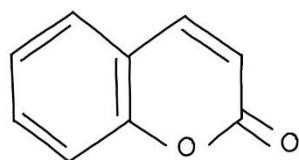


Fig 2.4.: Estructura de las cumarinas.

Fenoles simples: son compuestos fenólicos con dos o tres grupos hidroxilo en el anillo de benceno. (Gordo, 2018).

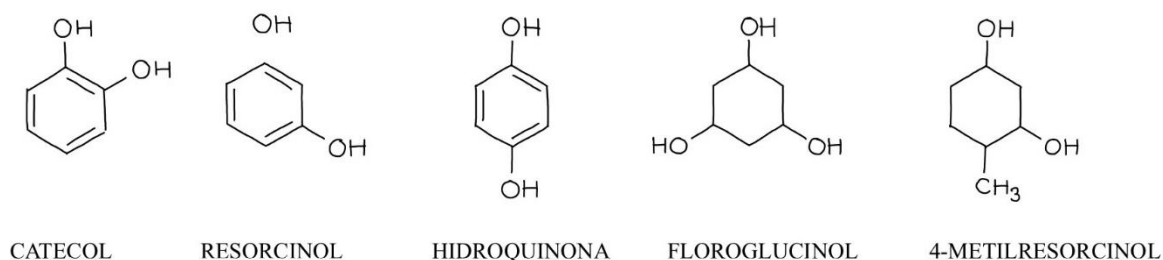


Fig 2.5.: Estructura de algunos fenoles simples.

Lignan: La estructura base es un dímero de fenilpropanoides (C6-C3).

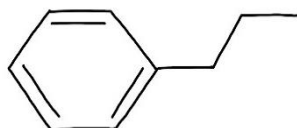


Fig 2.6.: Esqueleto de los lignanos.

Taninos: contienen anillos aromáticos con grupos hidroxilo, lo que les confiere una gran actividad química y les permite formar complejos con otras macromoléculas. Aunque este grupo abarca una amplia variedad de oligómeros y polímeros, se pueden distinguir dos categorías principales de taninos: los taninos hidrolizables y las proantocianidinas conocidas también como taninos flavonoides condensados, que son resistentes a la hidrólisis. Ambos exhiben propiedades antioxidantes elevadas aplicables a la industria alimentaria y médica (Eckardt et al., 2023; Szczurek, 2021).

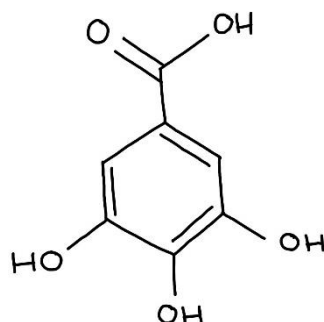


Fig 2.7.: Esqueleto de un tanino hidrolizable: ácido gálico.

2.3. Extracción de compuestos fenólicos

Para realizar el análisis de compuestos fenólicos existen dos etapas esenciales: el pretratamiento de la muestra y la extracción de los analitos.

2.3.1. Pretratamiento de la muestra

Se define como la etapa intermedia entre la toma y el tratamiento de la muestra.

La preparación previa de la muestra depende inevitablemente de las diversas características inherentes a cada muestra. Esto implica que cada muestra debe ser tratada de manera única para garantizar que el resultado final en la determinación de los analitos refleje de manera confiable su contenido en la muestra original (*Fructuoso, 2018*). Por lo general, se asume que los procedimientos de lavado son indispensables para eliminar la contaminación superficial de la muestra.

Esta etapa incluye el secado de la muestra y su posterior trituración y homogeneización.

- **Secado de la muestra:** la presencia de agua o humedad en las muestras sólidas suele dar lugar a alteraciones para el posterior análisis. Por ello, se recomienda que los resultados sean independientes de dichos efectos y que se tome la muestra seca. **En el caso de residuos agroalimentarios el secado de la muestra se realiza:**
 - a. *Secado en horno:* la muestra se somete a altas temperaturas durante el tiempo estimado para conseguir la eliminación completa del agua. Hay que tener en cuenta que el sometimiento de la muestra a temperaturas demasiado elevadas puede provocar su descomposición, por lo que es de

vital importancia controlar el rango de temperatura al que son sometidas las muestras.

b. *Secado al aire*: la muestra está en contacto con el aire durante un período largo de tiempo, y el riesgo a la contaminación es elevado.

c. *Liofilización*: es un proceso de secado en frío que consiste en la congelación de la muestra seguida de la sublimación del agua mediante una disminución de la presión.

- **Trituración y homogeneización de la muestra**: para garantizar la homogeneidad de la muestra, es recomendable la disminución del tamaño de partícula, ya que, los errores en el submuestreo son inversamente proporcionales al tamaño de partícula. Para su trituración, se puede utilizar molinillo (de mortero, de cuchillas, de martillo) o licuadora (de alta velocidad, de cuchilla).

2.3.2. Metodologías de extracción

Las técnicas de extracción juegan un papel fundamental en la obtención de compuestos y sustancias de interés en diversas industrias, como la farmacéutica, alimentaria y medioambiental.

Las técnicas de extracción más ampliamente utilizadas para la extracción de compuestos fenólicos se basan en una extracción sólido-líquido para extraer componentes solubles de una muestra sólida mediante el uso de un solvente líquido. A lo largo de los años, se han desarrollado una amplia gama de técnicas de extracción, desde las clásicas o convencionales hasta las más innovadoras, llamadas generalmente no convencionales. Estas técnicas clásicas son consideradas más perjudiciales para el medioambiente ya que utilizan una gran cantidad de disolventes orgánicos y un mayor gasto energético. En contraste, las técnicas de extracción más innovadoras y sostenibles, ofrecen ventajas significativas, como un menor consumo de disolventes, mayor selectividad en la extracción y una menor huella ambiental (Ebrahimi & Lante, 2022).

A continuación, se comentarán las técnicas de extracción más ampliamente utilizadas para la extracción de compuestos fenólicos en residuos agroalimentarios.

Metodologías clásicas/convencionales

Entre las técnicas convencionales para extracción de compuestos fenólicos en residuos agroalimentarios podemos destacar la maceración y la extracción Soxhlet.

- **Maceración:** Es la técnica más simple y común de extracción sólido-líquido. Consiste en sumergir la muestra sólida en el solvente líquido durante un tiempo determinado, permitiendo que los componentes solubles se disuelvan en el solvente. La extracción se lleva a cabo a temperatura ambiente o a temperaturas más altas según sea necesario.
- **Extracción Soxhlet:** Es una técnica de extracción utilizada para obtener compuestos de baja solubilidad o que requieren tiempos de extracción prolongados. La muestra sólida se coloca en un cartucho o celda de extracción y se somete a ciclos repetidos de extracción y destilación, utilizando un solvente que se calienta y condensa en un condensador antes de volver al cartucho (*Zainal-abidin, 2017*).

Metodologías no convencionales y respetuosas con el medioambiente

- **Extracción asistida por microondas (MAE):** En esta técnica, se utiliza radiación de microondas para calentar selectivamente la muestra sólida y el solvente líquido. La energía de microondas aumenta la temperatura de manera rápida y uniforme, facilitando la disolución de los componentes solubles en el solvente (*Lama-Muñoz & Contreras, 2022*). Esta técnica depende de la matriz y limita los disolventes que se pueden utilizar, ya que no deben ser transparentes a la radiación de microondas y deben tener un momento dipolar alto, sin olvidar la solubilidad de los compuestos fenólicos (*Lama-Muñoz & Contreras, 2022*).
- **Extracción con líquidos presurizados (PLE):** también conocida como extracción por solventes presurizados, es una técnica que se basa en el uso de solventes (hidro)orgánicos a altas temperaturas y presiones. Permite utilizar una cantidad reducida de solventes seguros y ofrece tiempos de extracción más cortos (*Mir-Cerdà et al., 2023*). Gracias a las altas presiones empleadas, la extracción puede llevarse a cabo a altas temperaturas sin que el solvente se evapore. Es fundamental seleccionar el solvente y la temperatura adecuados para obtener la polaridad correcta del solvente y extraer los metabolitos deseados (*Lianza et al., 2022*).

- **Extracción con fluidos supercríticos (SFE):** Esta técnica se fundamenta en el principio de que la capacidad de disolución de una sustancia depende en gran medida de la densidad del disolvente. Por tanto, una característica fundamental de un fluido supercrítico es su capacidad de modificar su densidad mediante el ajuste de la temperatura y/o la presión. Es una técnica adecuada para la recuperación de compuestos fenólicos no polares. Una de las ventajas principales de esta técnica es que los extractos resultantes están libres de residuos de solventes (*Lama-Muñoz & Contreras, 2022*).
- **Extracción asistida por ultrasonido (UAE):** En esta técnica, se aplica energía ultrasónica a la muestra sólida sumergida en el solvente líquido. Debido a la formación y desaparición rápida de burbujas en el solvente causadas por ondas de sonido de alta frecuencia, así como a la formación de micro cavidades en la superficie de la muestra vegetal debido a las fuerzas de cavitación generadas en el solvente circundante, los compuestos fenólicos se liberan rápidamente a través de las membranas celulares hacia el solvente. Esto resulta en una mayor eficiencia de extracción de los compuestos solubles en comparación con los métodos de extracción convencionales (*Chaves et al., 2020*).

La elección de la técnica adecuada depende de varios factores, como la naturaleza de la muestra, los componentes objetivo, la eficiencia de extracción requerida y las consideraciones de seguridad y medioambientales.

2.4. Solventes convencionales en extracción sólido-líquido

Los solventes convencionales han sido ampliamente usados tanto en procesos industriales y científicos ya que poseen una capacidad para disolver sustancias y facilitar reacciones químicas. Estos solventes orgánicos, como el hexano, tolueno, etanol, acetona, cloroformo, dimetilsulfóxido, metanol y las mezclas hidroalcohólicas provienen del petróleo y se caracterizan por su amplia disponibilidad, bajo costo y propiedades físicas favorables, siendo el metanol y mezclas hidroalcohólicas los solventes más utilizados para la extracción de compuestos fenólicos en residuos agroalimentarios.

Sin embargo, a pesar de sus ventajas, los solventes convencionales presentan varios inconvenientes y riesgos tanto para el medioambiente como para la salud humana.

Muchos de ellos son volátiles lo que contribuye a la contaminación atmosférica. Su uso también puede generar emisiones de compuestos orgánicos volátiles (COV), que son precursores de la formación de *smog* (niebla contaminante) y pueden causar problemas respiratorios y daños al sistema nervioso (Alonso et al., 2018).

Además, algunos solventes convencionales son altamente inflamables por lo que se deben tomar precauciones especiales durante su manipulación y almacenamiento. Su toxicidad también es un motivo preocupante, ya que la exposición prolongada puede causar daños en los órganos, irritación en la piel y ojos, e incluso efectos carcinogénicos.

En respuesta a estos problemas, ha surgido el desarrollo de nuevos solventes más sostenibles y respetuosos con el medio ambiente, denominados solventes verdes. Estos solventes, que poseen un menor impacto medioambiental y una menor toxicidad que los tradicionales cumplen con la mayoría los principios de la Química Verde (Espino et al., 2018).

2.5. Solventes verdes como alternativa a solventes convencionales

Para que un solvente sea considerado "verde", debe derivarse de materias primas renovables que no permanezcan en el medio ambiente por mucho tiempo y que no den lugar a la formación de productos peligrosos durante la preparación o el procesamiento (Anastas et al., 2002).

Estos solventes están hechos de materiales de base biológica, se degradan fácilmente en el medio ambiente y, por lo tanto, se consideran inocuos y no representan un riesgo para la salud humana, entre los que se incluyen bioetanol, fluidos supercríticos como CO₂, ciclopentil metil éter, agua subcrítica, acetato de etilo, 2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF) y similares (Prasad, 2022).

Siguiendo los doce principios de la Química Verde propuestos por Anastas y Warner (1998), y los principios de la Química Analítica Verde sugeridos por Galuzska et al. (2013), Gu y Jerome presentaron una lista de doce requisitos que un solvente verde debe cumplir (Gu & Jerome, 2013).

En la Figura 2.8. se pueden ver las características que debe tener un solvente para ser considerado como verde, entre los que encontramos: el precio, la reciclabilidad, que sean fácilmente sintetizables, no inflamables y que presenten una toxicidad mínima o nula, entre otros.



Figura 2.8.: Elementos que un solvente verde debe cumplir. Adaptado de: (Armenta, 2022)

Para la extracción de compuestos fenólicos de residuos agroalimentarios los disolventes verdes que actualmente se están utilizando son: el bioetanol, los fluidos supercríticos, el agua subcrítica, los líquidos iónicos (ILs), los disolventes eutécticos profundos, DES (Deep Eutectic Solvents) y los disolventes eutécticos profundos naturales, NADES (Natural Deep Eutectic Solvents) (Rodríguez *et al.*, 2021).

2.5.1. Fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico se define como un fluido que se encuentra por encima de su presión y temperaturas críticas. En estas condiciones, las fases líquida y gaseosa de un compuesto puro se vuelven indistinguibles (Lama-Muñoz & Contreras, 2022).

Las características principales de los fluidos supercríticos son su capacidad para modificar la densidad del fluido, la cual está directamente relacionada con su capacidad de solubilidad, mediante cambios en la presión y/o temperatura. Esto permite realizar extracciones selectivas (Vian, 2017).

Si bien es cierto que la extracción con este tipo de disolvente es eficiente y respetuosa con el medioambiente, también presenta una serie de inconvenientes y consideraciones que deben ser tomadas en cuenta. En primer lugar, requiere de equipos costosos y especializados, como extractores supercríticos y bombas de alta presión. Además, la extracción se realiza a altas presiones y temperaturas, lo que implica un mayor riesgo operativo y la necesidad de mantener un control estricto de

las condiciones. (Velasco *et al.*, 2007). También se debe añadir que es fundamental la elección correcta del fluido supercrítico, este dependerá de la naturaleza de los compuestos fenólicos a extraer y sus propiedades, como su polaridad y solubilidad en diferentes fluidos. El más ampliamente utilizado y eficaz es el dióxido de carbono (CO₂).

2.5.2. Agua subcrítica

El agua subcrítica se define como agua líquida a una temperatura y presión por debajo de su punto crítico (T_c = 374.15 °C, P_c = 217.75 atm) (Armenta, 2022). También se conoce como extracción con agua caliente a presión, extracción con agua sobrecalentada, extracción líquida a presión o extracción acelerada con solvente utilizando agua como disolvente. Las propiedades fisicoquímicas del agua subcrítica cambian drásticamente con el aumento de la temperatura. En este sentido, su constante dieléctrica, viscosidad y tensión superficial disminuyen de manera constante, y su coeficiente de difusión aumenta con la temperatura (Cheng *et al.*, 2021). Por lo tanto, incluso los compuestos menos polares pueden ser extraídos por agua subcrítica a altas temperaturas ajustando las condiciones de temperatura y presión de la extracción (Armenta, 2022).

Uno de los inconvenientes de usar agua subcrítica es que implica la necesidad de equipos y reactores sofisticados, así como su alta demanda energética para manejar las altas temperaturas y presiones necesarias.

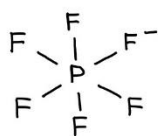
2.5.3. Líquidos iónicos (ILs)

Los líquidos iónicos (IL) son sales orgánicas, líquidas en condiciones ambientales y de carácter iónico. Están constituidos exclusivamente por iones unidos entre sí por fuerzas fundamentalmente electrostáticas. El catión orgánico, que contiene nitrógeno o fósforo, es el responsable de las propiedades físicas y el anión orgánico o inorgánico, responsable del comportamiento químico y de la estabilidad. Ambos tienen puntos de fusión bajos, generalmente por debajo de 100°C (Vian, 2017).

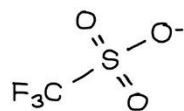
Los IL pueden disolver una amplia gama de compuestos polares a no polares, presentar baja presión de vapor, exhibir alta estabilidad térmica y baja inflamabilidad. Muchos IL son estables en un amplio rango de temperatura y tienen un número casi ilimitado de combinaciones de aniones y cationes (Vian, 2017).

Algunos ejemplos de cationes y aniones más utilizados en proporción 1:1, se indican en las siguientes figuras:

ANIONES



HEXAFLUOROFOSFATO



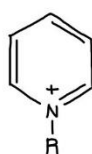
TRIFLUOROMETANOSULFONATO



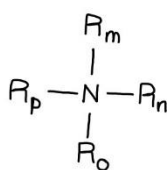
HALUROS

Figura 2.9.: Ejemplos de IL aniónicos

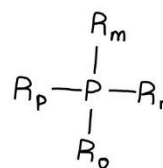
CATIONES



R-ALQUILPIRIDONIO



TETRAALQUILAMONIO



TETRAALQUIFOSFONIO

Figura 2.10. : Ejemplos de IL catiónicos

Los IL presentan una serie de inconvenientes, entre los que podemos destacar:

- Son más costosos que los solventes orgánicos convencionales.
- Su disponibilidad puede ser limitada, lo que aumenta los costos operativos y puede hacer que sea menos accesible para ciertos laboratorios o industrias (*Casquete et al, 2015*).
- La selección de un IL adecuado y la optimización de las condiciones de extracción pueden ser complicadas ya que, además de elegir el IL, hay que seleccionar la temperatura, la relación líquido/sólido y el tiempo de extracción.

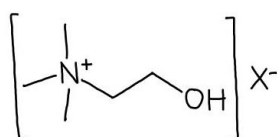
Aunque los IL se consideran en general como más seguros y menos tóxicos que algunos solventes orgánicos convencionales, pueden resultar inapropiados si su manejo no es el adecuado. La evaluación de la toxicidad de los IL utilizados en la

extracción es esencial para garantizar la protección de los trabajadores y el cumplimiento de las regulaciones ambientales.

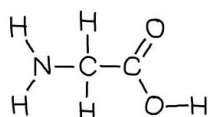
2.5.4. *Disolventes eutécticos profundos (DES)*

Los DES son mezclas de sólidos que tienen puntos de fusión muy por debajo de los puntos de fusión de cada compuesto, por lo general también por debajo de los 100°C (Vian, 2017). Las interacciones intermoleculares que poseen son por puentes de hidrógeno por lo que se consideran que están formados por un aceptor de hidrógeno como las sales de amonio cuaternaria, glicina y dadores de hidrógeno como por ejemplo el etilenglicol, el glicerol y el *p*-fenol. En las figuras 2.11. y 2.12. se muestran algunos de los dadores y aceptores de hidrógeno más comunes.

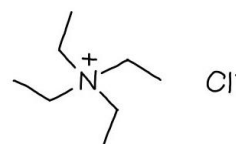
Aceptores de hidrógeno (HBA)



CLORURO DE COLINA



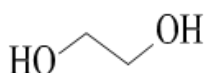
GLICINA



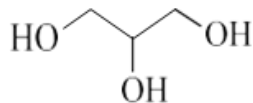
CLORURO DE TETRAETILAMONIO

Figura 2.11.: Ejemplos de aceptores de hidrógeno más comunes.

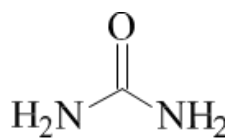
Donadores de hidrógeno (HBD)



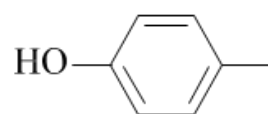
Etilenglicol



Glicerol



Urea



p-fenol

Figura 2.12.: Ejemplos de donadores de hidrógeno más comunes.

La síntesis de los distintos DES se realizará mezclando directamente en un matraz los componentes puros sólidos con agitación y calentamiento hasta la obtención de un líquido homogéneo a una temperatura alrededor de 80°C para las mezclas binarias (Figura 2.13.). En el caso de mezclas ternarias en las que interviene el agua, las condiciones de síntesis son más suaves, realizándose en un menor tiempo y

temperatura (50°C) (Socas-Rodríguez *et al.*, 2021). Se seleccionarán aquellos DES que, una vez realizado la síntesis a partir de los componentes en estado sólido, estén en fase líquida y cuyo estado no cambie al cabo de varios días.



Figura 2.13.: Síntesis de DES.

Fuente: (Socas-Rodríguez *et al.*, 2021).

Los DES también destacan por ser fácilmente biodegradables y sostenibles. Además, poseen una baja o nula toxicidad y tienen una gran facilidad de preparación (Espino *et al.*, 2018). Esto se debe a que suelen ser sintetizados a partir de compuestos naturales, lo que facilita el proceso y evita la necesidad de una purificación posterior. Tanto en los líquidos iónicos como en los DES es posible obtener una amplia gama de solventes con diversas propiedades químicas y físicas, simplemente modificando uno o ambos componentes. En el caso de los DES, también se pueden combinar en diferentes razones molares, lo que permite diseñar extractantes específicos según el analito y la matriz de la muestra.

La viscosidad de los DES es su principal limitante, ya que dificulta su manejo y eficiencia como solventes de extracción en comparación con los convencionales. Por lo tanto, la adición de agua para la formación de mezclas ternarias se realiza a menudo para ajustar las propiedades del DES y disminuir la viscosidad y la tensión superficial (Bonacci *et al.*, 2020). Los DES tienen una alta solubilidad en agua, por tanto, su adición promueve cambios a nivel de su estructura. En cuanto a su hidrofobicidad tienden a ser iónicos, pero suelen obtenerse DES hidrofóbicos cuando se mezclan con algunas sales de amonio cuaternario.

2.5.5. Disolventes eutécticos profundos naturales (NADES)

Cuando los componentes de los DES son compuestos naturales derivados del metabolismo celular, como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, urea y derivados de la colina, son denominados solventes eutécticos naturales (NADES). Por tanto, muchos de los que forman parte de los DES se incluyen en el grupo de NADES.

Los NADES suelen estar formados por cloruro de colina o aminoácidos como alanina, prolina y glicina como principales aceptores de hidrógeno y ácidos orgánicos (oxálico, láctico, málico) y azúcares (glucosa, maltosa, fructosa) como donadores de hidrógeno (Vian, 2017). Poseen mejores propiedades para la extracción que los DES: estado líquido por debajo de 0°C, viscosidad ajustable, sostenibilidad y muestran una capacidad de solubilización muy alta de compuestos polares y no polares. Los NADES se han vuelto cada vez más populares para la extracción de compuestos bioactivos en alimentos y otras matrices naturales (Benvenuti et al., 2019).

2.6. Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante

La evaluación de la capacidad antioxidante de subproductos alimenticios se presenta como un desafío complejo debido a la diversidad de antioxidantes y enfoques disponibles para su medición. En este contexto, no existe un método estándar que refleje de forma completa el perfil del antioxidante, por lo que, se recomienda la aplicación de diversos métodos para llevar a cabo la medición, teniendo en consideración sus ventajas y desventajas primordiales. Por lo tanto, la elección y la interpretación de los métodos de medición deben llevarse a cabo con precaución para obtener una comprensión precisa de la capacidad antioxidante de estos subproductos. Los métodos para la determinación de los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante se basan en la espectrofotometría ultravioleta visible, técnica no costosa y fácil de utilizar.

Para la medida del contenido total de compuestos fenólicos, el método más común es el de Folin-Ciocalteu. Para la determinación de la capacidad antioxidante los más utilizados son: (1) el método ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno), basado en la transferencia de átomos de hidrógeno; (2) el método FRAP (Poder de Reducción Antioxidante del Ión Férrico), basado en la transferencia de electrones; (3) el ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico); y (4) el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

2.6.1. Método de Folin-Ciocalteu

El método, propuesto por Folin, se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en la muestra mediante la adición de una solución básica del anión molibdotungstosfórico. En la evaluación de la actividad antioxidante, el molibdeno del complejo se reduce de Mo (VI) a Mo(V) mediante la donación de un electrón por

parte del antioxidante, lo que da lugar a una coloración azul. Este producto muestra una absorbancia máxima en el rango de 750 a 765 nm, que se puede medir utilizando un espectrofotómetro (Figura 2.14.).

Este método sirve para determinar el contenido fenólico total de una muestra. Los resultados se suelen expresar en mg de ácido gálico/100 g de muestra. Presenta diversas ventajas, como su rapidez y facilidad de uso, su robustez y la capacidad de minimizar los efectos de la matriz al tener un pico de absorción bien definido. Sin embargo, también tiene algunos inconvenientes significativos. Por un lado, requiere la aplicación de un pH muy básico, lo que puede resultar en una oxidación más fácil de los compuestos fenólicos.

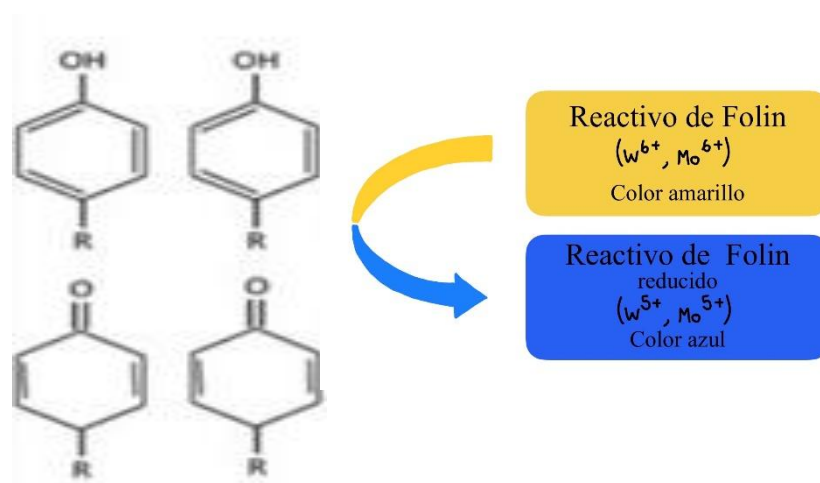


Figura 2.14.: Mecanismo de acción del reactivo de Folin. **Fuente:** (Apak et al ,2016)

2.6.2. Método ORAC

En este método, se utiliza una sonda fluorescente, generalmente la fluoresceína, que se somete a la degradación mediante la acción de iniciadores azo que generan el radical peroxilo. Al agregar el antioxidante, se puede comprobar la protección que proporciona contra los radicales libres generados mediante la medida de la disminución de la fluorescencia (*Benitez-Estrada et al., 2020*). A menudo, los resultados se expresan en micromoles de equivalentes de Trolox por gramo ($\mu\text{mol TE/g}$) o por mililitro ($\mu\text{mol TE/mL}$).

Lo que distingue a este método de los demás es su capacidad para observar la acción del antioxidante a lo largo del tiempo, en lugar de medir la actividad en un momento específico. Sin embargo, este método también presenta algunas limitaciones. Solo puede detectar la actividad antioxidante contra radicales específicos y no existe una

garantía de que solo los radicales libres estén involucrados en la reacción (Rojano et al., 2012).

2.6.3. Método FRAP

Este método se basa en la medida de la reducción del hierro del complejo 2,4,6-Tripiridiltriazina Férrica (TPTZ) de Fe (III) a Fe (II) en un medio ácido. El complejo resultante de Fe (II) tiene un color azul intenso. Se expresa generalmente como micromoles de equivalentes de hierro por gramo ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) o por mililitro ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mL}$). Una desventaja de este método es que no reaccionan los antioxidantes que actúan mediante la transferencia de átomos de hidrógeno, ya que se trata de un proceso puramente redox.

2.6.4. Método ABTS

Este método se fundamenta en la neutralización del radical catiónico ABTS^{•+}. El radical es de color azul-verde y tiene su absorción máxima a 734 nm. Al agregar un antioxidante capaz de donar un electrón o átomo de hidrógeno, el radical se estabiliza y la absorbancia en los picos disminuye, permitiendo controlar la reacción mediante espectrofotometría. Este método a menudo se conoce como el ensayo de la Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC), en el que el resultado se expresa en micromoles de equivalentes de Trolox por gramo ($\mu\text{mol TE/g}$) o por mililitro ($\mu\text{mol TE/mL}$). Además, se compara la capacidad antioxidante de la muestra con la del Trolox, un compuesto con propiedades antioxidantes similar a la vitamina E.

Una de las grandes ventajas que presenta dicho ensayo es que el ABTS^{•+} es soluble tanto en medio acuoso como orgánico, lo que permite la evaluación de antioxidantes tanto hidrofílicos como lipofílicos (Ingaroca et al., 2019).

2.6.5. Método DPPH

Cuando se combina una solución del radical DPPH con una sustancia capaz de ceder un átomo de hidrógeno (como el caso de los antioxidantes) se observa una disminución en la absorción que resulta en una pérdida de color en la solución. El radical DPPH inicialmente presenta un color violeta intenso con una absorción a 517nm, pero al capturar un protón, cambia a un tono amarillento, pudiéndose medir en un espectrofotómetro (Oliveira et al., 2019). Los resultados de este método se suelen expresar como IC₅₀, que representa la concentración de antioxidante necesaria para lograr una decoloración del 50% de la solución inicial. En términos generales, un valor de IC₅₀ más bajo indica una mayor actividad antioxidante.

Es importante señalar que este método tiene una limitación importante, y es que los resultados dependen del tiempo de reacción, lo que no proporciona información sobre la reactividad específica del antioxidante en cuestión (*Oliveira et al., 2019*).

3. Residuos en los que se basa el estudio

El mundo de los residuos de la industria agroalimentaria es demasiado amplio, por tanto, este estudio se centra en algunas frutas, subproductos de la aceituna y residuos del sector vitivinícola que se presentan a continuación.

Cabe destacar que la mayoría de ellos poseen un mayor contenido de compuestos fenólicos que el propio producto. (*Chagnoleau et al, 2023; Alarcón et al, 2021*)

Residuos de fruta (kiwi, naranja, arándanos y cereza).

En el caso del **kiwi**, en los estudios que se desarrollan a continuación se realizan extracciones de compuestos fenólicos de los siguientes subproductos: piel, gabazo y hojas.

Las hojas de la planta de kiwi se obtienen durante la fase de cultivo y cosecha de la fruta. Durante la temporada de crecimiento de los kiwis, las plantas producen hojas que se recortan durante la poda y el aclareo para permitir una mejor circulación de aire y la exposición al sol de los frutos. Estas hojas suelen ser recolectadas y utilizadas para fines secundarios, como la elaboración de infusiones o extractos de hojas con potenciales beneficios para la salud debido a su contenido en compuestos fenólicos (*Matute y Noblecilla, 2019*).

El gabazo de kiwi por lo general se genera durante la producción de jugo de kiwi o pulpa de kiwi. La parte fibrosa y sólida que queda después de la extracción del jugo se conoce como gabazo. Este subproducto puede tener valor en la alimentación animal, como forraje o en la producción de compost debido a su contenido en nutrientes (*Matute y Noblecilla, 2019*).

Las pieles de kiwi se generan principalmente en la etapa de pelada de la fruta para su procesamiento o consumo fresco. En muchas aplicaciones industriales, como mermeladas, conservas o productos de repostería, se elimina la piel de kiwi debido a su sabor y textura. Estas pieles son utilizadas en la elaboración de productos secundarios como polvo de kiwi deshidratado o en la industria cosmética, ya que contienen compuestos fenólicos y vitamina, que generan beneficios para el cuidado de la piel.

En cuanto a los residuos de la **naranja**, la piel es el principal subproducto que se obtiene en el proceso de extracción del jugo de la naranja. Durante este proceso, las naranjas se pelan y se exprimen para obtener su jugo. La piel de naranja que queda como residuo se utiliza para producir aceites esenciales y aceites esenciales cítricos. También se utiliza en la elaboración de suplementos nutricionales ya que es una fuente rica en compuestos fenólicos y antioxidantes (*Triana et al., 2014*).

Entre los residuos del **arándano**, encontramos como subproductos principales la pulpa y las hojas.

La pulpa se obtiene principalmente del descarte de la producción del jugo de arándano. Durante este proceso, los arándanos son sometidos a un proceso de extracción mediante prensas o equipos de extracción que separan el jugo de la pulpa y las semillas, por lo general, la pulpa se separa del jugo mediante procesos de filtración y tamización. El principal uso que se le da a este subproducto es en la industria alimentaria, donde en base al mismo se producen mermeladas, yogures, entre otros. Desde hace unos años, la pulpa también ha empezado a utilizarse en productos cosméticos debido a la concentración de compuestos fenólicos que ayudan a la salud debido a su capacidad antioxidante (*Cruz, 2018*).

Las hojas son otro subproducto valioso que se obtiene durante el proceso de cosecha y posterior procesamiento de los arándanos. Las hojas que se recogen en la cosecha y poda se someten a un proceso de secado (al aire libre o en máquinas de secado), permitiendo así su conservación para su posterior uso. Las hojas de arándano secas se utilizan en la industria alimentaria y en la fabricación de infusiones y téis debido a sus posibles beneficios para la salud (*Cruz, 2018*).

Según Alarcón (2021) los arándanos contienen polifenoles, siendo los azules los que presentan mayor cantidad y por lo tanto mayor actividad antioxidante.

En el caso de la **cereza**, el orujo es el es un subproducto que consiste en piel y pulpa obtenidas después del prensado del jugo. Se utiliza para mermeladas y zumos, y destaca por su intenso sabor, aroma y contenido nutricional. Además de su uso en alimentos, a veces se emplea como aditivo y se ha explorado su aplicación en la cosmética debido a sus propiedades antioxidantes y beneficios para la salud. También se utiliza en la producción de bebidas alcohólicas como el aguardiente de cereza.

Residuos del sector vitivinícola

Durante la vinificación, las uvas son prensadas para extraer su jugo. La piel de uva, la pulpa y las semillas son los subproductos obtenidos de este proceso.

La piel de uva se separa del jugo durante la prensa. En el proceso de fermentación, las pieles de uva se mantienen en contacto con el mosto durante un período específico para aportar sabor, color y compuestos fenólicos al vino. Después de la fermentación, las pieles se descartan como residuos sólidos.

La pulpa de uva se obtiene también durante el proceso de extracción del jugo del fruto para la vinificación. Esta pulpa se puede utilizar para la elaboración de mosto o se puede convertir en subproductos como el gabazo (*Taladrid et al., 2019*).

Las semillas de uva son separadas de la pulpa y la piel durante el proceso de prensado. Son ricas en aceite que se extrae mediante prensado en frío. Este aceite resulta valioso en la industria cosmética y de cuidado personal, debido a su capacidad antioxidante. También, se utilizan en la producción de suplementos alimenticios y productos nutracéuticos debido a su contenido en compuestos fenólicos (*Surco Laos et al., 2020*).

El **orujo de uva** es un elemento sin valor comercial, pero está cargado de compuestos fenólicos importantes para la industria farmacéutica, como el ácido cafeico, epicatequina, quercetina y resveratrol (*Mouratoglou et al, 2016*).

Residuos de la aceituna

En el caso de los subproductos de la aceituna, los estudios consultados abarcan los siguientes: hojas y orujo.

Las hojas del olivo son un subproducto que se obtiene principalmente durante la poda de los árboles. Esta se realiza regularmente para mantener la salud de los árboles y mejorar la calidad y cantidad de la cosecha de aceitunas. Durante este proceso, las hojas se retiran de los árboles y a menudo se descartan. (*Castro-Muñoz et al., 2022*).

El orujo incluye la pulpa y la piel de las aceitunas. Se obtiene principalmente de la extracción de aceite de oliva. A menudo, se utiliza como alimento para ganado o para compost. Los principales componentes del orujo son polisacáridos, ácidos grasos, pigmentos y polifenoles, esto hace que tengan una gran actividad antioxidante.

4. OBJETIVOS

A la luz de la creciente conciencia ambiental y la búsqueda de prácticas más sostenibles en la industria alimentaria, la determinación de la capacidad antioxidante en los residuos agroalimentarios es un objeto de estudio que cada vez cobra más interés en la comunidad científica, porque los antioxidantes traen muchos beneficios para la salud. Este Trabajo de Fin de Grado se centra en investigar y analizar metodologías respetuosas con el medioambiente y eficaces para evaluar la capacidad antioxidante de estos residuos, por ello se enfoca principalmente en la utilización de los DES.

General

- Realizar una revisión bibliográfica de metodologías sostenibles para la determinación de la capacidad antioxidante de diferentes subproductos agroalimentarios.

Específicos

- Revisar las técnicas de extracción de compuestos fenólicos en subproductos del sector agroalimentario.
- Revisar los métodos para evaluar el contenido total de fenoles y la actividad antioxidante.
- Revisar la utilidad de los nuevos solventes más novedosos y respetuosos con el medioambiente.
- Estudiar la diferencia que existe entre solventes convencionales y DES/NADES para la determinación de la actividad antioxidante.
- Examinar cómo la elección de la técnica de extracción y la selección del solvente afectan a la capacidad antioxidante.

5. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE SUBPRODUCTOS AGROALIMENTARIOS

Para el presente Trabajo de Fin de Grado se ha realizado una revisión bibliográfica para evaluar la actividad antioxidante de diversos subproductos de frutas (kiwi, naranja arándano, cereza), de aceituna y de frutos que se utilizan en la actividad vitivinícola.

Se ha recopilado información bibliográfica que abarca los años 2015 a 2023 y que se muestra reflejada en las Tablas 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5 y 5.6. La información recogida no ha sido completamente unificada, ya que existen diferentes estándares de referencia en los resultados obtenidos de la bibliografía. Sin embargo, los resultados se han agrupado para que se facilite la comprensión de las comparaciones realizadas. Una vez realizada la revisión bibliográfica, el estudio se centrará en aquellas técnicas que utilizan DES y NADES como disolventes extractantes.

Estudios de extracción a través de DES/NADES

Residuos de fruta: kiwi, naranja, arándanos y cereza.

Se puede observar en la bibliografía consultada sobre el kiwi que posee una gran cantidad de compuestos fenólicos, y, por tanto, una gran capacidad antioxidante. Silva et al. (2023) realizaron un estudio sobre la cáscara del kiwi con el objetivo de desarrollar un enfoque verde para la valorización de estos residuos en el que se combinan un disolvente de base biológica DES (GVL: etanol en proporción 7:3) y técnicas de extracción asistidas por ultrasonidos y microondas para la recuperación de compuestos fenólicos. Se evaluó la eficiencia de estas técnicas y se compararon los extractos obtenidos mediante la determinación del contenido fenólico total y las pruebas ABTS y FRAP en las condiciones óptimas. La novedad de este estudio es la utilización de disolventes de base biológica (disolventes sostenibles derivados de fuentes renovables) como la gamma-valerolactona (GVL) y sus mezclas ya que, a pesar de su potencial, apenas se han investigado. Antes de la extracción, la muestra se sumergió en nitrógeno líquido y se molió utilizando un molinillo de café para obtener un polvo. Posteriormente, se observa que es de vital importancia el almacenaje a -80 °C ya que es la forma más eficiente de proteger el contenido de fenoles y la actividad antioxidante porque altas temperaturas se puede causar la degradación de los compuestos fenólicos o a bajas temperaturas la no inactivación de las enzimas oxidativas. Se concluye que, dado que nuestro extracto es rico en epicatequina y sus derivados, el MAE es la técnica de extracción preferible ya que observamos que se obtienen valores más altos tanto en la prueba FRAP (87 ± 4 mg TE/g DW por microondas y 81 ± 4 mg TE/g DW por ultrasonidos) y ABTS (131 ± 1 mg TE/g DW por microondas y 104 ± 2 mg TE/g DW por ultrasonidos) como en el contenido fenólico

total (29.7 ± 0.6 mg GAE/g DW por microondas y 24 ± 1 mg GAE/g DW por ultrasonidos).

Siguiendo la línea de estudio de la capacidad antioxidante de las cáscaras, Chagnoleau y colaboradores (2023) realizaron un estudio en el que se utilizaron 22 disolventes diferentes (15 de los cuales son disolventes eutécticos) que se presentan en la figura 5.1. Se compararon con disolventes convencionales como metanol, etanol: agua (8:2), glicerol y agua, entre otros. Antes de la realización de la extracción, se separó la cáscara de la pulpa, se realizó el secado de la muestra a temperatura ambiente para su posterior molienda. De acuerdo con la literatura, todos los experimentos de extracción con cada DES se llevaron a cabo utilizando la mezcla correspondiente y 20% en peso de agua. Todos los extractos obtenidos con DES exhiben actividades mucho más altas que las obtenidas usando solventes orgánicos convencionales como se observa en la figura 5.1. En este estudio, no se especifica la técnica de extracción utilizada.

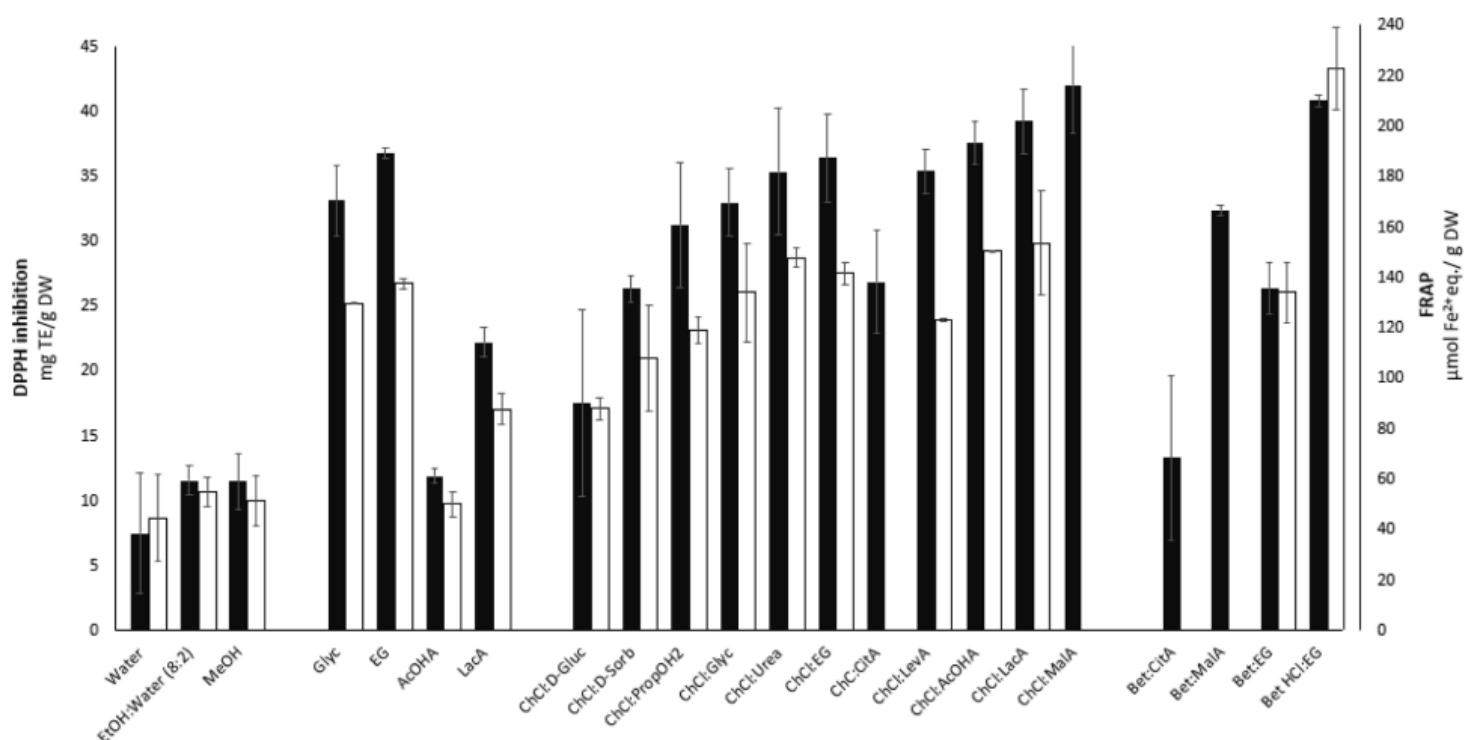


Figura 5.1: Actividades antioxidantes mediante la prueba DPPH (negro) y la prueba FRAP (blanco) del extracto de cáscaras de kiwi según el disolvente utilizado.

Los valores de las actividades de todos los extractos de DES medidos utilizando DPPH y FRAP oscilaron entre 17-42 mg TE/g de muestra seca y $87-220 \times 10^{-6}$ mol eq. Fe²⁺/g

de muestra seca, respectivamente. Las actividades antioxidantes más altas se obtuvieron para extractos basados en DES que contenían ácido carboxílico o clorhidrato de betaína. Los extractos obtenidos con glicerol o etilenglicol exhibieron actividades antioxidantes similares a las de sus homólogos a base de cloruro de colina.

Otro estudio basado en la capacidad antioxidante del gabazo de kiwi llevado a cabo por Wu et al. (2023) comparó los resultados de la inhibición de los radicales DPPH, FRAP y ABTS realizando la extracción de estos mediante la técnica de ultrasonidos asistida con disolventes eutécticos (UADE), mediante ultrasonidos asistida con etanol (UAEE) y con la extracción convencional con etanol (CSE). El disolvente eutéctico utilizado fue cloruro de colina: glicerol en una proporción 2:1.

Previamente a la extracción, se realizó el lavado con agua de la muestra, la liofilización hasta la obtención de un polvo fino y su almacenaje a -20°C. Las condiciones óptimas en las que se basa este experimento son parámetros importantes ya que afectan a la eficiencia de extracción. Entre ellos, encontramos la relación sólido/líquido del extractante, la potencia ultrasónica, el tiempo ultrasónico y el contenido de agua en las soluciones. Se determinaron en 50ml/g, 450W, 25minutos y 30% de agua. Según los resultados, se puede observar en la tabla 5.1. como la extracción asistida por ultrasonido mediante la utilización de DES comparada con la extracción convencional y la extracción asistida por ultrasonidos con etanol permite una mayor capacidad de extracción de compuestos fenólicos.

Centrándose en el estudio de los compuestos fenólicos presentes en piel de naranja, Viñas-Ospino et al. (2023) realizaron un estudio en el que usaron nuevos disolventes eutécticos hidrófilos e hidrófobos. La muestra fue lavada, secada y almacenada a -20°C. Para su preparación, a los disolventes hidrófilos era necesario añadir un 30% de agua mientras que a los hidrófobos no. La diferencia de polaridades mediante la prueba del Rojo Nilo en este estudio tiene un impacto significativo como se muestra en la figura 5.2. Los DES hidrófobos que son menos polares tienen un color similar al hexano (control) mientras que los hidrófilos tienen polaridad más alta.

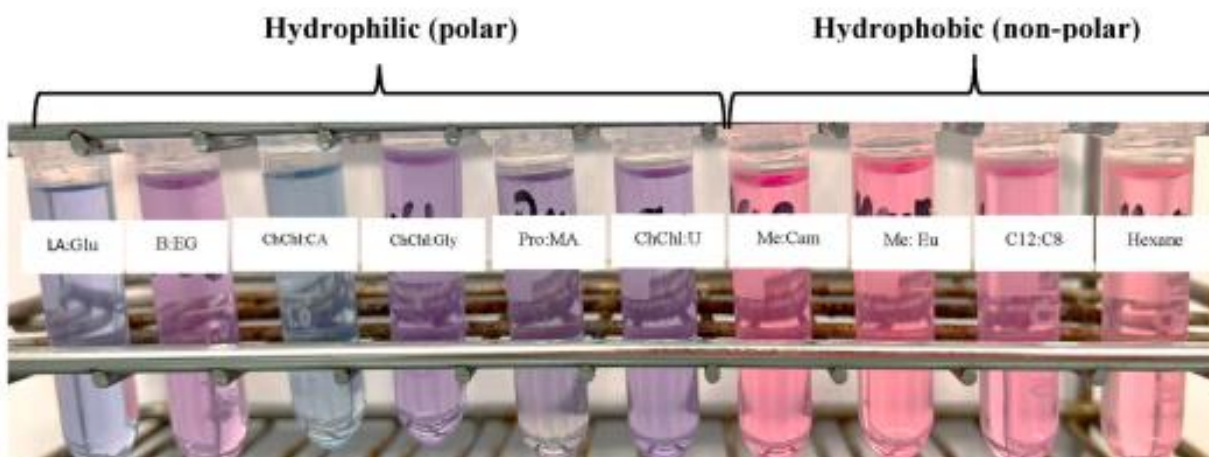


Figura 5.2.: Polaridad de los DES utilizados mediante la prueba Rojo Nilo. **Fuente:** (Viñas-Ospino et al, 2023)

Según los resultados obtenidos, se demostró que los DES hidrófobos como DL-Mentol: alcanfor (1:1) y DL-Mentol: eucaliptol (1:1) poseen mayor capacidad antioxidante que los DES hidrófilos mientras que éstos últimos como la prolina: ácido málico (1:1) extraen mayor contenido fenólico.

Siguiendo con la línea de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en las pieles de naranja, Ozturk et al. (2018) realizaron el estudio mediante extracción sólido-líquido en las que los factores a tener en cuenta más relevantes son la temperatura (333.15K) la relación sólido/líquido (1:10), la viscosidad (se añadió 10% de agua en cada DES) y el tiempo de extracción (100min). Antes de la extracción, se procedió al secado al vacío de la muestra durante 24 h para eliminar la humedad y se aplicó nitrógeno líquido para su conservación. El residuo seco se trituró para obtener un tamaño de partícula menor.

Se utilizaron diferentes extractantes, entre los que destacan cloruro de glicina: glicerol en proporción 1:2 y cloruro de colina y etilenglicol en proporción 1:4. Los resultados obtenidos para el radical DPPH fueron: $44.8 \pm 1.9 \mu\text{g/ml}$ y $30.6 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$ respectivamente y en el caso de la cantidad de fenoles totales fueron: 2.90 mg GAE/g y 3.61 mg GAE/g. Cuanto menor sea el valor de IC_{50} , mayor es la capacidad antioxidante por lo que se concluye que cloruro de colina y etilenglicol en proporción 1:4 es el mejor extractante.

Fu y colaboradores (2021) llevaron a cabo una investigación sobre la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en la pulpa de arándano. La

muestra fue sometida a un proceso de liofilización durante 48 horas para quitarle la humedad interna.

Para la extracción de antocianinas, se utilizó un solvente compuesto por cloruro de colina y ácido oxálico combinado con la técnica ultrasonidos. Aunque el costo del solvente sea mayor que el de etanol acidificado, su mayor eficiencia y menor consumo de energía lo hacen más prometedor. Los resultados muestran 361.93 ± 6.39 mg AAE/g DW y 734.73 ± 10.33 mg AAE/g DW en las pruebas DPPH y ABTS, respectivamente.

Por otro lado, Santos-Martin y colaboradores (2023) basaron su estudio en una muestra de hojas de arándanos, la cual fue sometida a un lavado con agua desionizada y posterior secado a temperatura ambiente para la molienda.

La extracción de compuestos fenólicos se llevó a cabo utilizando dos solventes NADES, el primero de ellos fue una solución compuesta por lactato, acetato de sodio y agua (3:1:2) y el otro, al igual que en el estudio anterior estuvo compuesto por cloruro de colina y ácido oxálico (1:1). Curiosamente, éstos últimos presentan un color rojizo distintivo que podría deberse a los compuestos de antocianina presentes.

En cuanto a la técnica seleccionada, en ambos casos la extracción se llevó a cabo mediante UAE, aunque al observar los resultados de la tabla 5.3, se concluye que el primer solvente es el más prometedor tras tener una mayor capacidad antioxidante y mayor cantidad de fenoles totales.

En cuanto al orujo de cereza, Popovic y colaboradores (2022) realizaron un estudio en el que los residuos obtenidos se congelaron a -70°C durante 4 h y se liofilizaron para su posterior trituración. Tras la investigación, se observó que la técnica de extracción más rápida fue la extracción asistida por microondas (menos de 5min para la preparación del extracto) en comparación con ultrasonidos, calentamiento y agitación y extracción convencional. En cuanto al solvente, se concluyó que el más eficiente fue el que estaba formado por cloruro de colina y ácido málico (1:1) pero la mayor actividad eliminadora de DPPH la mostró el extracto de cloruro de colina y urea (1:1).

Residuos del sector vitivinícola

La vid también ha sido importante en numerosos estudios sobre las capacidades antioxidantes que presenta en los compuestos fenólicos presentes en distintos

residuos de su producción y cosecha. En cuanto al pretratamiento, todos los subproductos sufren el proceso de liofilización.

Dabetic y colaboradores (2020) realizaron un estudio sobre la concentración de compuestos fenólicos en la piel y semillas de uvas en el que se utilizan dos DES con el mismo aceptor de hidrógeno, pero distinto donador de hidrógeno. La técnica de extracción usada es ultrasonidos. Los autores concluyeron que el mejor disolvente fue el cloruro de colina y ácido cítrico (2:1) ya que mostró una alta eficiencia de extracción de polifenoles de las semillas y la piel de las uvas, y que las semillas poseen mayor capacidad antioxidante que la piel como se observa en la tabla 5.4. tanto para la prueba FRAP como en el contenido de fenoles totales.

Siguiendo con la línea de la investigación de los compuestos fenólicos presentes en las pieles de uva, Bubalo y colaboradores (2016) realizaron una selección de 5 DES diferentes tomando como el disolvente más prometedor el que estaba formado por cloruro de colina que contiene ácido oxálico con un 25% de agua. La capacidad del DES para la obtención de una mayor eficiencia de extracción dependió de la polaridad y el contenido de agua añadido. En cuanto a la técnica de extracción, se llegó a la conclusión de que la extracción asistida por ultrasonido es preferible.

En el año 2015, Jeong y colaboradores llegaron a la misma conclusión de que la técnica de ultrasonidos era la más eficiente. Se seleccionaron diferentes DES formados por ácido cítrico y distintos donantes de enlaces de hidrógeno tomando ácido cítrico: maltosa en proporción molar 2:1 para determinar la eficiencia de extracción en función de los rendimientos de antocianina debido a su mayor rendimiento de extracción (36.14 ± 3.67 mg C3GE/g).

Cañadas y colaboradores (2023) realizaron la extracción de compuestos fenólicos de las semillas de uva. El estudio se centró en el extractante formado por betaína y 1,2-butanodiol ya que se extrajo 91.279 ± 2.564 mg /g WGW mediante la prueba DPPH y un contenido fenólico total de 0.147 ± 0.007 mg /g WGW que superó a los valores de otros NADES. Al contrario de los estudios mencionados, se seleccionó la técnica MAE a 100°C para conseguir una mayor extracción en un tiempo más corto (3min) con menor consumo energético.

Panic y colaboradores (2019) realizaron un estudio en base a la pulpa de uva. Se utilizó como extractante una solución de cloruro de colina y ácido cítrico (2:1) y la técnica de extracción fue una combinación de baños de ultrasonido y microondas en la que se extrajeron 1.58 ± 0.12 mg/g de muestra seca de antocianinas. Las mejores

condiciones para UMAE resultaron ser: potencia MW a 300 W, potencia US 50 W durante 10 min con 30% (v/v) de agua.

En 2016, Mouratoglou y colaboradores centraron la investigación en orujo de uva que fue pretratada por secado en horno. La técnica de extracción seleccionada fue la de ultrasonidos. Se seleccionó como el disolvente más prometedor el glicerol y cloruro de colina en proporción 3:1. Sin embargo, las mezclas de glicerol y acetato de sodio mostraron una capacidad comparable y significativamente mayor que el disolvente convencional.

Residuos de la aceituna

En el caso de la aceituna, también se han presentado diversos estudios para poder comprender la importancia de la capacidad antioxidante de los subproductos remanentes de su cultivo y producción.

De Almeida y colaboradores (2022) llevaron a cabo el estudio de la capacidad antioxidante del orujo de oliva comparando los resultados obtenidos al utilizar 4 extractantes diferentes mediante la técnica de ultrasonidos. Los DES utilizados se obtuvieron combinando cloruro de colina con distintos ácidos: ácido acético (1:2), ácido malónico (1:1), ácido málico (1:1) y ácido cítrico (2:1). Fue necesario un pretratamiento para asegurar una muestra homogénea y estandarizada debido a su alto contenido de agua, el orujo de aceituna se secó, se molió en un molino de cuchilla y se almacenó a -80°C. Tras la caracterización y la preparación de las muestras se realizó un cribado DES. La figura 5.3. muestra la comparación de los resultados de la cuantificación del contenido fenólico total (TPC) y de la actividad antioxidante (DPPH) de los extractos respectivos. En este estudio, el ácido ChCl: malónico presentó el mayor potencial de extracción para el TPC ($19,76 \pm 3,26$ mg GAE/g) y mayor actividad antioxidante ($11,46 \pm 0.7$ g dw/g). Al comparar los DES basados en ácidos dicarboxílicos, los ácidos malónico y málico que se prepararon en la misma proporción

molar, se observa que la presencia de hidroxilo (-OH) en la molécula de ácido málico disminuye la extracción.

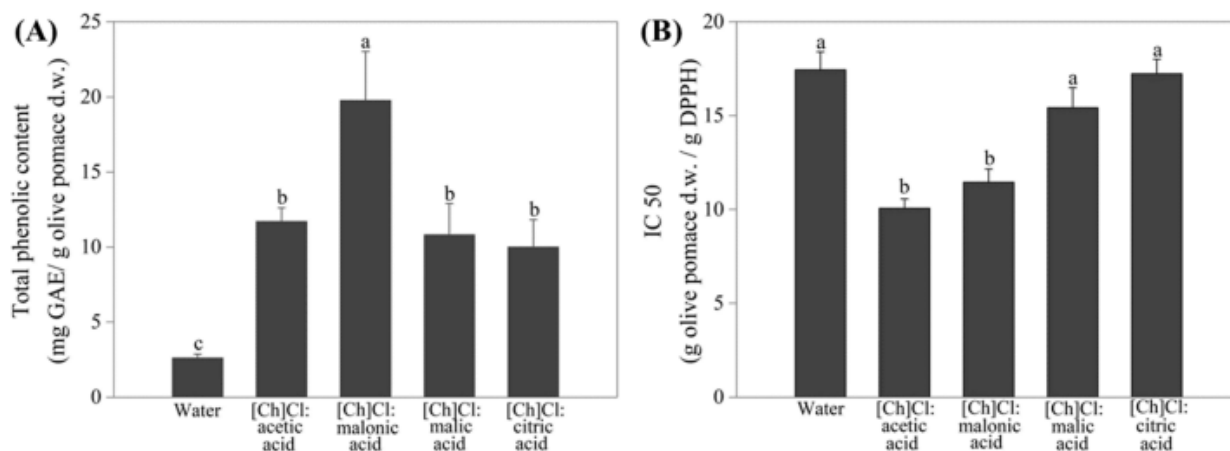


Figura 5.3.: (A) Total de compuestos fenólicos y (B) Capacidad antioxidante por DPPH.

Tras los resultados, en esta investigación se concluyó en que no existían diferencias significativas en condiciones óptimas de extracción entre etanol y DES.

Siguiendo los estudios basados en el orujo de oliva, Chanioti & Tzia (2018) realizaron una comparación entre cuatro técnicas de extracción (extracción asistida por homogeneizado, ultrasonidos, microondas o alta presión hidrostática) y el uso de diferentes NADES. La materia prima se secó al aire a 35 °C durante 24 h mediante una corriente de aire y se molió en 1 mm con un molino de corte. Se llegó a la conclusión de que la mayor eficiencia de extracción se obtuvo mediante HAE con cloruro de colina: ácido cítrico obteniendo 5.11 ± 0.85 g muestra seca / g como mayor actividad antioxidante.

Se realizaron diversos estudios para la determinación de la capacidad antioxidante en hojas de olivo. En estas investigaciones, la muestra se somete al lavado con agua destilada, seguidamente se procede al secado y por último se realiza la molienda para su almacenamiento.

Alrubaigah et al. (2023) utilizaron una red neuronal artificial para modelar los parámetros de extracción. Se demostró que el diseño de los 6 nuevos NADES eran más efectivos que los anteriores y que el etanol al 75%.

Para la extracción, se utilizó la técnica de ultrasonido y con el NADES formado por 1,2-propanodiol y ácido levúnico se extrajo el mayor rendimiento de flavonas.

Alañón y colaboradores (2020) utilizaron una serie de extractantes, pero seleccionaron aquel formado por cloruro de colina y etilenglicol en proporción 1:2 como extractante

más eficaz. Al contrario que Alrubaigah y colaboradores (2023), la técnica de extracción usada fue microondas y los parámetros a tener en cuenta a la temperatura (80°C) composición del disolvente (50% de agua añadida) y tiempo de irradiación (15min) obteniendo así el valor más alto de la suma de compuestos fenólicos que fue de 28.52 mg/g.

Por último, Bonacci y colaboradores (2020) concluyeron que la oleuropeína es el componente más abundante en las hojas y que la combinación de NADES utilizados y la técnica de extracción asistida por microondas consiguen un enfoque eficiente para la recuperación de compuestos fenólicos obteniendo 333.73 ± 0.17 ppm.

A continuación, en las siguientes tablas 5.1- 5.6 se recogen los resultados de los estudios llevados a cabo acerca de los diferentes subproductos agroalimentarios. En ellas, se observa la información recopilada sobre el pretratamiento, los disolventes “verdes” utilizados, la metodología de extracción y las diferentes pruebas realizadas que determinan la capacidad antioxidante de cada uno de ellos.

Tabla 5.1: Evaluación de la capacidad antioxidante de subproductos agroalimentarios del kiwi mediante DES/NADES.

Fuente: elaboración propia.

Referencia	Subproducto	Pretratamiento	Extractantes	Metodología de extracción	DPPH	ABTS	FRAP	Fenoles totales
(Silva et al., 2023)	Cáscara de kiwi	Almacenamiento a -80°C, nitrógeno líquido y molienda	DES GVL: etanol (3:7)	UAE	-	104 ± 2 mg TE/g DW	81 ± 4 mg TE/g DW	24 ± 1 mg GAE/g DW
		Almacenamiento a -80°C, nitrógeno líquido y molienda	DES GVL: etanol (3:7)	MAE	-	131 ± 1 mg TE/g DW	87 ± 4 mg TE/g DW	29.7 ± 0.6 mg GAE/g DW
(Wu et al., 2023)	Gabazo de kiwi	Lavado, liofilización y almacenamiento a -20°C	DES ChCl: Gly (1:2)	UADE	176.41 ± 1.37 µmol Trolox/g DW	194.52 ± 1.16 µmol Trolox/g DW	55.71 ± 0.77 µmol Trolox/g DW	105.37 ± 1.2 mg GAE/g DW
				UAEE	-	-	-	43.8 ± 1.17 mg GAE/g DW
				CSE	18.57 ± 0.84 µmol Trolox/g DW	29.45 ± 0.62 µmol Trolox/g DW	16.11 ± 0.94 µmol Trolox/g DW	14.51 ± 0.26 mg GAE/g DW

GVL: gamma-valerolactona, ChCl: cloruro de colina, Gly: glicerol, UAE: extracción asistida por ultrasonidos, MAE: extracción asistida por microondas, UADE: extracción asistida por ultrasonidos con disolventes eutécticos, UAEE: extracción asistida por ultrasonidos con etanol, CSE: extracción convencional, TE: eq. Trolox, DW: muestra seca

Tabla 5.1 (Continuación): Evaluación de la capacidad antioxidante de subproductos agroalimentarios del kiwi mediante DES/NADES.

Fuente: elaboración propia.

Referencia	Subproducto	Pretratamiento	Extractantes	Metodología de extracción	DPPH	ABTS	FRAP	Fenoles totales
<i>(Chagnoleau et al., 2023)</i>	Cáscara de kiwi	Secado a temperatura ambiente y criomolienda	DES ChCl:EG (1:2) ChCl: AcOHA (1:2) ChCl: Glyc (1:2) ChCl: PropOH2 (1:2) ChCl: LevA (1:2) ChCl: D-sorb (1:1) ChCl: D-Gluc (1:1) ChCl: LacA (1:2) ChCl: CitA (1:2) ChCl: urea (1:2) ChCl: MalA (1:1) BetHCl: EG (1:10) Bet: EG (1:2) Bet: CitA (2:3) Bet: MalA (1:1)	-	17 - 42 mg TE/g DW	-	87- 220 × 10 ⁻⁶ mol eq. Fe ²⁺ /g DW	-

ChCl: cloruro de colina, Bet: betaína, EG: etilenglicol, AcOHA: ácido acético, Glyc: glicerol, PropOH2: 1,2-propanodiol, LevA: ácido levínico, D-sorb: d- sorbitol, D-Gluc: D-glucosa, LacA: ácido láctico, CitA: ácido cítrico, malA: ácido malónico

Tabla 5.2: Evaluación de la capacidad antioxidante de subproductos agroalimentarios de la naranja mediante DES/NADES. Fuente: elaboración propia.

Referencia	Subproducto	Pretratamiento	Extractantes	Metodología de extracción	DPPH	ABTS	ORAC	Fenoles totales
(Viñas Ospino et al, 2023)	Piel de naranja	Lavado con agua destilada, secado y almacenamiento a -20°C .	DES	Agitación y calentamiento durante 30 min a temperatura ambiente.	-	-	-	-
			LA: Glu (5:1)				-	-
			B:EG (1:2)				-	-
			ChCl:CA (2:1)				-	-
			Pro:MA (1:1)				-	$282,8 \pm 7,3$ mg/100 g
			ChCl: U (1:1)				-	-
			Me: Cam (1:1)				$15,12 \pm 1,2$ $\mu\text{mol TE/g}$	-
			Me: Eu (1:1)				$15,32 \pm 0,1$ $\mu\text{mol TE/g}$	-
			C12: C8 (1:3)				-	-

LA: ác. láctico, Glu: glucosa, B: betaína, CA: ác cítrico, Pro: prolina, MA: ác málico, U: urea, Me: DI-Mentol, Cam: alcanfor, Eu: eucaliptol, C12: ác láurico, C8: ác octanoico

Tabla 5.2 (continuación): Evaluación de la capacidad antioxidante de subproductos agroalimentarios de la naranja mediante DES/NADES.

Fuente: elaboración propia.

Referencia	Subproducto	Pretratamiento	Extractantes	Metodología de extracción	DPPH	AB TS	FRAP	Fenoles totales
(Ozturk et al., 2018).	Piel de naranja	Secado al vacío. Almacenamiento con nitrógeno líquido. Pulverización.	DES	SLE	-	-	-	-
			ChCl: Gly (1:2)		IC ₅₀ = 44.8 ± 1.9 µg/ml			2.90 mg GAE/g
			ChCl: Gly (1:3)		-			-
			ChCl: EG (1:4)		IC ₅₀ = 30.6 ± 1.2 µg/ml			3.61 mg GAE/g
			ChCl: EG (1:2)		-			-
			ChCl: EG (1:3)		-			-
			ChCl: Gly (1:4)		-			-

ChCl: cloruro de colina, Gly: glicerol, EG: etilenglicol SLE: extracción sólido-líquido, GAE: equivalentes ácido gálico

Tabla 5.3.: Evaluación de la capacidad antioxidante de subproductos agroalimentarios del arándano mediante DES/NADES. Fuente: elaboración propia.

Referencia	Subproducto	Pretratamiento	Extractantes	Metodología de extracción	DPPH	ABTS	FRAP	Fenoles totales
(Fu et al., 2021)	Pulpa de arándano	Liofilización (48 horas). Molienda. Almacenamiento	NADES ChCl: Ox (1:1)	UAE	361.93 ± 6.39 mg AAE/g DW	734.73 ± 10.33 mg AAE/g DW	—	24.27 ± 0.05 mg C3GE /g DW
(Santos-Martin et al., 2023)	Hojas de arándano	Lavado con agua desionizada. Secado a temperatura ambiente Molienda. Almacenamiento a temperatura ambiente.	NADES La: AcNa: W (3:1:2)	UAE	153 ± 0 mg TEAC/g DBL	—	—	135 ± 1 GAE/g DBL
			NADES ChCl: Ox (1:1)		137 ± 1 mg TEAC/g DBL	—	—	109 ± 1 GAE/g DBL

ChCl: cloruro de colina, Ox: ác oxálico, La: lactato, AcNa: acetato de sodio, W: agua, UAE: ultrasonidos, AAE: equiv ác ascórbico, C3GE: C3G equivalentes, DW: muestra seca, DBL: hoja de arándano seca, TEAC: equivalentes Trolox, GAE: eq. ác gálico

Tabla 5.4: Evaluación de la capacidad antioxidante de subproductos agroalimentarios de la uva mediante DES/NADES. Fuente: elaboración propia.

Referencia	Subproducto	Pretratamiento	Extractantes	Metodología de extracción	DPPH	ABTS	FRAP	Fenoles totales
<i>(Jeong et al., 2015)</i>	Piel de uva	Prensado manual Liofilización Molienda Almacenamiento a -20°C	DES Cit: Fru (1:1)	UAE	-	-	-	28.19 ± 2.52 mg C3GE/g
			Cit: Maltosa (2:1)					36.14 ± 3.67 mg C3GE/g
			Cit: Maltitol (2:1)					32.25 ± 0.75 mg C3GE/g
<i>(Dabetic et al., 2020)</i>	Piel de uva	Liofilización y almacenamiento en nitrógeno	NADES ChCl: Cit (2:1) ChCl: Glc (1:1)	UAE	-	-	0.245 mg/ g DW	15.00 mg/g DW
	Semillas de uva	Lavado con agua destilada y secado a temperatura ambiente			0.885 mg /g DW		3.347 mg/ g DW	70.86 mg/ g DW
<i>(Cañadas et al., 2023)</i>	Semillas de uva blanca	Prensado y almacenamiento	NADES Bet: 2But (1:4)	MAE	91.279 ± 2.564 mg /g WGW	-	-	0.147 ± 0.007 mg /g WGW

Cit: ácido cítrico, Fru: fructosa, Glc: glucosa, Bet: betaína, ChCl: cloruro de colina, 2But: 1,2-butanodiol, UAE: extracción asistida ultrasonidos, MAE: extracción asistida por microondas

Tabla 5.4 (continuación): Evaluación de la capacidad antioxidante de subproductos agroalimentarios de la uva mediante DES/NADES.

Fuente: elaboración propia.

Referencia	Subproducto	Pretratamiento	Extractantes	Metodología de extracción	DPPH	ABTS	FRAP	Fenoles totales
<i>(Bubalo et al., 2016)</i>	Piel de uva	Liofilización y almacenamiento a -20°C	DES Ch: Gly (1:2) Ch: Oa (1:1) Ch: Ma (1:5:1) Ch: Sor (1:1) Ch: Pro: Ma (1:1:1)	MAE UAE	-	-	-	-
<i>(Panic et al., 2019).</i>	Pulpa de uva	Liofilización y almacenamiento a temperatura ambiente	NADES Ch: Cit (2:1)	UMAE	-	-	-	1.58 ± 0.12 mg /g DW
			Ch: Ma (1:1) Ch: Pro: Ma (1:1:1) Pro: Ma (1:1) B: Ma (1:1) B: Cit (1:1) Ma: Glc: Gly (1:1:1) Ma: Glc (1:1)	UMAE	-	-	-	0.28 - 0.92 mg /g DW

Ch: cloruro de colina, Gly: glicerol, Oa: ácido oxálico, Ma: ácido málico, Sor: sorbosa, Pro: prolina, Cit: ácido cítrico, B: betaína, Glc: glucosa, UMAE: extracción asistida por ultrasonidos y microondas.

Tabla 5.5: Evaluación de la capacidad antioxidante de subproductos agroalimentarios de cereza y uva roja mediante DES/NADES. Fuente: elaboración propia

Referencia	Subproducto	Pretratamiento	Extractantes	Metodología de extracción	DPPH	ABTS	FRAP	Fenoles totales
(Popovic et al., 2022)	Orujo de cereza	Congelación a -70°C Liofilización Trituración	NADES ChCl: MalA (1:1)	MAE	IC ₅₀ = 1,4 ± 0,04 mg/ml	-	-	-
			ChCl: Ur (1:1)		0.94 ± 0,05 mg/ml			
			ChCl: Fru (1:1)		1,29 ± 0,04 mg/ml			
(Mouratoglou et al., 2016)	Orujo uva roja	Secado en horno	NADES Gly: ChCl (3:1)	UAE	-	-	-	53.63 mg GAE/g DW
			Gly: AcetNa (3:1) Gly: tartatro Na-K: agua (5:1:4) Gly: tartatro Na-K: agua (5:1:3)					-

ChCl:cloruro de colina, MalA: ácido málico, Ur: urea, Fru: fructosa, Gly: glicerol, AcetNa: acetato de sodio, K:potasio

Tabla 5.6: Evaluación de la capacidad antioxidante de subproductos agroalimentarios de la aceituna mediante DES/NADES. Fuente: elaboración propia.

Referencia	Subproducto	Pretratamiento	Extractantes	Metodología de extracción	DPPH	ABTS	FRAP	Fenoles totales
<i>(Chanioti & Tzia, 2018)</i>	Orujo de aceituna	Secado Molienda	NADES ChCl: DES-CA (1:2)	HAE, MAE, UAE, HHPAE	5.11 ± 0.85 g dw/ g	—	—	34.08 ± 0.08 mg GAE/g dw
			ChCl: DES-LA (1:1) ChCl: DES-MA (1:1) ChCl: DES-GLY (1:1)		—			13 - 34 mg GAE/g dw
<i>(de Almeida et al., 2022)</i>	Orujo de aceituna	Liofilización Molienda Almacenamiento -80°C	DES ChCl: ác. malónico (1:1)	UAE	11.46 ± 0.7 g dw / g	—	—	19.76 mg GAE/g dw
<i>(Bonacci et al., 2020)</i>	Hojas de olivo	Lavado con agua destilada, y secado a 50°C	NADES ChCl: U (1:2) ChCl: Gly (1:1) ChCl: La (1:1) ChCl: EG (1:1) ChCl: Cit (1:1)	MAE	—	—	—	333.73 ± 0.17 ppm

ChCl: cloruro de colina, CA: ác cítrico, LA: ác láctico, Ma: maltosa, Gly; glicerol, U:urea, LA: ác láctico, EG: etilenglicol, Cit: ác cítrico, MAE: extracción asistida por microondas, HAE: extracción asistida por homogeneizado, HHPAE: extracción asistida por alta presión hidrostática, GAE: eq. ác gálico.

Tabla 5.6 (Continuación): Evaluación de la capacidad antioxidante de subproductos agroalimentarios de la aceituna mediante DES/NADES. Fuente: elaboración propia

Referencia	Subproducto	Pretratamiento	Extractantes	Metodología de extracción	DPPH	ABTS	FRAP	Fenoles totales
<i>(Alañon et al., 2020)</i>	Hojas de olivo	Lavado con agua destilada, secado, molienda y almacenamiento a -20°C.	DES CC: Lac (1:2) CC: Ox (1:1) CC: Tart (2:1) CC: But (1:6) CC: Etg (1:2) CC: Xy (2:1) CC: Prop (1:1) CC: Malt (3:1) CC: U (1:2)	MAE	-	-	-	28.52 mg / g
<i>(Alrugaibah et al., 2023)</i>	Hojas de olivo	Lavado, secado en horno y homogeneización.	NADES ChCl: Gly: Le (1:1:2) ChCl: Gly: Lac (1:1:2) ChCl: Prop: Le (1:1:1) ChCl: Cit: EG (2:1:2) ChCl: Cit: Prop (2:1:2) ChCl: EG: Lac (1:1:1)	UAE	-	-	-	-

CC: cloruro colina, Tart: ácido tartárico, But: 1,4-butanodiol, Xy: xilitol, Prop: 1,2-propanodiol, Gly: glicerol, Le: ácido levúrico, Lac: ácido láctico, EG:etilenglicol

6. CONCLUSIONES

En este Trabajo se ha incluido la información más reciente que se ha encontrado en la literatura acerca de la actividad antioxidante de los residuos o subproductos agroalimentarios, centrándose en aquellos del kiwi, la naranja, el arándano, la cereza, la aceituna y los frutos más comunes en el sector vitivinícola. La información recogida permite concluir que:

- La utilización de los solventes verdes en especial los DES y los NADES en sustitución de los solventes convencionales es más adecuada ya que son más respetuosos con el medioambiente.
- Las técnicas de extracción más modernas como la extracción asistida por ultrasonido o por microondas son más efectivas que las técnicas convencionales de maceración o extracción por Soxhlet.
- Existen diversas metodologías viables y sostenibles para evaluar la capacidad antioxidante de los residuos. Esto proporciona flexibilidad a la industria alimentaria y a la comunidad científica para adaptar sus enfoques de acuerdo con las características específicas de los materiales y los objetivos de investigación.
- Si bien en la actualidad existen técnicas más verdes y amigables con el medio ambiente, en la mayoría de los casos, los resultados demuestran que se obtiene una mayor capacidad antioxidante en aquellos subproductos que son sometidos a técnicas innovadoras.
- Los residuos o subproductos agroalimentarios han demostrado poseer mayor cantidad de compuestos fenólicos que los productos.
- A pesar de los avances realizados en los últimos años, se identifican áreas de mejoras y desafíos futuros. Estos incluyen la estandarización de métodos sostenibles, la adaptación a diferentes tipos de residuos y la concienciación en la comunidad científica y la industria sobre la importancia acerca de la sostenibilidad en las investigaciones relacionadas con antioxidantes en alimentos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón Arana, B. L., & Castro Sánchez, J. I. (2021). Estudio comparativo de polifenoles y actividad antioxidante en arándanos rojos (*Vaccinium macrocarpon*) y arándanos azules (*Vaccinium corymbosum*) en extractos etanólicos. [Tesis de Grado, Universidad de Guayaquil].
- Alañón, M. E., Ivanović, M., Gómez-Caravaca, A. M., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. (2020). Choline chloride derivative-based deep eutectic liquids as novel green alternative solvents for extraction of phenolic compounds from olive leaf. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 1685-1701.
- Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2021). Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & function*, 12(1), 14-29.
- Alrugaibah, M., Yagiz, Y., & Gu, L. (2023). Novel natural deep eutectic solvents as efficient green reagents to extract phenolic compounds from olive leaves and predictive modelling by artificial neural networking. *Food and Bioproducts Processing*, 138, 198-208.
- Alonso, D. A., Baeza, A., Chinchilla, R., Gómez, C., Guillena, G., Marset, X., Saavedra, B. (2018). Mezclas eutécticas como alternativa sostenible a los disolventes convencionales en Química Orgánica. *Real sociedad española de Química*, 79-87.
- Anastas, P. T., & Kirchhoff, M. M. (2002). Origins, current status, and future challenges of green chemistry. *Accounts of chemical research*, 35(9), 686-694.
- Anastas, P., & Warner, J. (1998). *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press, 30.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., & Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 997–1027.
- Armenta, S., Esteve-Turrillas, F. A., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2022). Alternative green solvents in sample preparation. *Green Analytical Chemistry*, 1, 100007.
- Benítez-Estrada, A., Villanueva-Sánchez, J., González-Rosendo, G., Alcántar-Rodríguez, V. E., Puga-Díaz, R., & Quintero-Gutiérrez, A. G. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y

espectrofotométricos (FRAP). TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 23.

Benvenuti, L., Zielinski, A. A. F., & Ferreira, S. R. S. (2019). Which is the best food emerging solvent: γ IL, DES or NADES? Trends in Food Science & Technology, 90, 133-146.

Berbel, J., & Posadillo, A. (2018). Review and analysis of alternatives for the valorisation of agro-industrial olive oil by-products. Sustainability, 10(1), 237.

Blázquez Alonso, N. (2020). VII. Subproductos y fin de condición de residuos: elementos clave para una economía circular. Actualidad Jurídica Ambiental, (102).

Bonacci, S., Di Gioia, M. L., Costanzo, P., Maiuolo, L., Tallarico, S., & Nardi, M. (2020). Natural deep eutectic solvent as extraction media for the main phenolic compounds from olive oil processing wastes. Antioxidants, 9(6), 513. Bosiljkov, T. (2017). Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. Food and Bioproducts Processing, 195-203.

Bubalo, M. C., Ćurko, N., Tomašević, M., Ganić, K. K., & Redovniković, I. R. (2016). Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. Food Chemistry, 200, 159-166.

Camacho Marín, R., Rivas Vallejo, C., & Gaspar Castro, M. (2020). Innovación y tecnología educativa en el contexto actual latinoamericano.

Cámara, C., Fernández, P., Martín-Esteban, A., Pérez-Conde, C., & Vidal, M. (2002). *Toma y tratamiento de muestras*. Madrid: SÍNTESIS.

Cañadas, R., Sáenz de Miera, B., Méndez, P., González, E. J., & González-Miquel, M. (2023). Enhanced Recovery of Natural Antioxidants from Grape Waste Using Natural Eutectic Solvents-Based Microwave-Assisted Extraction. Molecules, 28(3), 1153.

Casquete, R., Castro, S., Martín, A., Ruiz, S., Saraiva, J., Córdoba, M., & Teixeira, P. (2015). Evaluation of the effect of high pressure on total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of citrus peels. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 31, 37-44.

Castro- Muñoz, R., Díaz-Montes, E., Gontarek-Castro, E., Boczka, G., & Galanakis, C. (2022). A comprehensive review on current and emerging technologies toward the valorization of bio-based wastes and by products from foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 21(1), 46-105.

Chagnoleau, J. B., Ferreira, A. M., Coutinho, J. A., Fernandez, X., Azoulay, S., & Papaiconomou, N. (2023). Sustainable extraction of antioxidants from out-of-caliber kiwifruits. *Food Chemistry*, 401, 133992.

Chanioti, S., & Tzia, C. (2018). Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48, 228-239.

Chaves, J. O., De Souza, M. C., Da Silva, L. C., Lachos-Perez, D., Torres-Mayanga, P. C., Machado, A. P. D. F., ... & Rostagno, M. A. (2020). Extraction of flavonoids from natural sources using modern techniques. *Frontiers in Chemistry*, 8, 507887.

Cheng, Y., Xue, F., Yu, S., Du, S., & Yang, Y. (2021). Subcritical water extraction of natural products. *Molecules*, 26(13), 4004.

Cruz, E. L. (2018). Estrategias de comercialización al mercado de Estados Unidos para las exportaciones de arándanos frescos de los agricultores de la región de La Libertad, 2017.

Dabetić, N., Todorović, V., Panić, M., Radojčić Redovniković, I., & Šobajić, S. (2020). Impact of deep eutectic solvents on extraction of polyphenols from grape seeds and skin. *Applied sciences*, 10(14), 4830.

de Almeida Pontes, P. V., Czaikoski, A., Almeida, N. A., Fraga, S., de Oliveira Rocha, L., Cunha, R. L., ... & Batista, E. A. C. (2022). Extraction optimization, biological activities, and application in O/W emulsion of deep eutectic solvents-based phenolic extracts from olive pomace. *Food Research International*, 161, 111753.

de la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Álvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic Compounds: Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables. *Woodhead Publishing*, 253-271.

Díaz-Montes, E. (2022). Residuos Agroalimentarios ¿Qué son? ¿Quién los genera? y ¿ Por qué son valiosos? *Frontera Biotecnológica*, 9-16.

Duran, J., Rajchenbach, J., & Clément, E. (1993). Arching effect model for particle size segregation. *Physical review letters*, 70(16), 2431.

Ebrahimi, P., & Lante, A. (2022). Environmentally friendly techniques for the recovery of polyphenols from food by-products and their impact on polyphenol oxidase: A critical review. *Applied Sciences*, 12(4), 1923.

Eckardt, J., Sepperer, T., Cesprini, E., Sket, P., & Tondi, G. (2023). Comparing Condensed and Hydrolisable Tannins for Mechanical foaming of Furanic Foams: Synthesis and Characterization. *Molecules*, 28(6).

Espino, M., Fernández, M., Gomez, F. J., & Silva, M. (2018). Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products. *Food Chemistry*, 239, 671-678.

Fernández, M. (2018). Natural deep eutectic solvents-mediated extractions: The way forward for sustainable analytical developments. *Analytica Chimica Acta*, 3-10.

Fu, X., Wang, D., Belwal, T., Xie, J., Xu, Y., Li, L., ... & Luo, Z. (2021). Natural deep eutectic solvent enhanced pulse-ultrasonication assisted extraction as a multi-stability protective and efficient green strategy to extract anthocyanin from blueberry pomace. *Lwt*, 144, 111220.

Gałaszka, A., Migaszewski, Z., & Namieśnik, J. (2013). The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC-Trends Anal*, 50, 78-84.

García, P. (2022). Composición y sustancias bioactivas en subproductos de la industrialización de frutas. *Revista del Foro de la Alimentación, la Nutrición y la Salud (RFANUS)*, 22-44.

Gordo, D. A. M. (2018). Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de investigación agraria y ambiental*, 9(1), 81-104.

Gu, Y., & Jerome, F. (2013). Bio-based solvents: an emerging generation of fluids for the design of eco-efficiency processes in catalysis and organic chemistry. *Chemistry Society*, 9550-9570.

Ingaroca, S., Castro, A., & Ramos, N. (2019). Composición química y ensayos de actividad antioxidante y del efecto fungistático sobre *Candida albicans* del aceite esencial de *Piper aduncum* L." Matico". *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 85(2), 268-279.

Jeong, K. M., Zhao, J., Jin, Y., Heo, S. R., Han, S. Y., Yoo, D. E., & Lee, J. (2015). Highly efficient extraction of anthocyanins from grape skin using deep eutectic solvents as green and tunable media. *Archives of pharmacal research*, 38, 2143-2152.

Lama-Muñoz, A., & Contreras, M. (2022). Extraction Systems and Analytical Techniques for Food Phenolic Compounds: A review. *foods*, 1-27.

Lianza, M., Marincich, L., & Antognoni, F. (2022). The Greening of Anthocyanins: Eco-Friendly Techniques for Their Recovery from Agri-Food By-Products. *Antioxidants*, 1-25.

Mir-Cerdà, A., Nunez, O., Granados, M., Sentellas, S., & Saurina, J. (2023). An overview of the extraction and characterization of bioactive phenolic compounds from agri-food waste within the framework of circular bioeconomy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116994.

Mouratoglou, E., Malliou, V., & Makris, D. P. (2016). Novel glycerol-based natural eutectic mixtures and their efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from agri-food waste biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 7, 1377-1387.

Murador, D. C. (2019). Bioavailability and biological effects of bioactive compounds extracted with natural deep eutectic solvents and ionic liquids: advantages over conventional organic solvents. *Current opinion in food science*, 25-34.

Nishiumi, S., Miyamoto, S., Kawabata, K., Ohnishi, K., Mukai, R., Murakami, A., ... & Terao, J. (2011). Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. *Frontiers in Bioscience-Scholar*, 3(4), 1332-1362.

Nunes, M. A., Pimentel, F. B., Costa, A. S., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. (2016). Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 35, 139-148.

Oliveira, A. F., Bretes, L., & Furtado, I. (2019). Review of PD-1/PD-L1 inhibitors in metastatic dMMR/MSI-H colorectal cancer. *Frontiers in oncology*, 9, 396.

Ozturk, B., Parkinson, C., & Gonzalez-Miquel, M. (2018). Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents. *Separation and Purification Technology*, 206, 1-13.

Panić, M., Gunjević, V., Cravotto, G., & Redovniković, I. R. (2019). Enabling technologies for the extraction of grape-pomace anthocyanins using natural deep eutectic solvents in up-to-half-litre batches extraction of grape-pomace anthocyanins using NADES. *Food Chemistry*, 300, 125185.

Popovic, B. M., Micic, N., Potkonjak, A., Blagojevic, B., Pavlovic, K., Milanov, D., & Juric, T. (2022). Novel extraction of polyphenols from sour cherry pomace using natural deep eutectic solvents—Ultrafast microwave-assisted NADES preparation and extraction. *Food chemistry*, 366, 130562.

Prasad, W., Wani, A. D., Khamrui, K., Hussain, S. A., & Khetera, Y. (2022). Green solvents, potential alternatives for petroleum based products in food processing industries. *Cleaner Chemical Engineering*, 100052.

Rodríguez, B., Torres-Cornejo, M., Álvarez-Rivera, G., & Mendiola, J. A. (2021). Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Bioactive Compounds from Natural Sources and Agricultural By-Products. *Applied Sciences*, 1-22.

Rojano, B., Cristina Zapata, I., & Cortes, F. B. (2012). Estabilidad de antocianinas y valores de capacidad de absorbancia de radicales oxígeno (ORAC) de extractos acuosos de corozo (*Bactris guineensis*). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(3), 244-255.

Saini, A., Kumar, A., Panesar, P. S., & Thakur, A. (2022). Potential of deep eutectic solvents in the extraction of value-added compounds from agro-industrial by-products. *Applied Food Research*, 100211.

Santos-Martín, M., Cubero-Cardoso, J., González-Domínguez, R., Cortés-Triviño, E., Sayago, A., Urbano, J., & Fernández-Recamales, Á. (2023). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from blueberry leaves using natural deep eutectic solvents (NADES) for the valorization of agrifood wastes. *Biomass and Bioenergy*, 175, 106882.

Silva, S. S., Justi, M., Chagnoleau, J. B., Papaiconomou, N., Fernandez, X., Santos, S. A., ... & Coutinho, J. A. (2023). Using biobased solvents for the extraction of phenolic compounds from kiwifruit industry waste. *Separation and Purification Technology*, 304, 122344.

Socas-Rodríguez, B., Álvarez-Rivera, G., Valdés, A., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2021). Food by-products and food wastes: are they safe enough for their valorization? *Trends in Food Science & Technology*, 133-147.

Surco-Laos, F., Ayquipa Paucar, H., Quispe Gamboa, W., García Ceccarelli, J., & Valle Campos, M. (2020). Determinación de polifenoles totales y actividad antioxidante de extracto de semillas de uvas residuos de la producción de Pisco. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 86(2), 123-131.

Szczurek, A. (2021). Perspectives on Tannins. *Biomolecules*, 11(3), 442.

Taladrid, D., Laguna, L., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2019). Aplicaciones y nuevos usos de subproductos de la vinificación. *Interempresas: Canales Sectoriales*.

Triana, E., Leal, F., Campo, Y., & Lizcano, H. (2014). Evaluación de ensilaje a partir de dos subproductos agroindustriales (cáscara de naranja y plátano de rechazo) para alimentación de ganado bovino. *Alimentos Hoy*, 22(31), 33-45.

Velasco, R. J., Villada, H. S., & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Información tecnológica*, 18(1), 53-66.

- Vian, M., Breil, C., Vernes, L., Chaabani, E., & Chemat, F. (2017). Green solvents for sample preparation in analytical chemistry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 5, 44-48.
- Vila, J., Tejeda, L., Peñarrieta, J., Mollinedo, P., & Bravo, J. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81.
- Viñas-Ospino, A., Panić, M., Bagović, M., Radošević, K., Esteve, M. J., & Redovniković, I. R. (2023). Green approach to extract bioactive compounds from orange peel employing hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents. *Sustainable chemistry and pharmacy*, 31, 100942.
- Vuolo, M. M., Lima, V. S., & Junior, M. R. M. (2019). Phenolic compounds: Structure, classification, and antioxidant power. In *Bioactive compounds* (pp. 33-50). Woodhead Publishing.
- Wu, D. T., Deng, W., Li, J., Geng, J. L., Hu, Y. C., Zou, L., ... & Gan, R. Y. (2023). Ultrasound-Assisted Deep Eutectic Solvent Extraction of Phenolic Compounds from Thinned Young Kiwifruits and Their Beneficial Effects. *Antioxidants*, 12(7), 1475.
- Zainal-Abidin, M. H., Hayyan, M., Hayyan, A., & Jayakumar, N. S. (2017). New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. *Analytica Chimica Acta*, 979, 1-23.