

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**

Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales



**MEJORA DE LA EXTRACCIÓN EN PROCESOS  
DE BIORREFINERÍAS: DISOLVENTES  
SOSTENIBLES Y TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN  
ASISTIDA**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada para optar al título de Doctora por:

**Blanca Sáenz de Miera Aparicio**

Con Máster Universitario en Ciencia y Tecnología Químicas

Madrid, 2024





UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID  
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales

**Doctorado en Ingeniería Ambiental, Química y de los  
Materiales**

**MEJORA DE LA EXTRACCIÓN EN PROCESOS  
DE BIORREFINERÍAS: DISOLVENTES  
SOSTENIBLES Y TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN  
ASISTIDA**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada para optar al título de Doctora por:

**Blanca Sáenz de Miera**

Con Máster Universitario en Ciencia y Tecnología Químicas

Bajo la dirección de:

Dr. Emilio José González Gómez

Dra. María González Miquel

Madrid, 2024



Título: Mejora de la extracción en procesos de biorrefinerías: disolventes sostenibles y técnicas de extracción asistida

Autor: Blanca Sáenz de Miera Aparicio

Programa de Doctorado: Doctorado en Ingeniería Ambiental, Química y de los Materiales

Dirección de tesis:

Dr. Emilio José González Gómez, Profesor titular, Universidad Politécnica de Madrid (Director).

Dra. María González Miquel, Profesora titular, Universidad Politécnica de Madrid  
(Codirectora).

Revisores externos:

Tribunal de tesis:

Fecha de defensa:

Esta tesis ha sido parcialmente financiada por la Comunidad Autónoma de Madrid (España) mediante la ayuda para la realización de contratos para ayudantes de investigación PEJ-2020-AI/AMB-18391.





**POLITÉCNICA**



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID  
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE  
INGENIEROS INDUSTRIALES

Los Doctores **D. Emilio José González Gómez** y **Dña. María González Miquel**, ambos profesores titulares de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM),

### **INFORMAN**

Que el trabajo de investigación recogido en la memoria titulada “Mejora de la extracción en procesos de biorrefinerías: disolventes sostenibles y técnicas de extracción asistida” ha sido realizado, bajo su dirección, por Blanca Sáenz de Miera Aparicio en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química Industrial y del Medio Ambiente (DIQUIMA) perteneciente a la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales (ETSII) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM). Dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos de originalidad y rigor metodológico para optar al Título de Doctor, autorizando su presentación en la Universidad Politécnica de Madrid.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente autorización.

Madrid, 12 de julio de 2024

Fdo: Emilio José González Gómez

Fdo: María González Miquel



*A mi madre*



# Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Emilio González y la Dra. María González por darme la oportunidad de realizar esta Tesis, por sus consejos, su guía y su apoyo a lo largo del proceso. Me gustaría daros las gracias por la confianza y enseñanza de los últimos años. También me gustaría agradecer a Raquel, una gran compañera que me ayudó desde el primer día y seguir sus pasos lo ha hecho todo un poco más sencillo.

También quiero agradecer a todos mis compañeros del departamento de Ingeniería Química y Medio Ambiente, que de alguna forma también han contribuido a la realización de esta tesis. En especial a Silvia y Rubén que hicieron que mis días en la escuela fueran más agradables y divertidos. Rubén, gracias por ayudarme con COSMO, por darme ánimos, por todo lo que me has enseñado, eres un compañero increíble. Silvia, da gusto encontrarse con gente como tú siempre dispuesta a ayudar con lo que sea necesario. En general, a todos los compañeros con los que he tenido el gusto de trabajar en el laboratorio, compartiendo rato y conocimientos.

A todas mis amigas, que sois las mejores, Paula, Valle, Alba, María y Luquitas, Fátima, gracias por todo y por seguir compartiendo la vida en todas sus etapas. A mis amigas Adriana y Estefanía, sois lo mejor que me ha dado la investigación. A mi grupo de 4 pax, por aguantarme todo el invierno y por ser como hermanos. Y en especial, a mis amigas del alma, las reinas, Sil y Bea, sin su apoyo incondicional en todo lo que me propongo no hubiera acabado de escribir la tesis, gracias por aguantarme, gracias por escucharme y sobre todo gracias por no dejarme tirar la toalla, sois la suerte de mi vida. Y también gracias al rey, Cerri, que ha tenido el valor hasta de leerse un capítulo.

Además, me gustaría dar las gracias a mis compañeros de AXA XL, por su gran acogida y apoyo recibido en la etapa final de la tesis, por darme la oportunidad de cambiar de profesión. Al AMPA por sus desayunos y exposiciones, los días en la oficina son mejores gracias a vosotros.

Finalmente, quiero dar las gracias a mi familia por su apoyo y amor, por haber hecho que sea quien soy. A mi padre, a mi tía Inma, a mi tío Gorgo, a mi hermano Eugenio, a mi hermana Marina y a todos mis primos y tíos. Marina, mi hermana, mi hermanita, eres mi mitad.

## **Agradecimientos institucionales**

Este trabajo ha sido financiado por la Comunidad Autónoma de Madrid (España):

- Proyecto SUSTEC S2018/EMT-4348 Tecnologías para la mejora de la sostenibilidad de procesos y productos basados en biomasa lignocelulósica
- Ayuda para la realización de contratos para ayudantes de investigación, correspondiente a la convocatoria de 2020. PEJ-2020-AI/AMB-18391.

# Abstract

The current industrial system industrial dependence on non-renewable resources raises concerns about sustainability and environmental impact. In this regard, biorefineries emerge as facilities where biomass is converted into a wide range of products and energy. However, challenges in efficiently utilizing biomass and optimizing processes such as pretreatment, fermentation, and product separation.

This Doctoral Thesis is focused on optimizing two separation processes in biorefineries: i) selective extraction of fermentation inhibitors from sugar-rich streams using liquid-liquid extraction techniques to enhance fermentation yields, and ii) extraction of high-value phenolic compounds from orange solid waste using solid-liquid extraction. In line with the principles of Green Chemistry, the use of eutectic solvents and bio-based solvents is proposed for their renewable origin and low environmental impact. Additionally, the use of ultrasound and microwave-assisted extraction techniques is suggested to improve extraction yields while reducing time and energy consumption.

Firstly, a detoxification method for aqueous streams with high sugar and fermentation inhibitor content is proposed, using liquid-liquid extraction with hydrophobic eutectic solvents based on carboxylic acids and bio-based solvents (2-methyltetrahydrofuran, cyclopentyl methyl ether, and limonene). Initially, the effect of initial concentration and temperature on phenolic compound extraction was evaluated, finding that neither significantly affects extraction efficiency. Subsequently, the selectivity of the solvents was studied in a synthetic mixture of phenolic compounds and glucose. The results are very promising; the tested solvents can easily extract phenolic compounds but not glucose. In particular, the bio-based solvent cyclopentyl methyl ether showed the best results and was chosen to study more complex mixtures involving various inhibitors (phenolic compounds and furans) and three types of sugars. This mixture was used to study the solvent-to-sample ratio and agitation time, identifying an optimal solvent volume and maximum agitation time that maximizes extraction efficiency.

In the second part, the valorization of orange peel waste through solid-liquid extraction of high-value phenolic compounds is proposed. The study begins with the recovery of phenolic compounds using conventional solvents (water, 80% ethanol in water, and ethyl acetate) to optimize assisted extraction techniques (ultrasonic bath, ultrasonic probe, and microwave). The results showed that hydrophobic solvents have low extraction capacity, and assisted extraction techniques reduce extraction time while maintaining efficiency. Subsequently, extraction with different sustainable solvents was examined,

evaluating their performance with the same assisted extraction techniques. Eutectic solvents improve extraction efficiency, particularly the solvent based on betaine and 1,2-butanediol. Finally, the extraction of phenolic compounds and sugars present in orange peel waste using bio-based solvents (2-methyltetrahydrofuran, cyclopentyl methyl ether, ethyl lactate, dimethyl isosorbide, cyrene, and  $\gamma$ -valerolactone) was quantified. Based on the results, a cascade recovery of the compounds of interest is proposed, first extracting antioxidants with  $\gamma$ -valerolactone and then sugars with ethyl lactate.

The results of this Doctoral Thesis highlight the potential of using eutectic solvents and bio-based solvents in biorefinery extraction processes. Additionally, significant improvements are found when using assisted extraction techniques, leading to notable reductions in both extraction time and energy consumption.

# Resumen

La dependencia del sistema industrial hacia recursos no renovables preocupa por su sostenibilidad e impacto ambiental. En este contexto, surgen las biorrefinerías, donde se transforma la biomasa en diversos productos y energía. Sin embargo, enfrentan desafíos en el uso eficiente de la biomasa y la optimización de procesos como el pretratamiento, la fermentación y la separación de productos.

Esta Tesis Doctoral se enfoca en la optimización de dos procesos de separación en biorrefinerías: i) la extracción selectiva de inhibidores de la fermentación presentes en corrientes ricas en azúcares, utilizando técnicas de extracción líquido-líquido para mejorar los rendimientos de la fermentación, y ii) la extracción de compuestos fenólicos de alto valor añadido a partir de residuos sólidos de naranja, mediante extracción sólido-líquido. Siguiendo los principios de la Química Verde, se propone el uso de disolventes eutécticos y biodisolventes, destacando por su origen renovable y bajo impacto ambiental. Además, se sugiere el uso de técnicas de extracción asistida por ultrasonidos y microondas para mejorar los rendimientos de extracción, reduciendo el tiempo y el gasto energético.

Primero, se propone un método de detoxificación de corrientes acuosas con contenido en azúcares e inhibidores de la fermentación mediante la extracción líquido-líquido con disolventes eutécticos hidrófobos formados a partir de ácidos carboxílicos y biodisolventes (2-metiltetrahidrofurano, ciclopentil metil éter y limoneno). Primero, se evaluó el efecto de la concentración inicial y la temperatura en la extracción de compuestos fenólicos, encontrando que ninguno de estos factores afecta significativamente la eficiencia de extracción. Después, se estudió la selectividad de los disolventes en una mezcla sintética formada por los compuestos fenólicos y glucosa. Los resultados obtenidos son muy prometedores, pues los disolventes probados pueden extraer fácilmente compuestos fenólicos, pero no glucosa. En particular, el biodisolvente ciclopentil metil éter mostró los mejores resultados, siendo seleccionado para estudiar mezclas más complejas que incluyen diferentes tipos de inhibidores (compuestos fenólicos y furanos) y tres tipos de azúcares. Esta misma mezcla se utilizó para estudiar la relación disolvente-muestra y el tiempo de agitación, encontrando un volumen óptimo de disolvente y un tiempo máximo de agitación que maximiza la eficiencia de extracción.

En la segunda parte, se propone la valorización del residuo sólido de naranja a través de la extracción sólido-líquido de compuestos fenólicos de alto valor añadido. El estudio se inició con la recuperación de compuestos fenólicos empleando disolventes convencionales (agua, disolución de 80% etanol en agua y acetato de etilo) para optimizar las técnicas de extracción asistida (baño de ultrasonidos, sonda de ultrasonidos y microondas). Los resultados muestran que los disolventes hidrófobos tienen baja capacidad de extracción, y las técnicas de extracción asistida reducen el tiempo de extracción

manteniendo la eficiencia. Después, se examinó la extracción con disolventes sostenibles, evaluando su rendimiento con las mismas técnicas de extracción asistida. Los disolventes eutécticos mejoran la eficiencia de extracción, en concreto, el disolvente formado a partir de betaína y 1,2-butanodiol. Por último, se cuantificó la extracción de compuestos fenólicos y azúcares empleando biodisolventes, proponiendo una recuperación en cascada de los compuestos de interés, primero extrayendo antioxidantes con  $\gamma$ -valerolactona y luego azúcares con lactato de etilo.

Los resultados de esta Tesis Doctoral destacan el potencial de los disolventes eutécticos y los biodisolventes en los procesos de extracción en biorrefinerías. Además, se observan mejoras significativas en el tiempo y eficiencia de extracción al emplear técnicas de extracción asistidas.

# Tabla de Contenido

<b>Agradecimientos</b>	<b>vii</b>
<b>Abstract</b>	<b>ix</b>
<b>Resumen</b>	<b>xi</b>
<b>Tabla de Contenido</b>	<b>xiii</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>xv</b>
<b>Lista de Tablas</b>	<b>xxi</b>
<b>Abreviaturas y Acrónimos</b>	<b>xxvii</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>31</b>
1.1. Biorrefinerías.....	33
1.1.1. Extracción selectiva de inhibidores de la fermentación .....	37
1.1.2. Extracción de compuestos de alto valor añadido.....	39
1.2. Química Verde .....	42
1.3. Disolventes sostenibles.....	45
1.3.1. Disolventes eutécticos.....	46
1.3.2. Biodisolventes .....	49
1.3.3. Herramientas computacionales .....	53
1.4. Técnicas de extracción .....	54
1.4.1. Extracción asistida por ultrasonidos.....	57
1.4.2. Extracción asistida por microondas.....	58
<b>2. Objetivos</b>	<b>61</b>
<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>67</b>
3.1. Reactivos.....	69
3.2. Equipos.....	74
3.3. Preparación de disolventes eutécticos .....	76
3.3.1. Disolventes eutécticos hidrófobos .....	76
3.3.2. Disolventes eutécticos hidrófilos .....	77
3.4. Preparación de muestras .....	78

3.4.1.	Disoluciones acuosas de inhibidores de la fermentación.....	78
3.4.2.	Muestras sólidas de residuo sólido de naranja .....	81
3.5.	Extracciones .....	82
3.5.1.	Extracción líquido-líquido.....	82
3.5.2.	Extracción sólido-líquido .....	83
3.5.3.	Extracción asistida .....	84
3.6.	Métodos de análisis .....	86
3.6.1.	Análisis espectrofotométricos.....	86
3.6.2.	Análisis cromatográficos .....	88
3.7.	Recuperación del disolvente .....	94
3.8.	Cálculos computacionales.....	95
3.8.1.	Optimización de la geometría molecular empleando Turbomole.....	95
3.8.2.	Detalles computacionales del método COSMO-RS .....	96
<b>4.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>99</b>
4.1.	Extracción selectiva de inhibidores y azúcares .....	101
4.1.1.	Extracción líquido-líquido de compuestos fenólicos .....	101
4.1.2.	Extracción líquido-líquido de compuestos fenólicos y glucosa .....	108
4.1.3.	Extracción líquido-líquido de inhibidores y azúcares .....	113
4.1.4.	Recuperación de disolvente .....	120
4.2.	Extracción de antioxidantes a partir de residuo sólido de naranja.....	123
4.2.1.	Extracción sólido-líquido empleando disolventes convencionales .....	123
4.2.2.	Extracción sólido-líquido empleando disolventes eutécticos.....	135
4.2.3.	Extracción sólido-líquido empleado biodisolventes .....	147
<b>5.</b>	<b>Conclusiones Generales</b>	<b>163</b>
	<b>Referencias</b>	<b>171</b>
	<b>Anexos</b>	<b>197</b>
	<b>Información experimental complementaria</b>	<b>199</b>
	<b>Contribuciones científicas</b>	<b>217</b>

# Lista de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Esquema de los distintos sistemas de clasificación de las biorrefinerías. ....	34
<b>Figura 1.2.</b> Estructura química de la biomasa lignocelulósica, compuesta de lignina, celulosa y hemicelulosa [24]. ....	35
<b>Figura 1.3.</b> Los 12 principios de la Química Verde. ....	43
<b>Figura 1.4.</b> Los 6 principios de la extracción sostenible. ....	44
<b>Figura 1.5.</b> Diagrama de fases sólido-líquido típico de un disolvente eutéctico. ....	47
<b>Figura 1.6.</b> Ejemplos de biodisolventes en función de la biomasa de origen. ....	50
<b>Figura 1.7.</b> Esquema del proceso de extracción líquido-líquido. ....	55
<b>Figura 1.8.</b> Esquema del proceso de extracción sólido-líquido convencional. ....	56
<b>Figura 1.9.</b> Esquema de la onda de ultrasonidos y la variación de las burbujas de cavitación. ....	57
<b>Figura 1.10.</b> Esquema de la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos. ....	58
<b>Figura 1.11.</b> Esquema de la extracción sólido-líquido asistida por microondas. ....	59
<b>Figura 3.1.</b> Esquema de la preparación del residuo sólido de naranja (RSN). ....	82
<b>Figura 3.2.</b> Perfil del cromatograma de HPLC-DAD de la disolución patrón de 50 mg/L de los compuestos fenólicos inhibidores de la fermentación a 270 nm (siringol, fenol, guayacol y o-cresol) y a 325 nm (vainillina). ....	89
<b>Figura 3.3.</b> Perfil del cromatograma de HPLC-DAD de la solución patrón de 50 mg/L de los compuestos inhibidores de la fermentación a 270 nm (furfural, ácido 4-hidroxibenzoicosiringol, ácido vanílico, siringol, fenol y guayacol), a 284 nm (5-hidroximetilfurfural, 4-hidroxibenzaldehído y vainillina) y 323 nm (ácido cumárico y ácido ferúlico). ....	91
<b>Figura 3.4.</b> Perfil del cromatograma de HPLC-DAD de la solución patrón de 50 mg/L de los compuestos fenólicos presentes en RSN a 271 nm (ácido gálico y ácido protocatecuico), a 282 nm (catequina, naringina y hesperidina), 323 nm (ácido caféico, ácido cumárico y ácido ferúlico), y a 370 nm (rutina y quercetina). ....	92

<b>Figura 3.5.</b> Perfil del cromatograma de HPLC-RI de la disolución patrón de 10 g/L de los azúcares: sacarosa, glucosa y fructosa.....	93
<b>Figura 3.6.</b> Esquema de recuperación del disolvente.....	95
<b>Figura 4.1.</b> Comparación de la eficiencia de extracción de los DE hidrófobos (C8-C10, C8-C12, C10-C12): (A) disoluciones de compuestos fenólicos individuales (100 mg/L); (B) mezcla multicomponente de compuestos fenólicos (500-CF). Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 15 min, reposo durante la noche; T= 25 °C; separación de fases: reposo durante la noche.....	102
<b>Figura 4.2.</b> Eficiencia de extracción de (A) fenol, (B) o-cresol, (C) guayacol, (D) siringol y (E) vainillina de los disolventes estudiados (C8-C10, C8-C12, C10-C12, 2MeTHF, CPME y LIM) a diferentes concentraciones iniciales de la mezcla multicomponente (50-CF, 100- CF, 250- CF y 500- CF). Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 15 min; T= 25 °C; separación de fases: reposo durante la noche.....	104
<b>Figura 4.3.</b> Eficiencia de extracción de (A) fenol, (B) o-cresol, (C) guayacol, (D) siringol y (E) vainillina con los disolventes ensayados (C8-C10, C8-C12, C10-C12, 2MeTHF, CPME y LIM) a diferentes temperaturas (25, 40 y 60 °C) para la disolución 500-CF. Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 15 min; C <sub>o</sub> = 500 mg/L (100 mg/L de cada compuesto fenólico); separación de fases: reposo durante la noche.....	107
<b>Figura 4.4.</b> Eficiencia de extracción de los disolventes (C8-C10, C8-C12, C10-C12, 2MeTHF, CPME y LIM) para la muestra CF-GLU. Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 15 min; T= 25 °C; C <sub>o</sub> compuestos fenólicos= 500 mg/L; C <sub>o</sub> glucosa= 50 g/L; separación de fases: reposo durante la noche.....	108
<b>Figura 4.5.</b> Energía de Gibbs y entalpía de exceso (izquierda) y contribuciones a la entalpía de exceso (VdW, EH, FE) (derecha), para las siguientes mezclas equimolares: (A) fenol/disolvente, (B) o-cresol/disolvente, (C) guayacol/disolvente, (D) siringol/disolvente y (E) vainillina/disolvente.....	111
<b>Figura 4.6.</b> Energía de Gibbs y entalpía de exceso (izquierda) y contribuciones de a la entalpía de exceso (VdW, EH, FE) (derecha), para la mezcla equimolar glucosa/disolvente.....	113
<b>Figura 4.7.</b> Eficiencia de extracción del CPME en la mezcla sintética IF-AZ a diferentes tiempos de agitación (5, 10, 15, 30, 45 min). Condiciones experimentales: relación muestra: disolvente=1; t agitación= 5, 10, 15, 30 y 45 min; T= 25 °C; separación de fases: reposo durante la noche.....	114

<b>Figura 4.8.</b> Eficiencia de extracción del CPME en la mezcla sintética IF-AZ con diferentes relaciones muestra: disolvente (0,1; 0,5; 1; 1,5). Condiciones experimentales: t agitación= 30 min; T= 25 °C; separación de fases: reposo durante la noche.....	117
<b>Figura 4.9.</b> (A) Energía de Gibbs y entalpía de exceso y (B) contribuciones de a la entalpía de exceso (VdW, EH, FE), para la mezcla equimolar soluto/CPME.....	118
<b>Figura 4.10.</b> Estudio de la recuperación del disolvente en tres ciclos para la mezcla sintética IF-AZ utilizando CPME como disolvente. Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 30 min; T= 25 °C; separación de fases: reposo durante la noche. ....	120
<b>Figura 4.11.</b> Efecto de la temperatura en la extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando agitador orbital: (A) contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) y contenido de flavonoides totales (TFC) y (B) cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 60 min; T extracción= 30 y 60 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.....	125
<b>Figura 4.12.</b> Efecto del tiempo de extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando agitador orbital: (A) contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) y contenido de flavonoides totales (TFC) y (B) cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 30, 60 y 90 min; T extracción= 60 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.....	127
<b>Figura 4.13.</b> Comparación de la extracción utilizando agitador orbital (EAO) y baño de ultrasonidos (EABU): (A) contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) y contenido de flavonoides totales (TFC) y (B) cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 30 min; T extracción= 60 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.....	128
<b>Figura 4.14.</b> Efecto del tiempo de extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando la sonda de ultrasonidos: (A) contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) y contenido de flavonoides totales (TFC) y (B) cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; P= 10 W; t extracción= 1,5; 3 y 6 min; T extracción≈ 60 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.....	130
<b>Figura 4.15.</b> Comparación de la extracción utilizando sonda de ultrasonidos (EASU) y microondas (EAM): (A) contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) y contenido de flavonoides totales (TFC) y (B) cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales:	

relación D:M= 10; t extracción= 1,5 min; T extracción= 60 y 100 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min..... 131

**Figura 4.16.** Efecto del tiempo de extracción de compuestos fenólicos de RSN mediante extracción asistida por microondas: (A) contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) y contenido de flavonoides totales (TFC) y (B) cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 1,5; 3 y 6 min; T extracción= 100 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min..... 133

**Figura 4.17.** Extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando disolventes eutécticos mediante extracción con agitador orbital: (A) contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y capacidad antioxidante (CA) y (B) cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 100 min; T extracción= 60 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min. .... 137

**Figura 4.18.** Extracto de RSN con Bet:1,2B (1:4) a 50 W. (A) Tiempo de extracción 3 min, extracto líquido, (B) tiempo de extracción 6 min, extracto gelificado, (C) tiempo de extracción 12 min, extracto quemado. .... 142

**Figura 4.19.** Cuantificación por HPLC de la optimización de la extracción asistida por ultrasonidos utilizando 70% EtOH y Bet:1,2B (1:4). Condiciones experimentales: relación D:M= 10; P= 10, 20, 50 W; t extracción= 3, 6, 9 min; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min. .... 142

**Figura 4.20.** Cuantificación por HPLC de la optimización de la extracción asistida por microondas utilizando 70% EtOH y Bet:1,2B (1:4). Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 3, 6, 9 min; T= 60, 100 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min. .... 144

**Figura 4.21.** Extracto de RSN con Bet:1,2B (1:4) utilizando extracción asistida por microondas. (A) Extracto a 60 °C a 3, 6 y 9 min (de izquierda a derecha), (B) Extracto a 100 °C a 3, 6 y 9 min (de izquierda a derecha). .... 145

**Figura 4.22.** Espectro de infrarrojos de DE Bet:1,2B (1:4): (A) tras someterlo a sonda de ultrasonidos durante 20 W y 6 min, (B) tras someterlo a microondas a 100 °C y 6 min, (C) puro. .... 146

**Figura 4.23.** Coeficientes de actividad a dilución infinita ( $\gamma$ ) de la hesperidina y la glucosa, y coeficiente de reparto octanol-agua a dilución infinita ( $K_{ow}$ ) de los biodisolventes estudiados. .... 148

**Figura 4.24.** Extracción de RSN utilizando biodisolventes (2MeTHF, CPME, EL, DMI, CYR, GVL) mediante extracción con agitador orbital (EAO), extracción asistida por sonda de ultrasonidos (EASU) y extracción asistida por microondas (EAM). (A) Contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y capacidad antioxidante (CA). (B) Cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD. (C) Cuantificación de azúcares mediante HPLC-RI. Condiciones experimentales: relación D:M= 10. EAO: t extracción= 30 min; T extracción= 60 °C, Agitación: 900 rpm. EASU: t extracción= 6min; P =10 W. EAM: t extracción= 6 min; T= 100 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min..... 150

**Figura 4.25.** Optimización con GVL como disolvente de la extracción asistida por sonda de ultrasonidos y microondas. Cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD y cuantificación de azúcares mediante HPLC-RI. Condiciones experimentales: relación D:M= 10. EASU: t extracción= 1,5; 3 y 6 min; P =10 y 20 W. EAM: t extracción= 1,5; 3; 6; 9 y 12 min; T= 60, 80 y 100 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min. .... 155

**Figura 4.26.** Optimización con EL como disolvente en la extracción asistida por sonda de ultrasonidos y microondas. Cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD y cuantificación de azúcares mediante HPLC-RI. Condiciones experimentales: relación D:M= 10. EAO. EASU: t extracción= 1,5; 3 y 6 min; P =10 y 20 W. EAM: t extracción= 1,5; 3; 6; 9 y 12 min; T= 60, 80 y 100 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min. .... 158

**Figura 4.27.** Valorización del RSN a través de una extracción en cascada. Etapa 1: Extracción asistida por sonda de ultrasonidos con GVL como disolvente. Etapa 2: extracción asistida por ultrasonidos empleando como disolvente EL. Condiciones experimentales Etapa 1 y 2: relación D:M= 10. EASU: t extracción= 6 min; P =10 W; t centrifugación (4200 rpm)= 10 min. .... 160

**Figura A.1.** Caracterización de los DE hidrófobos por <sup>1</sup>H-RMN (A) C8-C10, (B) C8-C12 y (C) C10-C12 en CDCl<sub>3</sub>..... 199



# Lista de Tablas

<b>Tabla 3.1.</b> Reactivos utilizados en los métodos de análisis, número CAS, pureza, proveedor y estructura molecular.....	69
<b>Tabla 3.1 (Continuación).</b> Reactivos utilizados en los métodos de análisis, número CAS, pureza, proveedor y estructura molecular. ....	70
<b>Tabla 3.2.</b> Compuestos objeto de estudio, número CAS, pureza, proveedor y estructura molecular. ....	70
<b>Tabla 3.3.</b> Reactivos utilizados para la formación de los disolventes eutécticos, número CAS, pureza, proveedor y estructura molecular. ....	72
<b>Tabla 3.4.</b> Disolventes moleculares utilizados, número CAS, pureza, proveedor y estructura molecular.....	73
<b>Tabla 3.5.</b> Equipos e instrumentos empleados durante la Tesis Doctoral, junto con sus características.....	74
<b>Tabla 3.6.</b> Disolventes eutécticos hidrófobos utilizados.....	77
<b>Tabla 3.7.</b> Disolventes eutécticos hidrófilos utilizados. ....	78
<b>Tabla 3.8.</b> Disoluciones acuosas estudiadas en la extracción líquido-líquido.....	81
<b>Tabla 3.9.</b> Disolventes y condiciones para cada tipo de muestra estudiadas en la extracción líquido-líquido.....	83
<b>Tabla 3.10.</b> Disolventes y condiciones estudiadas en la extracción sólido-líquido de RSN. ....	85
<b>Tabla 3.11.</b> Gradiente utilizado para la separación cromatográfica de los compuestos fenólicos. A: disolución acuosa de ácido acético al 2% (v/v); B: acetonitrilo. ....	89
<b>Tabla 3.12.</b> Gradiente utilizado para la separación cromatográfica de los inhibidores (furanos y compuestos fenólicos). A: disolución acuosa de ácido acético al 1,25% (v/v); B: acetonitrilo.....	90
<b>Tabla 3.13.</b> Gradiente utilizado para la separación cromatográfica de antioxidantes presentes en RSN. A: disolución acuosa de ácido acético al 1,25% (v/v); B: acetonitrilo.....	92

<b>Tabla 4.1.</b> Selectividad de los disolventes estudiados en la extracción de la muestra CF-GLU. Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 15 min; T= 25 °C; C <sub>o</sub> compuestos fenólicos= 500 mg/L; C <sub>o</sub> glucosa= 50 g/L.....	109
<b>Tabla 4.2.</b> Selectividad hacia la hesperidina de los disolventes estudiados.....	140
<b>Tabla 4.3.</b> Temperatura final y aspecto de los extractos durante la extracción asistida por sonda de ultrasonidos del RSN. ....	141
<b>Tabla 4.4.</b> Temperatura final en la optimización de la extracción con sonda de ultrasonidos empleando GVL. ....	156
<b>Tabla 4.5.</b> Temperatura final en la optimización de la extracción con sonda de ultrasonidos con EL. ....	159
<b>Tabla A.1.</b> Rectas de calibrado de los análisis espectrofotométricos.....	200
<b>Tabla A.2.</b> Rectas de calibrado de los métodos de HPLC (área del pico vs. concentración de las respectivas muestras estándar). ....	200
<b>Tabla A.3.</b> Comparación de la eficiencia de extracción de los DE hidrófobos (C8-C10, C8-C12, C10-C12) para las disoluciones simples de 100mg/L de fenol, o-cresol, guayacol, siríngol y vainillina. Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 15 min; T= 25 °C. ....	201
<b>Tabla A.4.</b> Eficiencia de extracción de los disolventes ensayados (C8-C10, C8-C12, C10-C12, 2MeTHF, CPME y LIM) a diferentes concentraciones iniciales de la mezcla multicomponente (50-CF, 100- CF, 250- CF y 500- CF). Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 15 min; T= 25 °C. ....	201
<b>Tabla A.5.</b> Eficiencia de extracción de los disolventes ensayados (C8-C10, C8-C12, C10-C12, 2MeTHF, CPME y LIM) a diferentes temperaturas (25, 40 y 60 °C) para la mezcla 500-CF. Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 15 min; C <sub>o</sub> = 500 mg/L.....	202
<b>Tabla A.6.</b> Eficiencia de la extracción de los disolventes ensayados (C8-C10, C8-C12, C10-C12, 2MeTHF, CPME y LIM) en la muestra CF-GLU. Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 15 min; T= 25 °C; C <sub>o</sub> compuestos fenólicos= 500 mg/L; C <sub>o</sub> glucosa= 50 g/L.....	202

<b>Tabla A.7.</b> Eficiencia de extracción del CPME en la mezcla sintética IF-AZ a diferentes tiempos de agitación. Condiciones experimentales: relación muestra: disolvente=1; t agitación= 5, 10, 15, 30 y 45 min; T= 25 °C. ....	203
<b>Tabla A.8.</b> Eficiencia de extracción del CPME en la mezcla sintética IF-AZ con diferentes relaciones muestra: disolvente. Condiciones experimentales: relación D:M=0,1; 0,5; 1; 1,5; t agitación= 30 min; T= 25 °C.....	203
<b>Tabla A.9.</b> Estudio de la recuperación del disolvente en tres ciclos para la mezcla sintética IF-AZ utilizando CPME como disolvente. Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 30 min; T= 25 °C. ....	204
<b>Tabla A.10.</b> Extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando agitador orbital. Análisis de los extractos: contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 30, 60 y 90 min; T extracción= 60 °C. ....	205
<b>Tabla A.11.</b> Extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando baño de ultrasonidos. Análisis de los extractos: contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 30min; T extracción= 60 °C. ....	206
<b>Tabla A.12.</b> Extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando sonda de ultrasonidos. Análisis de los extractos: contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; P= 10 W; t extracción= 1,5; 3 y 6 min; T extracción≈ 60 °C. ....	207
<b>Tabla A.13.</b> Extracción de compuestos fenólicos de RSN mediante extracción asistida por microondas. Análisis de los extractos: contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 1,5; 3 y 6 min; T extracción= 60 y 100 °C. ....	208
<b>Tabla A. 14.</b> Extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando disolventes eutécticos mediante extracción con agitador orbital: contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y capacidad antioxidante (CA). Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 100 min; T extracción= 60 °C.....	209

<b>Tabla A. 15.</b> Extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando disolventes eutécticos mediante extracción con agitador orbital: cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 100 min; T extracción= 60 °C.....	210
<b>Tabla A. 16.</b> Cuantificación por HPLC de la optimización de la extracción asistida por ultrasonidos utilizando 70% EtOH y Bet:1,2B (1:4) como disolventes. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; P= 10, 20, 50 W; t extracción= 3, 6, 9 min; T extracción ≈ 70 °C.....	211
<b>Tabla A. 17.</b> Cuantificación por HPLC de la optimización de la extracción asistida por microondas utilizando 70% EtOH y Bet:1,2B (1:4) como disolventes. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 3, 6, 9 min; T= 60, 100 °C.....	212
<b>Tabla A. 18.</b> Extracción de RSN utilizando biodisolventes (2MeTHF, CPME, EL, DMI, CYR, GVL) mediante extracción con agitador orbital (EAO), extracción asistida por sonda de ultrasonidos (EASU) y extracción asistida por microondas. Contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y capacidad antioxidante (CA). Condiciones experimentales: relación D:M= 10. EAO: t extracción= 30 min; T extracción= 60 °C, Agitación: 900 rpm. EASU: t extracción= 6min; P =10 W. EAM: t extracción= 6 min; T= 100 °C.....	213
<b>Tabla A. 19.</b> Extracción de RSN utilizando biodisolventes (2MeTHF, CPME, EL, DMI, CYR, GVL) mediante extracción con agitador orbital (EAO), extracción asistida por sonda de ultrasonidos (EASU) y extracción asistida por microondas (EAM). Cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD y cuantificación de azúcares mediante HPLC-RI. Condiciones experimentales: relación D:M= 10. EAO: t extracción= 30 min; T extracción= 60 °C, Agitación: 900 rpm. EASU: t extracción= 6min; P =10 W. EAM: t extracción= 6 min; T= 100 °C.....	214
<b>Tabla A. 20.</b> Optimización con GVL como disolvente de la extracción asistida por sonda de ultrasonidos y microondas. Cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD y cuantificación de azúcares mediante HPLC-RI. Condiciones experimentales: relación D:M= 10. EAO. EASU: t extracción= 1,5; 3 y 6 min; P =10 y 20 W. EAM: t extracción= 1,5; 3; 6; 9 y 12 min; T= 60, 80 y 100 °C.....	215
<b>Tabla A. 21.</b> Optimización con EL como disolvente de la extracción asistida por sonda de ultrasonidos y microondas. Cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD y cuantificación de azúcares mediante HPLC-RI. Condiciones experimentales: relación D:M= 10. EASU: t extracción= 1,5; 3 y 6 min; P =10 y 20 W. EAM: t extracción= 1,5; 3; 6; 9 y 12 min; T= 60, 80 y 100 °C. ....	216

**Tabla A. 22.** Valorización del RSN a través de extracción en cascada. Etapa 1: Extracción asistida por sonda de ultrasonidos con EL como disolvente. Etapa 2: extracción asistida por ultrasonidos con GVL como disolvente. Condiciones experimentales Etapa 1 y 2: relación D:M= 10. EASU: t extracción= 6 min; P =10 W..... 216



# Abreviaturas y Acrónimos

<b>1,2B</b>	1,2-Butanodiol
<b>1,2P</b>	1,2-Propanodiol
<b>1,3B</b>	1,3-Butanodiol
<b>2MeTHF</b>	2-Metiltetrahidrofurano
<b>4HBAld</b>	4-Hidroxibenzaldehido
<b>A4HB</b>	Ácido 4-hidroxibenzoico
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>AC</b>	Capacidad antioxidante (del inglés – <i>Antioxidant Capacity</i> )
<b>ACaf</b>	Ácido cafeico
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>AF</b>	Ácido <i>trans</i> -ferúlico
<b>AG</b>	Ácido gálico
<b>AP</b>	Ácido protocatecuico
<b>ApC</b>	Ácido <i>p</i> -cumárico
<b>AV</b>	Ácido Vanílico
<b>AZ</b>	Azúcares
<b>Bet</b>	Betaína
<b>C10</b>	Ácido decanoico
<b>C12</b>	Ácido dodecanoico
<b>C8</b>	Ácido octanoico
<b>CAT</b>	Catequina
<b>CF</b>	Compuestos fenólicos
<b>ChCl</b>	Cloruro de colina
<b>CPME</b>	Ciclopentil metil éter
<b>CYR</b>	Cyrene™ (dihidrolevogluosenona)

<b>D:M</b>	Disolvente: muestra
<b>DAD</b>	Detector de arreglo de diodos (del inglés - <i>Diode array detector</i> )
<b>DE</b>	Disolvente eutéctico
<b>DMI</b>	Dimetil isosorbida
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
<b>EA</b>	Acetato de etilo o etil acetato
<b>EABU</b>	Extracción asistida por baño de ultrasonidos
<b>EAM</b>	Extracción asistida por microondas
<b>EAO</b>	Extracción en agitador orbital
<b>EE</b>	Eficiencia de extracción
<b>EH</b>	Enlace de hidrógeno
<b>EL</b>	Lactato de etilo o etil lactato
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FC</b>	Folin & Ciocalteu
<b>FE</b>	Fenol
<b>FElec</b>	Fuerzas electrostáticas
<b>FF</b>	Furfural
<b>FRU</b>	Fructosa
<b>g</b>	Gramo
<b>GAE</b>	Ácido gálico equivalente (del inglés - <i>Gallic acid equivalent</i> )
<b>Gli</b>	Glicerol
<b>GLU</b>	Glucosa
<b>GUA</b>	Guayacol
<b>GVL</b>	$\gamma$ -Valerolactona
<b>HBA</b>	Aceptor de enlace de hidrógeno (del inglés - <i>Hydrogen bond acceptor</i> )
<b>HBD</b>	Dador de enlaces de hidrógeno (del inglés - <i>Hydrogen bond donor</i> )

<b>HESP</b>	Hesperidina
<b>5HMF</b>	5-Hidroximetilfurfural
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés - High Performance Liquid Chromatography)
<b>L</b>	Litro
<b>LIM</b>	Limoneno
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>N</b>	Normal
<b>NAR</b>	Naringina
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>oCRE</b>	o-cresol
<b>p/v</b>	Porcentaje peso a volumen
<b>Pro</b>	L-Prolina
<b>QE</b>	Quercetina equivalente
<b>QUER</b>	Quercetina
<b>RI</b>	Detector de índice de refracción (del inglés – <i>Refractive Index</i> )
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RSD</b>	Desviación estándar relativa (del inglés- <i>Relative standard deviation</i> )
<b>RSN</b>	Residuo sólido de naranja
<b>RUT</b>	Rutina
<b>SAC</b>	Sacarosa
<b>SIR</b>	Siringol
<b>TE</b>	Trolox equivalente
<b>TFC</b>	Contenido en flavonoides total (del inglés – <i>Total flavonoid content</i> )
<b>TPC</b>	Contenido en fenoles totales (del inglés – <i>Total phenolic content</i> )

<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-visible
<b>VAN</b>	Vainillina
<b>VdW</b>	Van der Waals

# 1. Introducción



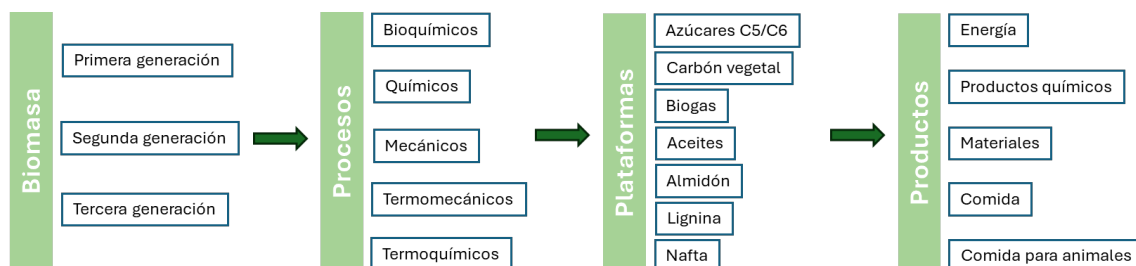
## 1.1. Biorrefinerías

Actualmente el sistema industrial depende en gran medida de los combustibles fósiles y de otros productos no renovables, siendo el petróleo la principal fuente de energía y productos químicos [1]. La dependencia de combustibles fósiles se ha convertido en un problema para sostener la población terrestre, ya que ésta se encuentra en constante aumento y genera una gran presión sobre la biocapacidad del planeta. Este crecimiento demográfico está provocando un rápido aumento en los gases de efecto invernadero emitidos a la atmósfera, como el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>) o los óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) procedentes de la combustión de petróleo, perturbando así el clima de la tierra [2]. Esto hace que el modelo actual de producción de bienes y servicios para la sociedad no sea sostenible, y en combinación con la disminución de los recursos petrolíferos, suscita preocupación medioambiental y política [1,3].

Por primera vez, el informe del 2023 de la Agencia Internacional de la Energía (IEA- por sus siglas en inglés *International Energy Agency*) prevé que el consumo de las tres categorías de combustible fósil (carbón, petróleo y gas natural) alcance un máximo para 2030 [4]. Esto se debe a los cambios en el sistema energético, donde las fuentes de energía renovable y los combustibles de bajas emisiones satisfacen cada vez más las necesidades energéticas. No obstante, la dependencia de los combustibles fósiles para fabricar productos químicos es aún muy elevada, donde este sector representa el 14 % de la demanda mundial primaria de petróleo y gas natural. Este consumo está relacionado tanto con procesos de calentamiento y gasto de energía, como del uso del petróleo como materia prima [5]. De este modo, la industria petroquímica no puede volverse sostenible únicamente a través del consumo de energía renovable; por ello, resulta necesario obtener nuevas materias primas sostenibles para descarbonizar la obtención de productos químicos [6].

Para reducir la dependencia del petróleo en los sectores de la energía y la industria química, se necesitan acciones combinadas, tanto cambios en el comportamiento de los consumidores como nuevos combustibles y tecnologías innovadoras [7]. Las biorrefinerías son una oportunidad en el marco de la bioeconomía emergente, ya que la biomasa ofrece grandes posibilidades para satisfacer un amplio espectro de necesidades de la sociedad [8]. Según la IEA (Bioenergy Task 42), una biorrefinería se define como una instalación que integra los procesos y el equipamiento de conversión sostenible de biomasa para producir una serie de productos comercializables (alimentos, piensos, productos químicos y materiales) y energía (combustible, energía y calor) [9,10]. El concepto de biorrefinería surge como un análogo a las refinerías de

petróleo, basándose en el fraccionamiento de la biomasa para la obtención de distintos productos con rendimientos y distribuciones variables, en función del origen de la materia prima y del interés económico del proceso [11]. Con el objetivo de tener una forma común de describir las biorrefinerías, se generó un sistema de clasificación basada en cuatro características principales: materia prima, procesos de conversión, plataformas intermedias y productos finales. En la **Figura 1.1** se resume el sistema de clasificación basado en los estudios de perspectivas de biorrefinerías de la Unión Europea para 2030 [12].



**Figura 1.1.** Esquema de los distintos sistemas de clasificación de las biorrefinerías.

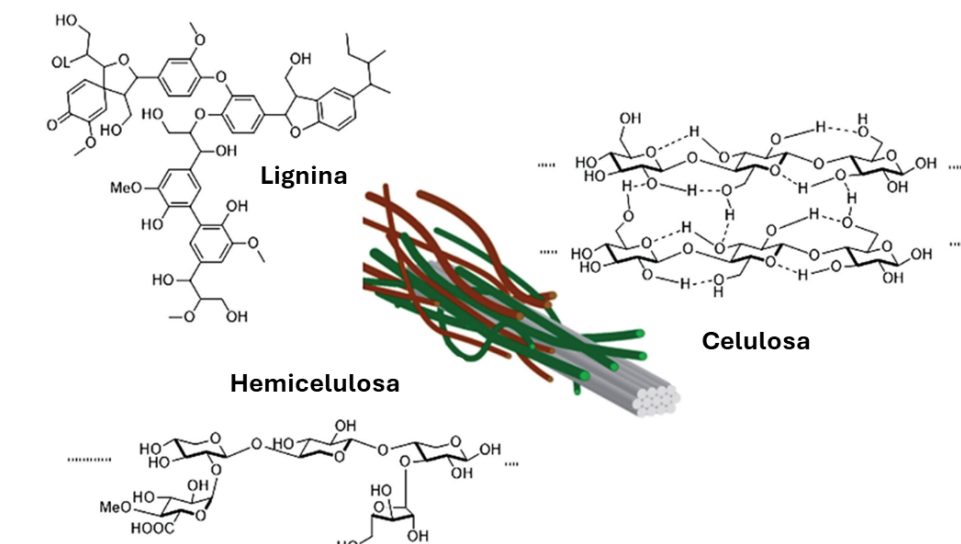
La biomasa se define como material vegetal de origen no geológico o un material derivado de éste, el cual podría utilizarse como materia prima para producir diversos productos útiles [13]. La biomasa ha sido utilizada tradicionalmente para la producción de energía en forma de calor, o como materia prima para la producción de bienes como puede ser el papel, fibras o biofuel. Sin embargo, la transición hacia una bioeconomía moderna plantea desafíos como la sostenibilidad de la biomasa, la eficiencia en su uso y la economía involucrada en su movilización [8,14].

Existen distintos tipos de biomasa y clasificaciones. La biomasa se puede clasificar en función del tipo de materia prima que se utilice para su producción [15]:

- Biomasa de primera generación: proviene de cultivos alimentarios como maíz y caña de azúcar, que son ricos en almidón y triglicéridos. Sin embargo, esta fuente presenta la desventaja de generar competencia con la producción de alimentos, lo que puede provocar un aumento en los precios y escasez de los mismos [16].
- Biomasa de segunda generación: la principal diferencia con la biomasa de primera generación es que no se produce con cultivos destinados a la alimentación, sino que se obtiene principalmente de residuos agrícolas, forestales o agroalimentarios.

- Biomasa de tercera generación: debido a su mayor contenido en lípidos y su habilidad de crecer sin necesidad de tierras destinadas a cultivos, se clasifica la biomasa derivada de algas en una generación diferente.

Dentro de la utilización de la biomasa como materia prima para la producción de bioproductos y bioenergía, el uso de residuos de biomasa lignocelulósica es una alternativa prometedora para evitar la competencia alimentaria [17–19]. La biomasa lignocelulósica está formada principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina (**Figura 1.2**) [20]. Por un lado, la celulosa y la hemicelulosa son polisacáridos que pueden ser hidrolizados en moléculas con un grado de polimerización relativamente bajo, facilitando su posterior utilización tanto en procesos biológicos como químicos [21]. Por otro lado, la lignina es un polímero fenólico utilizado en la industria para distintas aplicaciones [22,23].



**Figura 1.2.** Estructura química de la biomasa lignocelulósica, compuesta de lignina, celulosa y hemicelulosa [24].

Si bien gran parte de la biomasa de segunda generación es lignocelulósica (como la madera y los residuos agrícolas), no toda sigue este perfil. Algunos ejemplos de biomasa no lignocelulósica son [25]:

- Biomasa animal: incluye residuos de mataderos, estiércol y desechos orgánicos de humanos.
- Biomasa de alimentos: Los desechos de alimentos, como restos de frutas, verduras, cáscaras, granos, etc.

- Biomasa de residuos urbanos: Los desechos sólidos urbanos que contienen materia orgánica también se consideran biomasa.

Además, hay que destacar que en el mundo se generan anualmente 181.500 millones de toneladas de residuo de biomasa, principalmente procedentes de recursos desaprovechados como desechos agrícolas, forestales e industriales, de los cuales solo se valoriza un 3% [26,27].

Por otro lado, aproximadamente 1.600 millones de toneladas de alimentos se desperdician en la cadena de producción en forma de residuos, lo que ocasiona pérdidas económicas y representa una amenaza para el medio ambiente [28,29]. La cantidad de estos residuos aumenta cada día, siendo un problema su gestión y eliminación, ya que una gestión inadecuada de estos residuos supone riesgos para el medio ambiente, la salud y diferentes sectores sociales [30,31].

La biomasa puede convertirse en productos comercializables a través de distintas tecnologías, que según la IEA (Bioenergy Task 42) pueden dividirse en cuatro procesos principales [12]:

- Mecánicos: como pretratamiento, molienda, prensado, separación y destilación, que se utilizan para reducir el tamaño o la separación de los componentes de la materia prima sin producir cambios en la naturaleza química de estos.
- Químicos: hidrólisis, síntesis, hidrogenación, oxidación, etc.
- Termoquímicos: las materias primas se someten a temperaturas y/o presiones muy altas, como la gasificación o la pirólisis.
- Bioquímicos: procesos llevados a cabo por microorganismo o enzimas, como puede ser la fermentación, la digestión, etc.

A partir de estos procesos la biomasa se transforman en distintos intermedios químicos, producidos entre la biomasa de partida y los productos finales dentro de una biorrefinería, conocidos como plataformas. El concepto de plataformas es análogo al usado en la industria petroquímica, donde el petróleo en crudo se fracciona en distintos intermediarios conocidos como plataformas que se procesan para obtener los productos finales. Estas plataformas se utilizan para clasificar las biorrefinerías, ya que pueden alcanzarse a través de distintos procesos de conversión y distinta biomasa de partida [32]. Estas plataformas se transforman en una variedad de productos finales a través de procesos térmicos, biológicos, químicos, o una

combinación. Según el tipo de productos producidos, las biorrefinerías se clasifican en sistemas de biorrefinería impulsados por energía o por materiales [33].

El concepto de biorrefinería integrada se refiere a la instalación que combina múltiples tecnologías y procesos para maximizar la eficiencia. Este enfoque integrado está atrayendo mayor atención comercial, ya que la integración de los procesos permite una utilización eficiente de los recursos y minimiza la producción de residuos [34]. Sin embargo, en la actualidad, se están abordando los desafíos para hacer viables estas biorrefinerías, centrándose en la utilización eficiente de cada componente de la biomasa y en la optimización de la eficacia en procesos clave como el pretratamiento, la fermentación y la separación de productos, aspectos cruciales para alcanzar el objetivo [27,35].

En este sentido, esta Tesis Doctoral se centra en la optimización y mejora de los procesos de separación en el ámbito de las biorrefinerías, enfocándose en dos procesos diferenciados:

1. Extracción selectiva de inhibidores de la fermentación: se aplica extracción líquido-líquido para la detoxificación de corrientes de biorrefinerías ricas en azúcares, generadas durante los tratamientos de transformación de la biomasa, con el objetivo de mejorar los rendimientos en las etapas de fermentación.
2. Extracción de compuestos de alto valor añadido: valorización de residuos agroalimentarios como fuente de compuestos fenólicos de alto valor añadido con propiedades antioxidantes a través de la extracción sólido-líquido.

### **1.1.1. Extracción selectiva de inhibidores de la fermentación**

Existen diversas tecnologías para la transformación de la biomasa lignocelulósica en el contexto de las biorrefinerías, las cuales pueden clasificarse en tratamientos biológicos, químicos o termoquímicos, entre otros. Los procesos biológicos, que abarcan la hidrólisis ácida, la hidrólisis enzimática, la digestión anaeróbica y la fermentación, destacan por su mayor selectividad, aunque requieren un mayor tiempo de reacción. Por otra parte, los procesos termoquímicos, como la combustión, la gasificación, la torrefacción y la pirólisis, ofrecen una amplia variedad de productos complejos obtenidos en un corto período de reacción [36].

Por un lado, los tratamientos biológicos necesitan un pretratamiento para mejorar la valorización, ya que los polisacáridos presentes en la biomasa no son fácilmente accesibles [37]. La mayoría de los procesos de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, como el

pretratamiento ácido o alcalino, liberan compuestos inhibidores y desactivadores que influyen negativamente, por ejemplo, en la fermentación de azúcares para la producción de biocombustibles [38,39]. La concentración de inhibidores fenólicos liberados durante el pretratamiento de la biomasa depende de la biomasa, de las condiciones de pretratamiento y de la relación biomasa-agua [38].

Por otro lado, la pirólisis rápida es uno de los tratamientos termoquímicos más prometedores para la valorización de biomasa lignocelulósica. Este proceso implica la rápida degradación térmica de la biomasa a altas temperaturas (alrededor de 500 °C), en ausencia de oxígeno, dando lugar a la formación de carbón, aceite de pirólisis y gas de síntesis [40]. El aceite de pirólisis presenta un elevado contenido de azúcares, lo cual complica su valorización debido a que incrementa la formación de coque, eleva el consumo de hidrógeno y propicia la desactivación de los catalizadores [41,42]. Previamente, se ha demostrado que el lavado del aceite de pirólisis utilizando agua como disolvente, separa eficientemente los azúcares presentes en el aceite de pirólisis del resto de componentes no solubles, produciendo una solución rica en azúcar, que puede valorizarse mediante fermentación [41,43,44]. Sin embargo, diferentes compuestos fenólicos y otros inhibidores de la fermentación son arrastrados también a la fase acuosa (rica en azúcares) durante el lavado con agua, dificultando la posterior valorización de tales azúcares [45,46].

En función de su origen, los inhibidores presentes en este tipo de corrientes se pueden dividir en tres grandes grupos: ácidos débiles, derivados del furano y compuestos fenólicos [47]. La celulosa puede degradarse en hexosas, las cuales se deshidratan en 5-hidroximetil furfural; a su vez, este se deshidrata para formar ácido levulínico y ácido fórmico. [48,49]. Por otro lado, la hemicelulosa es el segundo polímero más abundante de la biomasa lignocelulósica. La hemicelulosa se degrada en azúcares, ácidos alifáticos y aldehídos de furano, pero el compuesto más abundante es el furfural. Además, la deshidratación del grupo acetilo de la hemicelulosa conduce a la formación de ácido acético [48,50]. Por último, la lignina se degrada en hidroxifenol, guayacol y siringol. La descomposición limitada en estos productos conlleva la formación de derivados fenólicos como ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, alcohol dihidroconiferílico, aldehído coniferílico, siringaldehído, ácido siríngico, entre otros [48,51].

El furfural y el 5-hidroximetil furfural ejercen un efecto inhibitorio en la mayoría de las levaduras encargadas de la fermentación de azúcares para producir etanol [52]. Estos compuestos afectan a los microorganismos al reducir su actividad enzimática, inducir la descomposición del ADN e

inhibir la síntesis de proteínas y ARN, lo que resulta en una disminución del rendimiento de la fermentación [53,54]. Sin embargo, los compuestos fenólicos son los inhibidores más tóxicos para los microorganismos responsables de la fermentación, ya que afectan no sólo al proceso de fermentación sino también al crecimiento microbiano [37,45,55]. Los compuestos fenólicos presentan una gran capacidad inhibitoria tanto en la hidrólisis enzimática como en la fermentación microbiana, incluso encontrándose a baja concentración [56]. Cuando los compuestos fenólicos tienen el mismo grupo funcional (aldehído, cetona, ácido), la inhibición depende de la cantidad de sustituyentes metoxilo, y por lo tanto de su hidrofobicidad [57]. La capacidad de inhibición de los compuestos fenólicos produce un mayor descenso en el consumo de glucosa por parte de los microorganismos y un descenso en el crecimiento celular, a bajas concentraciones, en comparación con otros inhibidores [58].

En resumen, la presencia de estos compuestos inhibidores puede disminuir el crecimiento microbiano y la producción de bioproductos, por lo que deben eliminarse para lograr una fermentación eficaz. Esto justifica la necesidad de incluir una etapa de detoxificación para eliminar los inhibidores de la fermentación, tanto en las corrientes producidas después del pretratamiento de la biomasa para la bioconversión como después del lavado con agua del aceite de pirólisis, con el objetivo de mejorar los rendimientos en la fermentación [44,59]. En bibliografía se han encontrado diferentes métodos de detoxificación como resinas de intercambio iónico [60,61], adsorción en carbón activo [61,62], detoxificación mediante tratamiento biológico [63], o extracción con aire [44,64]. Sin embargo, la extracción utilizando disolventes es uno de los métodos más estudiado para eliminar los inhibidores presentes en las corrientes ricas en azúcar, ya que es un método sencillo, eficaz y versátil [65–67]. Tradicionalmente, durante la extracción líquido-líquido se han utilizado compuestos orgánicos volátiles (COV), entre los cuales destacan los hidrocarburos aromáticos y alifáticos, fosfatos, acetatos, alcoholes, éteres y cetonas [68–70]. No obstante, el uso de grandes cantidades de estos COV supone un riesgo al ser tóxicos, inflamables y volátiles [71,72].

### **1.1.2. Extracción de compuestos de alto valor añadido**

La industria de frutas cítricas desempeña un papel significativo en la generación de residuos agroalimentarios. Anualmente, se producen más de 140 millones de toneladas de cítricos a nivel mundial, según recoge el informe de 2020 de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (en adelante FAO) [73]. En España, la producción anual de cítricos

supera los 6 millones de toneladas, situándose como el quinto productor a nivel mundial, después de México, India, Brasil y China.

De los cítricos producidos a nivel mundial, 76 millones corresponden a naranja (*Citrus Cinesis*) [73], de los cuales, aproximadamente el 30% se destina a procesos de transformación, generando hasta 20 millones de toneladas de residuos anualmente [74].

Tradicionalmente, la gestión de estos residuos ha implicado métodos como compostaje, producción de pienso e incineración o el vertido, entre otros. No obstante, estas técnicas convencionales conllevan elevados costes energéticos y económicos, además de provocar problemas sanitarios y generar impactos ambientales significativos [31,75,76]. En cuanto al compost, sus desventajas para aplicaciones a gran escala incluyen su bajo contenido en nitrógeno, la interacción de compuestos antimicrobianos con la microbiota del suelo y el riesgo potencial de contaminación del agua mediante la percolación [77]. Su uso para producir piensos para alimentación animal queda limitado debido al bajo pH, la falta de propiedades nutricionales y el elevado coste del transporte [78]. Por último, los beneficios ambientales y económicos de la incineración se ven obstaculizados por el alto contenido de humedad del sustrato, que requiere una gran cantidad de energía para la etapa de deshidratación [79].

Por lo tanto, para reducir los costes de gestión y prevenir impactos ambientales, en las últimas décadas se han examinado diversas aplicaciones para los residuos cítricos. La producción de bioproductos de alto valor añadido ha sido considerada como una estrategia de valorización en el marco de las biorrefinerías. Este enfoque no solo resulta económicamente viable, sino que también tiene el potencial de aumentar el valor añadido en la industria de procesado de cítricos [76].

Una de las estrategias más interesantes para la valoración integral del residuo sólido de naranja (RSN) es la implementación de una biorrefinería en cascada. Este esquema sigue la Directiva Marco de la Unión Europea de Residuos (2018/815), en la cual los residuos se emplean en procesos secuenciados para lograr el rendimiento óptimo en términos de productos y beneficios, dando prioridad a la extracción de biomoléculas de alto valor añadido y, después, a la producción de biocombustibles empleando la biomasa residual [80–82].

El RSN contienen una amplia variedad de compuestos de valor añadido, incluyendo azúcares fermentables, ácidos orgánicos, pectina, flavonoides, polifenoles, pigmentos y aceites esenciales como el D-limoneno, entre otros [83,84]. En este contexto, el RSN puede ser

empleado para la producción de pectina, flavonoides, colorantes naturales, productos nutracéuticos y compuestos fenólicos antioxidantes. En especial, los flavonoides y ácidos fenólicos están ganando interés, ya que presentan propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antimicrobianas, de protección cardiovascular y antioxidantes [70–72].

Los flavonoides son compuestos naturales con una estructura fenólica estable que presentan una gran actividad antioxidante y antirradical [88]. El interés por los flavonoides se debe a su amplia gama de propiedades, como su capacidad antioxidante y de eliminación de radicales o la protección frente a la radiación ultravioleta [88–90]. Al ser considerados como unas de las principales moléculas antioxidantes, los flavonoides presentan una amplia variedad de propiedades que los convierten en compuestos atractivos para la lucha contra diversas enfermedades, en particular, en los ámbitos quimioterapéuticos, quimiopreventivos y antiangiogénicos [91]. Los flavonoides se dividen en diferentes clases en función de su estructura: flavonas (por ejemplo: apigenina, luteolina, rutina), flavanonas (por ejemplo: hesperidina, naringina, hesperitina, naringenina), y flavonoles (por ejemplo: quercetina, kaempferol), isoflavonas y catequinas [88,89,92,93].

Los principales flavonoides presentes en la piel de naranja son la hesperidina, la naringina, la neohesperina, la narirutina, la rutina y la quercetina, siendo la hesperidina y la naringina los más abundantes [89,94,95]. En la piel de la naranja Navel, variedad de naranja más producida en España, la hesperidina destaca como el flavonoide más abundante, generando un notable interés debido a su uso eficaz como agente suplementario. Este compuesto exhibe efectos farmacéuticos con un potencial considerable como agente terapéutico para diversas enfermedades y trastornos [96,97].

Además, los ácidos fenólicos presentes en la piel de naranja, como el ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido *trans*-ferúlico, ácido cinámico y ácido *p*-cumárico, son también considerados moléculas bioactivas [85,86,91,98,99]. Estos ácidos fenólicos han atraído recientemente el interés debido a su potencial papel protector contra enfermedades de daño oxidativo como la cardiopatía coronaria, el ictus y diversos tipos de cáncer [91].

La valorización de estos compuestos se ve limitada por la complejidad en la extracción desde la materia prima de partida. Esto se debe a la diversidad estructural de los compuestos fenólicos, su inestabilidad frente a diversas condiciones de extracción y su capacidad para reaccionar con otros constituyentes de la matriz, debido a su actividad antioxidante [91,100,101].

La extracción convencional con disolventes ha sido ampliamente empleada para obtener bioproductos de matrices naturales. No obstante, este método tradicional presenta diversas desventajas, tales como la necesidad de utilizar altas temperaturas y tiempos prolongados de operación, que resultan en bajos rendimientos de extracción, un elevado consumo energético, riesgos de seguridad, preocupaciones ambientales y, además, una baja calidad en los extractos debido a la degradación por oxidación [100,102]. La selección del disolvente es fundamental en los procesos de extracción sólido-líquido para lograr altos rendimientos, por lo que es esencial considerar parámetros como la selectividad, la solubilidad, el coste y la seguridad del disolvente utilizado [103]. Históricamente, se han empleado disolventes orgánicos polares para este tipo de extracción; sin embargo, actualmente surge la necesidad de sustituirlos por opciones más sostenibles.

## 1.2. Química Verde

El uso de disolventes tradicionales, principalmente compuestos orgánicos volátiles (COV), se encuentra cada vez más restringido debido a los riesgos inherentes al manejo de grandes cantidades de este tipo de sustancias. En general, estos disolventes son tóxicos, inflamables, altamente volátiles, no son renovables y tienen origen petroquímico [71,72]. Debido a esto, existen diversas normativas que regulan el uso de este tipo de disolventes, buscando la protección de la salud humana y del medio ambiente. En Estados Unidos, la Agencia de Protección Ambiental (EPA- del inglés *Environmental Protection Agency*) regula el uso de disolventes orgánicos mediante normativas como el Acta de Aire Limpio (*Clean Air Act*) y el Acta de Residuos Peligrosos (*Resource Conservation and Recovery Act*). En la Unión Europea, la regulación REACH (Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas) también aborda el uso de disolventes y otros productos químicos. En España, el uso de disolventes orgánicos se rige por el Real Decreto 117/2003, de 31 de enero, sobre limitación de emisiones de COV debidas al uso de disolventes en determinadas actividades. Este tiene por objeto prevenir o reducir los efectos nocivos que para las personas y el medio ambiente pueden derivarse de algunas actividades que utilizan en sus procedimientos de fabricación o de trabajo disolventes orgánicos en cantidades importantes.

Por otro lado, en los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) descritos en la agenda 2030 de las Naciones Unidas, 14 de los 17 ODS exigen la aplicación adecuada de conceptos y modelos de la Química Verde [104]. La Química Verde es un concepto descrito como el diseño de productos y procesos químicos para reducir o eliminar el uso y la generación de sustancias peligrosas [105].

La Química Verde está dividida en 12 principios con directrices de diseño para ayudar a alcanzar los objetivos de sostenibilidad (**Figura 1.3**). A través de la Química Verde se consiguen beneficios tanto ambientales como sociales y económicos [106], ya que se limita el uso de productos químicos, y se reduce el almacenamiento y tratamiento de residuos y pagos compensatorios medioambientales por los daños causados [107]. La transformación a través de la Química Verde requiere de la integración de las mejores e innovadoras prácticas científicas, junto con un nuevo pensamiento sistémico, donde el diseño de sistemas se inicie a nivel molecular y genere un impacto positivo global, yendo más allá de la investigación en laboratorios y ampliando el enfoque hacia la industria y las comunidades, como una forma de responder a los actuales retos medioambientales, económicos y sociales [104,108].



**Figura 1.3.** Los 12 principios de la Química Verde.

Dos de los doce principios de la Química Verde, tienen una relación directa con la elección de disolvente en procesos de separación [109]:

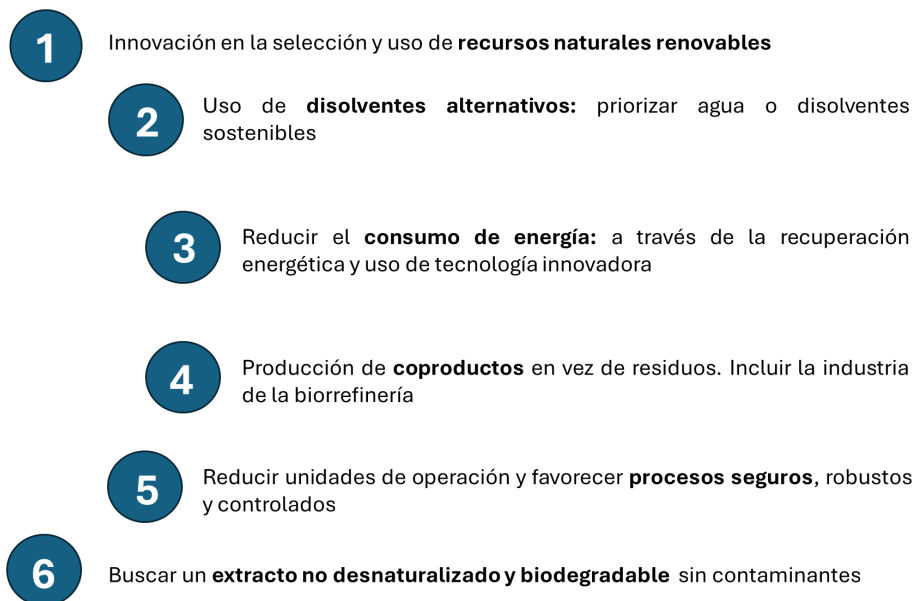
- Principio 3: En la medida de lo posible, los métodos deben ser concebidos para emplear y generar sustancias con una toxicidad mínima o nula para la salud humana y el medio ambiente.

- Principio 4: Se debe evitar el uso de sustancias auxiliares (como disolventes, agentes de separación, etc.) siempre que sea posible, y cuando su utilización sea indispensable, deben ser inocuas.

Además, la extracción tradicional con disolventes presenta diversos inconvenientes, entre ellos la necesidad de largos tiempos de extracción, lo que reduce los rendimientos y aumenta el consumo de energía. Esto tiene una relación directa con el principio 6 de la Química Verde:

- Principio 6: Los requisitos energéticos de los procesos químicos deben ser evaluados considerando sus impactos tanto medioambientales como económicos, buscando minimizarlos en la medida de lo posible. Preferiblemente, los procesos químicos deberían llevarse a cabo a temperatura y presión ambiente, siempre que sea factible.

A partir de los 12 principios de la Química Verde, surgen los 6 principios de la extracción sostenible (**Figura 1.4**). Este enfoque se fundamenta en el descubrimiento y diseño de procesos de extracción que minimizan el consumo de energía, emplean disolventes alternativos y productos renovables, asegurando la obtención de un producto final seguro y de alta calidad [110].



**Figura 1.4.** Los 6 principios de la extracción sostenible.

En este sentido, los disolventes derivados del petróleo deberían ser completamente sustituidos por disolventes más adecuados en términos de seguridad y sostenibilidad del proceso, de los trabajadores y del medio ambiente. Este cambio se alinea con los principios de la Química Verde

y la extracción sostenible, con el fin de garantizar una producción segura, rentable y la obtención de extractos de alta calidad [105,110–112].

Además, en la búsqueda de métodos de extracción más eficientes y respetuosos con el medio ambiente, se han explorado nuevas tecnologías como la extracción con fluidos supercríticos, la extracción con líquidos presurizados, la extracción asistida por ultrasonidos y la extracción asistida por microondas [100,102]. Estas tecnologías emergentes se presentan como alternativas viables y adecuadas a los métodos convencionales, destacando por su eficiencia y menor impacto ambiental [113].

### **1.3. Disolventes sostenibles**

Un disolvente sostenible se caracteriza por cumplir con criterios específicos relacionados con el medio ambiente y la salud, reduciendo al mínimo su impacto negativo en ambos. Además, debe ser económicamente viable [114]. El propósito es mantener un equilibrio en las tres dimensiones de las métricas de sostenibilidad: ecológica, económica y social. Existen distintos ejemplos de disolventes sostenibles, tales como los derivados de biomasa, aquellos diseñados para facilitar el aislamiento del producto y la preparación de la reacción, que pueden ser ajustados para optimizar los resultados o los que presentan un mínimo impacto ambiental [115].

Algunas características que se consideran para clasificar a un disolvente como sostenible incluyen [109]:

- Disponibilidad a gran escala.
- Propiedades (viscosidad, polaridad, densidad, etc.) y rendimientos similares a los de los disolventes tradicionales.
- Estables térmica y electroquímicamente.
- No inflamables.
- Disponibles en grado técnico, evitando así procesos de purificación que implican un alto consumo de energía.
- Reciclable a través de métodos ecoeficientes.

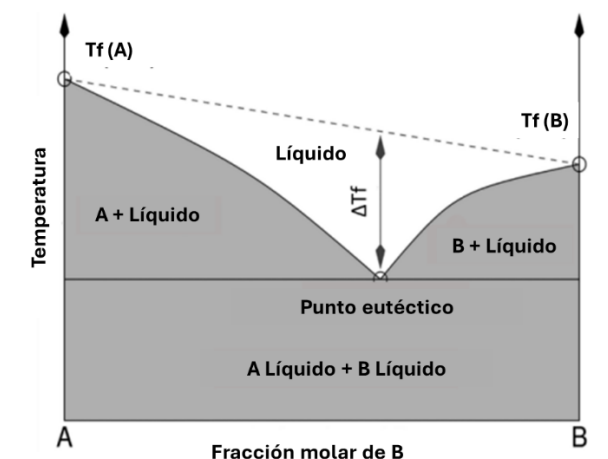
- Toxicidad mínima para reducir los riesgos durante su manipulación o liberación en la naturaleza.
- Fáciles de almacenar y transportar.
- Alta biodegradabilidad sin generar metabolitos tóxicos.
- Capaces de ser producidos mediante procesos de alta economía atómica y eficiencia energética.
- Obtenido a partir de materias primas renovables.
- Precios asequibles y competitivos en comparación con los disolventes tradicionales.

En los últimos años, han surgido distintos disolventes que cumplen la mayor parte o todas estas características, además de los principios de la Química Verde. Entre ellos, se encuentran los disolventes eutécticos (DE) y los biodisolventes, que pueden considerarse una alternativa prometedora para reemplazar a los disolventes convencionales debido a sus potenciales rendimientos, biocompatibilidad, baja toxicidad y reciclabilidad.

### 1.3.1. Disolventes eutécticos

Los disolventes eutécticos (DE) se forman principalmente a través de interacciones de enlace de hidrógeno entre un grupo aceptor de enlace de hidrógeno (HBA, del inglés *Hydrogen Bond Acceptor*) y un grupo donante de enlace de hidrógeno (HBD, del inglés *Hydrogen Bond Donor*). La mezcla de estos compuestos resulta en una mezcla líquida con un punto de fusión inferior al de los componentes individuales (**Figura 1.5**), muy posiblemente debido a la entropía de la mezcla y la deslocalización de carga causada por la formación de los enlaces de hidrógeno entre los componentes de los DE [116–118]. Además de enlaces de hidrógeno, también pueden surgir interacciones de Van der Waals y, ocasionalmente, fuerzas electrostáticas [119,120]. Por otro lado, dependiendo de los compuestos que lo conformen, también es posible la formación de enlaces de hidrógeno HBD-HBD, lo que genera estructuras aún más complejas [121].

Los DE muestran grandes ventajas sobre los disolventes tradicionales, ya que requieren de una fácil preparación, no necesitan purificación y sus propiedades pueden ajustarse modificando la estructura química, la composición y el ratio utilizado de los constituyentes de partida elegidos [122].



**Figura 1.5.** Diagrama de fases sólido-líquido típico de un disolvente eutéctico.

Como se representa en la **Figura 1.5**, al mezclar dos compuestos (A y B), se produce una depresión en el punto de fusión. Como se observa en el diagrama, no es necesario obtener la composición fija de la mezcla eutéctica para obtener una mezcla líquida, si no que se puede seleccionar un rango de composiciones para adaptar las características del DE a la aplicación prevista, obteniendo una mezcla en estado líquido y estable a temperatura ambiente [123]. Además, se pueden utilizar diferentes compuestos como HBA y HBD para preparar DE altamente selectivos, lo que combinado con su excelente capacidad disolvente, les proporciona un gran potencial para ser utilizados como medio de extracción [124,125]. Esto convierte a los DE en sustancias muy versátiles, ya que es posible ajustar sus propiedades mediante la elección de HBA y HBD específicos, así como el ratio en el que se combinan, ajustando propiedades como la conductividad, viscosidad, polaridad y las propiedades térmicas en función de la aplicación final que se le quiera dar al disolvente [116,126].

La mayoría de los estudios propuestos hasta el momento se centran en DE hidrófilos [118], lo que restringe sus aplicaciones a muestras acuosas o lipofílicas. Los primeros DE fueron reportados por Abbot *et al.* [127], quienes formaron una mezcla eutéctica combinando cloruro de colina con diferentes amidas como la urea. Esta combinación logró reducir significativamente la temperatura de fusión de los componentes originales, que eran de 302 °C y 133 °C, a solo 12 °C en la mezcla eutéctica. Desde entonces, se han reportado numerosos DE hidrófilos en bibliografía, habiendo un gran número de DE formados con compuestos que se encuentran de forma abundante en la naturaleza, denominados disolventes eutécticos naturales [128]. En la formación de estos DE naturales se utilizan habitualmente metabolitos vegetales como sales de amonio, azúcares o ácidos orgánicos [129].

En la formación de los DE naturales, los HBA comúnmente utilizados son sales de amonio cuaternario como el cloruro de colina y la betaína, terpenos como el DL-mentol o el aminoácido prolina. Por otro lado, como HBD más utilizados están los azúcares, alcoholes, ácidos carboxílicos o aminas [130–133]. En líneas generales, los DE que se generan al mezclar estos compuestos presentan características sumamente interesantes. Esto se debe principalmente a su versatilidad para ajustar las propiedades según el propósito específico, gracias a las numerosas variaciones estructurales disponibles, así como a la amplia disponibilidad y asequibilidad de los componentes iniciales [134,135]. Además, su capacidad de biodegradación, la baja presión de vapor, que limita las emisiones de gases a la atmósfera, y la escasa toxicidad de los compuestos comúnmente empleados hacen que estos disolventes sean respetuosos con el medioambiente, seguros y sostenibles [126,136,137].

Los DE hidrófilos presentan alta viscosidad, lo que podría dificultar los procesos de extracción al limitar la transferencia de materia. Este problema se puede abordar aumentando la temperatura o incorporando agua u otro disolvente a la mezcla eutéctica, lo que provocaría una disminución significativa de la viscosidad inicial del DE [138,139]. A su vez, las limitaciones a la hora de separar el disolvente del extracto pueden ser solventadas, ya que los DE naturales pueden aplicarse como tales en distintas industrias como en la alimentaria y cosmética [138].

Existen numerosas combinaciones para formar DE hidrófilos; en esta Tesis Doctoral se han estudiado aquellos formados con colina, prolina y betaína como HBA y distintos polialcoholes como HBD. Estos DE han sido utilizados con anterioridad en la extracción de biocompuestos de matrices sólidas naturales, como, por ejemplo, uva [140–143], olivo [144–146], cítricos [147,148], manzana [149], cacahuete [150] o café [151]. Los DE formados con cloruro de colina muestran una fuerte afinidad por los compuestos bioactivos debido a las interacciones por enlace de hidrógeno entre los solutos y el disolvente [140]. Recientemente, también se ha utilizado satisfactoriamente la betaína como HBA, la cual se obtiene como subproducto en la producción de azúcar a partir de recursos naturales, además de presentar alta biodegradabilidad y baja toxicidad [152,153]. Los DE formados con prolina, aminoácido cíclico no esencial, también están adquiriendo interés en la extracción de biocompuestos, como por ejemplo quercetina de las flores de árbol de *Sophora Japonica* (*Flos Sophorae*) [130,154,155].

Por otro lado, cabe destacar que los disolventes eutécticos hidrófobos han despertado un creciente interés debido a su capacidad para ampliar la gama de aplicaciones como la extracción líquido-líquido en entornos acuosos. En general, los DE hidrófobos presentan una serie de características favorables en comparación con los disolventes hidrófobos tradicionales. Los DE

hidrófobos muestran una presión de vapor despreciable, lo que evita la liberación de gases a la atmósfera [156]. Además, presentan una baja toxicidad, son biodegradables y pueden prepararse a partir de materiales renovables, aunque estas propiedades dependerán de los compuestos de partida elegidos [122,157]. Asimismo, sus propiedades fisicoquímicas pueden ajustarse modificando las estructuras del dador y aceptor de enlaces de hidrógeno, cambiando la proporción molar de estos componentes o añadiendo agua para saturarlos, llegando a solubilizar una amplia gama de analitos [158].

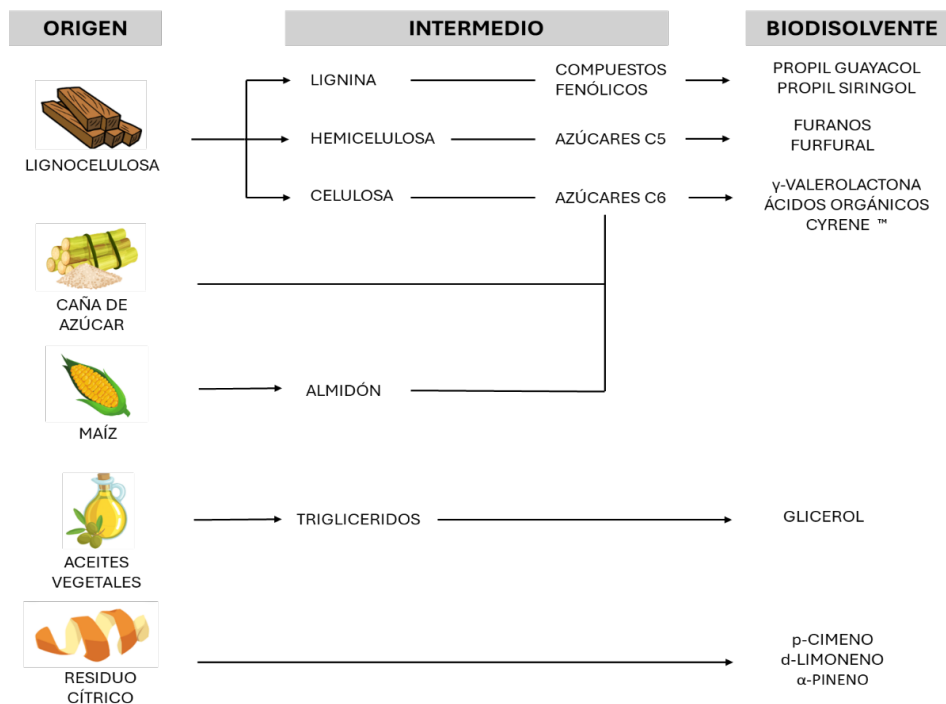
Los DE hidrófobos fueron introducidos por primera vez por Osch *et al.* [159] en 2015. Estos autores utilizaron DE formados a partir de ácido decanoico como HBD y una sal de amonio cuaternario como HBA, como agentes extractores de ácidos grasos volátiles. Desde entonces, se han llevado a cabo investigaciones en las que se han propuesto numerosos DE hidrófobos para la extracción de diferentes solutos [160,161], incluyendo la extracción de compuestos fenólicos de fases acuosas [158,162,163]. Por ejemplo, Ribeiro *et al.* [164] propusieron nuevos DE hidrófobos donde se sustituía las sales de amonio cuaternario por compuestos más naturales como el mentol.

En esta Tesis Doctoral se va a estudiar DE hidrófobos formados a partir de la mezcla binaria de distintos ácidos carboxílicos (ácido octanoico, ácido decanoico y ácido dodecanoico). Estos DE fueron presentados por Florindo *et al.* [33] en 2018, para utilizarlos en la extracción de Bisfenol-A en agua. Están formados a partir de la combinación de ácidos carboxílicos naturales, que pueden actuar tanto como donantes como aceptores de enlaces de hidrógeno. Los DE hidrófobos basados en ácidos carboxílicos muestran propiedades interesantes, ya que son inmiscibles con el agua pero presentan una baja viscosidad, lo que permite una transferencia de masa rápida y eficiente cuando las dos fases están en equilibrio [165].

### 1.3.2. Biodisolventes

Los biodisolventes son disolvente producidos a partir de fuentes renovables y sostenibles, como biomasa o recursos vegetales [131,166]. A diferencia de los disolventes convencionales, que a menudo se basan en derivados del petróleo, los biodisolventes están diseñados para ser más respetuosos con el medio ambiente y para reducir la dependencia de recursos no renovables. La biomasa con alto contenido en hidratos de carbono se utiliza como materia prima para obtener disolventes sostenibles o reactivos para producirlos [167]. En la **Figura 1.6** se muestran distintos ejemplos de biodisolventes en función de la biomasa de partida [129]. Estos

biodisolventes se obtienen mediante procesos de fermentación, enzimáticos o de esterificación [168].



**Figura 1.6.** Ejemplos de biodisolventes en función de la biomasa de origen.

Los biodisolventes se producen en biorrefinerías que buscan maximizar la recuperación y producción de productos de alto valor añadido, combinando métodos de conversión de biomasa para la producción de sustancias químicas con la obtención de combustibles y energía [169,170]. Los biodisolventes suelen ser menos tóxicos y más biodegradables que sus homólogos petroquímicos [163]. La literatura actual evidencia que, en ocasiones, los solventes de origen biológico exhiben resultados de reacción superiores en términos de selectividad, actividad catalítica, estabilidad y reutilización. Además, presentan ventajas en lo que respecta al aislamiento de los productos de reacción, un aspecto fundamental para la introducción exitosa de un nuevo disolvente [171].

Para considerar sostenibles a los disolventes producidos a partir de biomasa, es necesario evaluar factores como la superficie necesaria para producir la biomasa, la huella ecológica durante su producción, la fuente de biomasa y los requisitos para su transporte [172–174]. Es importante destacar que aunque algunos biodisolventes enfrentan desafíos similares a los disolventes tradicionales derivados del petróleo, el uso de un disolvente renovable contribuye significativamente a cumplir con las crecientes expectativas de los consumidores y con las normativas relacionadas con la sostenibilidad [175].

Los biodisolventes pueden clasificarse según distintos criterios, como el origen de la biomasa de partida utilizada para su producción, el disolvente homólogo derivado del petróleo que se quiere sustituir, según su grupos funcionales o según su afinidad por el agua [176]. En esta Tesis Doctoral, se han elegido los siguientes biodisolventes como objeto de estudio: 2-metiltetrahidrofurano (2MeTHF), ciclopentil metil éter (CPME), limoneno (LIM), etil lactato (EL), dimetil isosorbida (DMI), cyrene (CYR) y  $\gamma$ -valerolactona (GVL).

El 2MeTHF es un disolvente derivado de biomasa producido por hidrogenación catalítica de derivados de la biomasa, como el ácido levulínico o del furfural [177]. El 2MeTHF es una base de Lewis aprótica, notablemente estable, parcialmente soluble en agua, capaz de formar dos fases y fácilmente degradable [178,179]. Estas propiedades químicas hacen que el 2MeTHF sea adecuado para aplicaciones en síntesis, biotransformación y para el procesado de material lignocelulósico, no sólo en investigación sino también en laboratorios industriales [178,179]. El 2MeTHF presenta propiedades similares a las del hexano, como el punto de ebullición y el calor de evaporación, por lo que se ha propuesto como sustituto de este disolvente en diferentes procesos de extracción [180]. En bibliografía se puede encontrar ejemplos de su utilización en la extracción de compuestos naturales. Sicaire *et al.* [180] utilizaron 2MeTHF para extraer carotenoides de zanahorias y aceites de grosella negra, obteniendo resultados similares a los encontrados con hexano. Por otro lado, Smets *et al.* [181] compararon la capacidad de extracción del 2MeTHF y el hexano en la extracción de lípidos de larvas de mosca soldado negra, concluyendo que el este compuesto podía extraer significativamente más lípidos que el hexano. Asimismo, se ha demostrado con éxito la producción sostenible de biodiésel mediante la extracción mejorada de lípidos de microalgas utilizando 2MeTHF [182]. Además, el 2MeTHF también se ha propuesto como disolvente eficiente para la extracción de ácidos orgánicos a partir de soluciones acuosas diluidas [161,183]. En base a los resultados mostrados, el 2MeTHF parece muy prometedor como alternativa a los disolventes tradicionales derivados del petróleo.

El CPME se considera un biodisolvente, ya que puede obtenerse mediante la adición de metanol al ciclopenteno, el cual es un derivado del ácido adípico obtenido a partir de biomasa. Además, durante su producción no se generan residuos [184]. El uso de CPME como disolvente ha ganado especial atención debido a sus propiedades, ya que presenta alta hidrofobicidad, baja toxicidad, estabilidad tanto en ambientes básicos como ácidos y baja energía de volatilización, con un punto de ebullición de 106 °C [179,185,186]. Hasta la fecha, se ha utilizado en síntesis orgánica y como disolvente de extracción [185]. Por ejemplo, de Jesus *et al.* [187] compararon hexano, CPME y 2MeTHF en la purificación de biodiesel mediante extracción líquido-líquido, obteniendo

biodiesel con pureza similar cuando se utiliza CPME y hexano. Además, el CPME también se ha reportado como un disolvente eficaz para la valorización de residuos de cítricos mediante la extracción de limoneno [188].

El LIM es un hidrocarburo monoterpénico que se encuentra en las cáscaras de los cítricos como componente principal del aceite esencial, que se obtiene por destilación y condensación de los subproductos de la industria de los cítricos [189,190]. El LIM ha sido reportado como sustituto de disolventes tradicionales como el hexano y los hidrocarburos halogenados, ya que presenta una constante dieléctrica similar [191,192]. El interés por este compuesto surgió debido a las cualidades desengrasantes que presenta, aunque su principal inconveniente es su recuperación por evaporación debido a su alto punto de ebullición (175 °C) [189]. Sin embargo, el LIM ha recibido cada vez más atención como disolvente sostenible para extraer subproductos. Por ejemplo, Chemat *et al.* [193] estudiaron la recuperación del licopeno de la piel del tomate comparando el LIM y el diclorometano como disolventes, y concluyendo que el LIM es un disolvente eficaz.

El lactato de etilo, o etil lactato (EL), se encuentra de forma natural en pequeñas cantidades en algunos alimentos, pero se produce industrialmente a partir de materias renovables mediante la esterificación del ácido láctico con etanol [194]. Este compuesto es biodegradable, reciclable, no corrosivo y no cancerígeno, y está aprobado su uso en productos alimentarios [195]. Se trata de un disolvente prótico polar de alto punto de ebullición, que posee una excelente miscibilidad en medios acuosos (polares) e hidrocarbonados (apolares). Estas propiedades le confieren un notable poder para recuperar compuestos que abarcan un extenso rango de polaridades [195,196]. Por ejemplo, Castillo *et al.* [197] estudiaron la obtención de compuestos fenólicos a partir de uva blanca empleando EL y etanol como disolventes. Los resultados indicaron una mayor eficiencia de extracción al utilizar el biodisolvente EL.

La DMI se produce mediante la reacción de la isosorbida y el carbonato de dimetilo, ambos de compuestos de partida renovables [198]. Debido a su alto punto de ebullición (246 °C), la DMI es una alternativa adecuada a los disolventes más tóxicos utilizados actualmente, como el dimetilsulfóxido, la dimetilformamida o la dimetilacetamida [199]. El interés por la DMI ha aumentado recientemente para diferentes aplicaciones, como aditivos farmacéuticos o cosméticos [200].

El dihidrolevoglucosenona, denominado comercialmente como Cyrene (CYR), es un solvente sostenible obtenido mediante la hidrogenación catalítica de la levoglucosenona, la cual se

genera a partir de la pirólisis de la celulosa [201]. El CYR es un disolvente aprótico dipolar y exhibe una destacada miscibilidad tanto con agua como con disolventes orgánicos. Además de su eficacia, el CYR destaca por su perfil de seguridad, ya que no es tóxico ni mutagénico. Su elevado punto de inflamación y su baja volatilidad contribuyen a minimizar los riesgos asociados a su uso [201,202].

El disolvente GVL es producido por la hidrogenación del ácido levulínico derivado de la biomasa, y se considera una opción prometedora en el ámbito de los solventes renovables [203,204]. El GVL es un disolvente aprótico polar estable, totalmente miscible en agua, con baja volatilidad, alto punto de ebullición (197 °C) y alta biodegradabilidad [205]. Además, este disolvente posee una baja toxicidad para los seres humanos, lo que lo convierte en una alternativa más segura en comparación con los disolventes orgánicos convencionales [205].

Los biodisolventes como DMI, CYR y GVL, al ser disolventes polares fuertes con altos puntos de ebullición, están captando un interés creciente en los campos de la química orgánica, farmacéutica y la síntesis de polímeros. Se consideran alternativas prometedoras al dimetilsulfóxido (DMSO), la dimetilformamida (DMF) y la dimetilacetamida (DMAc), que son ampliamente reconocidos por su excepcional polaridad y capacidad para disolver una amplia variedad de sustratos [206,207]. También se ha encontrado en bibliografía como el uso de estos biodisolventes está captando interés para la extracción de compuestos naturales de alto valor añadido, en concreto en la extracción de compuestos fenólicos de uva y kiwi [208,209].

### 1.3.3. Herramientas computacionales

El uso de herramientas computacionales puede facilitar la selección del disolvente antes de la extracción y ayudar a entender las interacciones soluto-disolvente. A lo largo de este trabajo se utiliza el método COSMO-RS (COnductor-like Screening MOdel for Real Solvents) como herramienta para analizar las interacciones entre los solutos de interés y los disolventes eutécticos y los biodisolventes.

El método COSMO-RS es una herramienta predictiva de química cuántica creada por Klamt y colaboradores [210] con el propósito de predecir el potencial químico en líquidos [211]. Esta herramienta se fundamenta en el método de solvatación continua COSMO, el cual describe una molécula en solución como una molécula aislada en una cavidad de un disolvente [212,213]. COSMO-RS calcula la polaridad de la densidad de carga ( $\sigma$ ) en la superficie molecular [214]. A continuación, la superficie de carga polarizada se descompone en diferentes segmentos, los

cuales se visualizan en un histograma llamado perfil  $\sigma$ . A partir de este perfil  $\sigma$ , se puede calcular el potencial químico de cada segmento, que describe la afinidad del sistema hacia un segmento polarizado específico. Finalmente, utilizando el potencial  $\sigma$  y relaciones termodinámicas, es posible determinar el potencial químico de un soluto en un disolvente, lo que permite calcular los coeficientes de actividad.

Cabe destacar que el método COSMO-RS permite predecir el comportamiento termodinámico de mezclas fluidas sin necesidad de disponer de datos experimentales, pues tan sólo se requiere conocer la estructura molecular de los compuestos que intervienen en el proceso. En este sentido, se presenta como una herramienta versátil y eficaz para preseleccionar disolventes sostenibles en operaciones de extracción y explicar las interacciones soluto-disolvente que dominan el proceso [129].

En bibliografía se encuentran ejemplos del empleo de COSMO-RS en procesos de extracción utilizando disolventes sostenibles. Ozturk *et al.* [147] estudiaron la extracción de limoneno de residuos sólidos de naranja utilizando COSMO-RS para estimar la solubilidad del limoneno en distintos disolventes. Ozturk y González-Miquel [215] estudiaron con COSMO-RS el equilibrio líquido-líquido, los coeficientes de distribución y la selectividad en la extracción de aceites esenciales del residuo sólido de naranja utilizando DE como disolventes. López-Porfiri *et al.* [161] evaluaron mediante análisis de COSMO-RS distintos disolventes sostenibles, como líquidos iónicos, disolventes eutécticos y biodisolventes, para la recuperación de ácidos orgánicos. Por otro lado, González *et al.* [216] utilizaron COSMO-RS para estudiar la interacción entre disolventes sostenibles (líquidos iónicos formados con imidazolio y pirrolidinio) con distintos compuestos fenólicos.

## 1.4. Técnicas de extracción

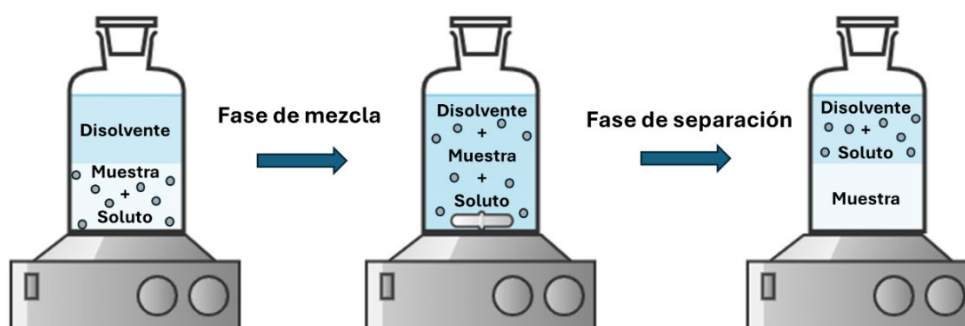
Un proceso de extracción se define como la separación selectiva de componentes de una mezcla, que de forma general implica el uso de un disolvente para solubilizar y separar los compuestos de interés de otros materiales [217]. Para entender cómo funciona cualquier proceso de extracción hay tener en cuenta las propiedades químicas tanto del soluto como del disolvente. Las interacciones soluto-disolvente vienen determinadas por la presión de vapor del soluto, la solubilidad del soluto en ambas fases, así como también por la hidrofobicidad, la densidad, la viscosidad y las propiedades ácido/base tanto del soluto como del disolvente [218].

A continuación, se indican las consideraciones fundamentales a tener en cuenta en cualquier proceso de extracción [218]:

- Alto rendimiento: se busca la recuperación completa o casi completa de los compuestos objetivo.
- Alta selectividad/pureza: el objetivo es obtener un extracto con una mínima presencia de compuestos interferentes o indeseables, garantizando así una pureza y selectividad elevadas en los productos obtenidos.

La presente Tesis Doctoral se enfoca en procesos de extracción, siguiendo los fundamentos de la Química Verde y empleando disolventes sostenibles. Por un lado, se profundiza en la técnica de extracción líquido-líquido con el objetivo de lograr la extracción selectiva de inhibidores de la fermentación presentes en medios acuosos. Por otro lado, se investiga la extracción sólido-líquido para la valorización del residuo sólido de naranja (RSN) mediante la extracción de antioxidantes.

La extracción líquido-líquido es un proceso de separación que consiste en la transferencia de un soluto de un disolvente a otro, siendo los dos inmiscibles o parcialmente inmiscibles entre sí, con la capacidad de formar dos fases. La separación se produce mediante transferencia de materia desde la muestra líquida que contiene el soluto hacia el disolvente, donde el soluto es más soluble. El proceso de extracción líquido-líquido comprende una etapa de mezcla, seguida de una etapa de separación de fases (**Figura 1.7**), por lo que es importante considerar ambas etapas en la elección del disolvente, pues aunque una mezcla vigorosa favorece la transferencia de materia, también puede dificultar la separación al formar emulsiones [217].

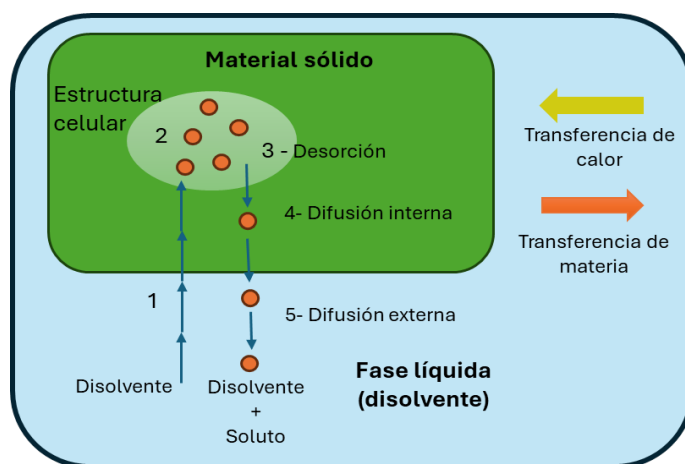


**Figura 1.7.** Esquema del proceso de extracción líquido-líquido.

Por otro lado, la extracción sólido-líquido es un proceso de separación que implica la transferencia de uno o más componentes de una muestra sólida hacia un disolvente líquido

[217]. El proceso de extracción se representa esquemáticamente en la **Figura 1.8** y sigue los siguientes pasos [218]:

- El disolvente impregna la superficie sólida.
- El disolvente penetra la matriz sólida por difusión molecular.
- El soluto se solubiliza por desorción de la matriz sólida (puede ser necesaria la rotura de enlaces químicos para la desorción del soluto de la matriz sólida).
- La disolución que contiene el soluto vuelve a la superficie del sólido por difusión molecular.
- La disolución se transfiere del sólido por difusión molecular.



**Figura 1.8.** Esquema del proceso de extracción sólido-líquido convencional.

En la extracción sólido-líquido hay que tener en cuenta que los solutos no suelen estar libremente disponibles, sino que interactúan con otros componentes de la materia prima. Por lo tanto, es necesario romper las interacciones intermoleculares que se establecen entre el soluto y la materia prima antes de que se puedan establecer nuevas interacciones soluto-disolvente [218].

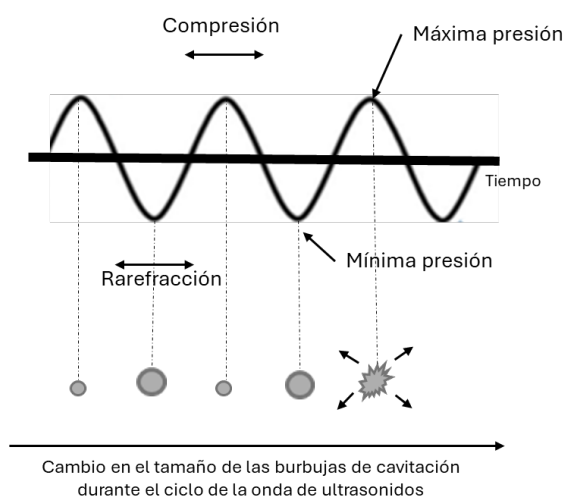
La extracción convencional con disolventes se ha empleado ampliamente para la recuperación de bioproductos de matrices naturales [100]. Con el objetivo de optimizar tanto el tiempo como el coste asociado a la extracción convencional, así como de reducir el consumo de energía, se han explorado métodos de extracción más sostenibles. En el desarrollo de métodos de extracción más eficientes y respetuosos con el medio ambiente, se han explorado nuevas

tecnologías como la extracción con fluidos supercríticos, la extracción con líquidos a presión, la extracción asistida por ultrasonidos y la extracción asistida por microondas, como alternativas adecuadas a las tecnologías convencionales [113]. En esta Tesis Doctoral, se va a estudiar la extracción asistida por ultrasonidos y por microondas, ya que han demostrado ser efectivas en la obtención de bioproductos, como compuestos fenólicos, carotenoides, aromas o polisacáridos, a partir de matrices de biomasa [219,220].

### 1.4.1. Extracción asistida por ultrasonidos

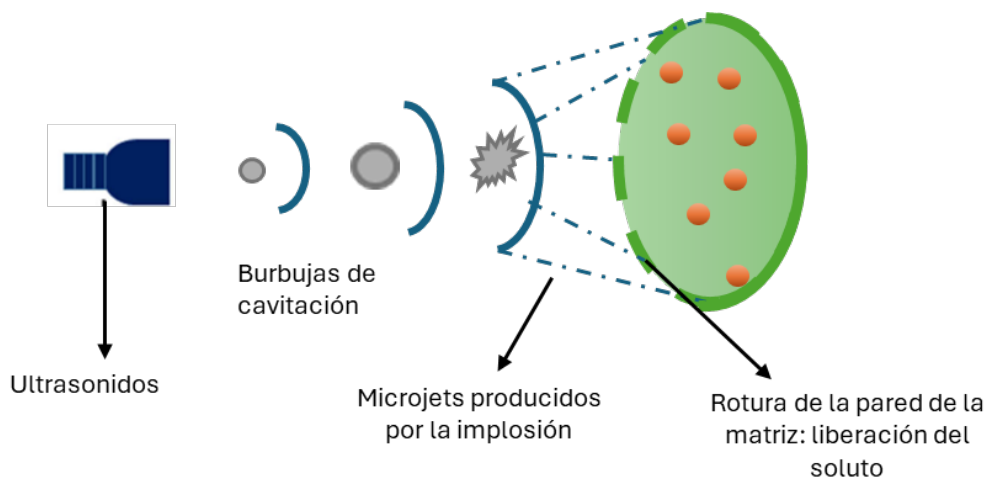
La extracción asistida por ultrasonidos es una técnica emergente y respetuosa con el medioambiente que mejora la eficiencia de extracción a la vez que reduce el consumo de energía y disolvente, y disminuye los tiempos de extracción [221].

Los ultrasonidos son transmitidos en el medio en forma de una onda de presión, generando una vibración con dos fases alternativas: la compresión y la rarefacción (**Figura 1.9**) [222]. La fase de compresión se da con el máximo de presión, mientras que la fase de rarefacción se da con presión mínima. En la fase de compresión las moléculas se acercan debido a la alta presión, mientras que en la fase de rarefacción la distancia entre moléculas aumenta. En la rarefacción, la presión negativa predomina sobre la fuerza de atracción de las moléculas causando cavidades en el líquido, formando las burbujas de cavitación [221]. Cuando la potencia es suficientemente elevada, estas burbujas, distribuidas por todo el líquido, experimentan un crecimiento durante unos pocos ciclos hasta alcanzar un tamaño en el que se vuelven inestables y colapsan de manera violenta [222,223]. Durante el colapso, la temperatura aumenta en el rango de 4000-5000 °C y la presión alcanza más de 1000 atm dentro de la burbuja [224,225].



**Figura 1.9.** Esquema de la onda de ultrasonidos y la variación de las burbujas de cavitación.

La implosión de las burbujas de cavitación provoca fragmentación de la matriz, poros localizados, y fuerza de cizallamiento en la célula del material de la muestra (**Figura 1.10**). Esto facilita la desintegración de la pared celular y la liberación de los componentes celulares al disolvente debido a la mayor superficie de contacto y la reducción del tamaño de las partículas [219]. Además, el colapso de las burbujas de cavitación conduce a una mejor disrupción celular a través de la formación de micro jets, debido al colapso asimétrico de las burbujas cerca de una superficie sólida [226,227].



**Figura 1.10.** Esquema de la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos.

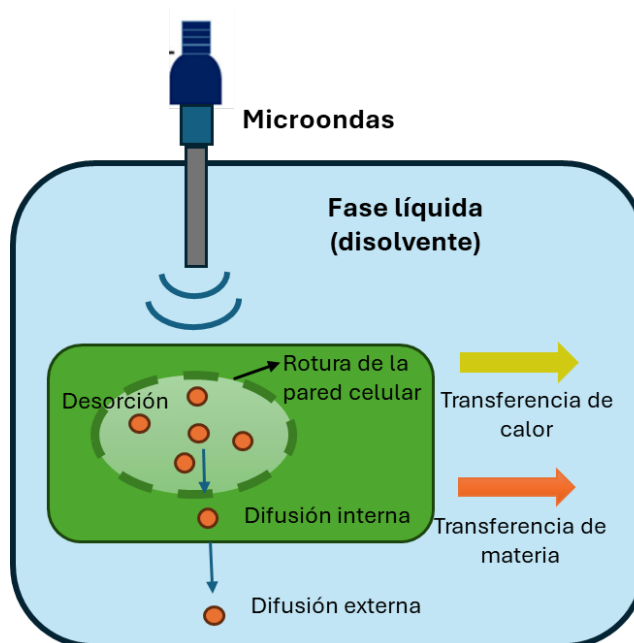
Por lo tanto, los ultrasonidos aceleran la extracción al permitir una mayor tasa de difusión del disolvente en la matriz debido a la rotura de la membrana celular. Las burbujas de cavitación provocan la rotura de la membrana celular permitiendo una mayor velocidad de difusión del disolvente en la matriz, mejorando la transferencia de masa y liberando compuestos bioactivos [228,229]. Además, estudios previos han demostrado que el uso de ultrasonidos como tecnología de extracción mejora la capacidad antioxidante de los extractos [230,231].

#### 1.4.2. Extracción asistida por microondas

La extracción asistida por microondas es una técnica que mejora los rendimientos de extracción a la vez que reduce el volumen de disolvente necesario y disminuye el tiempo de extracción [232]. Durante la extracción con microondas la muestra se calienta de una forma localizada y selectiva, donde apenas se produce pérdida de calor, por lo que es eficiente energéticamente [233].

Las microondas son ondas electromagnéticas no ionizantes, formadas por dos campos oscilantes perpendiculares, el eléctrico y el magnético, siendo el primero el encargado del calentamiento [233,234]. El principio de calentamiento de la energía microondas se fundamenta en la capacidad de las ondas microondas para interactuar con las moléculas polares y se rige por dos fenómenos: la conducción iónica y la rotación dipolar, que suele darse simultáneamente [235,236]. La conducción iónica tiene lugar al aplicar un campo electromagnético, lo que provoca la migración electroforética de los iones. La resistencia a este flujo iónico genera fricción, y como consecuencia, se produce el calentamiento del sistema. Por otro lado, la rotación dipolar se produce cuando se alinean los dipolos al aplicarse un campo electromagnético. Normalmente, los dipolos se alinean  $5 \times 10^9$  veces por segundo, y este movimiento molecular da como resultado el calentamiento de la muestra [235].

La interacción de la radiación microondas con el disolvente, el agua intracelular y los iones presentes favorece la conducción iónica y la rotación dipolar, incrementando la temperatura desde el interior de la matriz [237]. Este aumento térmico resulta en un aumento de la presión intracelular, ocasionando la rotura de la pared celular y las membranas. Este proceso altera las propiedades físicas del tejido celular, aumenta la porosidad y facilita el paso del soluto al disolvente [87].



**Figura 1.11.** Esquema de la extracción sólido-líquido asistida por microondas.

A diferencia de la extracción convencional, en la extracción asistida por microondas el gradiente de transferencia de materia y de transmisión de calor trabajan en la misma dirección desde el

interior hacia el exterior celular (**Figura 1.8**) [237,238]. Este alineamiento facilita significativamente el proceso de extracción, incrementando los rendimientos, al mismo tiempo que se reduce la duración del proceso [113].

## 2. Objetivos



Las hipótesis de partida en las que se sustentan los objetivos de esta Tesis Doctoral se exponen a continuación:

- a) La viabilidad de las biorrefinerías depende de la mejora y optimización de los procesos de pretratamiento, fermentación y separación.
- b) Para la valorización de corrientes ricas en azúcares a través de la fermentación es necesario realizar un proceso de detoxificación, que puede llevarse a cabo a través de una extracción selectiva líquido-líquido.
- c) Para que la valorización de residuos agroalimentarios sea viable es necesario el aprovechamiento integral del residuo, priorizando la extracción de biomoléculas de alto valor añadido.
- d) Los métodos tradicionales de extracción llevan asociados el uso de disolventes de origen fósil, que son tóxicos, volátiles, de carácter no renovables y poco respetuosos con el medio ambiente.
- e) Los ODS de la agenda 2030 y los principios de la Química Verde, manifiestan la necesidad de desarrollar nuevos procesos de extracción más sostenibles, utilizando disolventes más benignos con el medio ambiente y la salud, a la vez que técnicas con mayor eficiencia energética.

Tomando como referencia todo lo anterior, la finalidad principal de esta Tesis Doctoral es doble; en primer lugar, busca incrementar la sostenibilidad de los procesos de extracción en las biorrefinerías utilizando disolventes sostenibles y técnicas de extracción asistida; en segundo lugar, aspira a impulsar la bioeconomía circular, a través de la recuperación de compuestos antioxidantes de alto valor añadido. Con este propósito, la investigación se enfocará en aplicar los principios de la Química Verde por medio del empleo de disolventes sostenibles y técnicas avanzadas de extracción, abordando específicamente dos procesos de extracción diferenciados:

1. Extracción selectiva de inhibidores de la fermentación: se aplica extracción líquido-líquido para la detoxificación de corrientes de biorrefinerías ricas en azúcares, generadas durante los tratamientos de transformación de la biomasa, con el objetivo de mejorar los rendimientos de la fermentación.
2. Extracción de compuestos de alto valor añadido: valorización de residuos agroalimentarios como fuente de compuestos fenólicos de alto valor añadido con propiedades antioxidantes a través de la extracción sólido-líquido.

En esta Tesis Doctoral se proponen dos tipos de disolventes sostenibles como alternativa a los disolventes tradicionales: los disolventes eutécticos y los biodisolventes. Además, se estudia el uso de dos técnicas de extracción asistida (extracción asistida por microondas y con ultrasonidos), como tecnologías alternativas a la extracción convencional.

Estos objetivos generales se pretenden lograr mediante la consecución de los siguientes objetivos específicos, los cuales conforman esta Tesis Doctoral:

- **Objetivo 1: Búsqueda bibliográfica y estado del arte.**

Recopilación completa de la información y estado del arte de la temática objeto de estudio. Búsqueda de información sobre biorrefinerías, residuos lignocelulósicos y agroalimentarios, el concepto de Química Verde, disolventes sostenibles, técnicas de extracción, procesos de detoxificación y compuestos antioxidantes.

- **Objetivo 2: Identificación de los compuestos de interés.**

Eliminación de contaminantes: identificación de corrientes de biorrefinerías con presencia de contaminantes inhibidores de la fermentación (furanos, compuestos fenólicos), para poder estudiar su eliminación y mejorar el proceso.

Valorización de biomasa: identificación de matrices naturales donde estén presentes compuestos fenólicos de alto valor añadido, que tengan interés en el mercado global por la demanda de estos compuestos por distintas industrias. En concreto, se evaluará la extracción de antioxidantes para valorizar el residuo sólido de la industria de la naranja.

- **Objetivo 3: Selección de disolventes.**

Selección de disolventes sostenibles (disolventes eutécticos y biodisolventes) mediante pruebas experimentales y evaluaciones computacionales con el software COSMO-RS. Para ello, se evaluará el efecto de la estructura del disolvente en la extracción de las moléculas de interés, teniendo en cuenta la solubilidad, los coeficientes de distribución y la selectividad entre las fases.

- **Objetivo 4: Extracción de los compuestos de interés.**

Realización de ensayos de extracción líquido-líquido y sólido-líquido de los compuestos de interés con los disolventes seleccionados, optimizando las condiciones del proceso (tiempo,

temperatura, ratio alimentación: disolvente). Los ensayos se llevarán a cabo empleando matrices líquidas y sólidas representativas de los procesos de biorrefinería.

Realización de estudios de la selectividad de los disolventes elegidos para los compuestos de interés frente al resto de compuestos presentes en la muestra. Por ejemplo, se estudiará la eliminación selectiva de los compuestos fenólicos frente a los azúcares presentes en corrientes de biorrefinería para mejorar la fermentación.

- **Objetivo 5: Intensificación de la extracción.**

Intensificación de la recuperación de los compuestos de interés utilizando técnicas de extracción asistida por microondas o ultrasonidos. El empleo de estas tecnologías avanzadas permitirá reducir el tiempo de extracción, el consumo energético y la cantidad de disolvente utilizado.

- **Objetivo 6: Recuperación del disolvente.**

Evaluación de métodos de reciclaje de los disolventes y de recuperación de los compuestos extraídos.

- **Objetivo 8: Difusión y divulgación de los resultados.**

Difusión y divulgación de los resultados obtenidos en revistas científicas internacionales, así como en comunicaciones a congresos, seminarios o medios de comunicación (**ANEXOS: contribuciones científicas**).



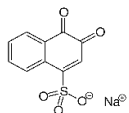

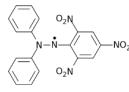
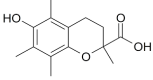
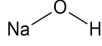

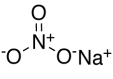

### **3. Materiales y métodos**



### 3.1. Reactivos

A continuación, se especifican los reactivos utilizados a lo largo de este trabajo, incluyendo el número CAS, el proveedor, la pureza y la estructura molecular de cada uno de ellos. La **Tabla 3.1** muestra los reactivos utilizados en los métodos de análisis, mientras que la **Tabla 3.2** muestra los compuestos objeto de estudio de este trabajo. En la **Tabla 3.3** se detallan los reactivos utilizados para la formación de los disolventes eutécticos, y en la **Tabla 3.4** se indican los disolventes moleculares utilizados en esta Tesis Doctoral. Todos los reactivos fueron utilizados tal y como se recibieron, sin ninguna etapa de purificación adicional.

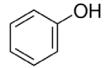
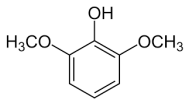


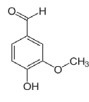

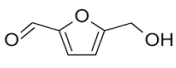
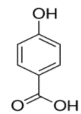
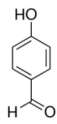
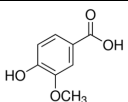
**Tabla 3.1.** Reactivos utilizados en los métodos de análisis, número CAS, pureza, proveedor y estructura molecular.

Reactivo	Análisis	CAS	Pureza	Proveedor	Estructura molecular
Folin & Ciocalteu 2N (FC)	Contenido fenólico total	521-24-4	-	Sigma-Aldrich	
Carbonato de sodio anhidro (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Contenido fenólico total	497-19-8	99,5% (p/p)	Sigma-Aldrich	
2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	Capacidad antioxidante	1898-66-4	-	Sigma-Aldrich	
Trolox	Capacidad antioxidante	53188-07-1	-	Sigma-Aldrich	
Hidróxido de sodio (NaOH)	Contenido de flavonoides total	1310-73-2	97% (p/p)	J.T. Baker	
Cloruro de aluminio (AlCl <sub>3</sub> )	Contenido de flavonoides total	7446-70-0	99,99% (p/p)	EMD Millipore Corporation	
Nitrato de sodio (NaNO <sub>3</sub> )	Contenido de flavonoides total	7631-99-4	pureza de análisis	Sigma-Aldrich	
Metanol (MeOH)	Capacidad antioxidante/HPLC	67-56-1	pureza de HPLC	Honeywell	

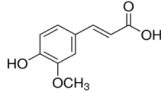
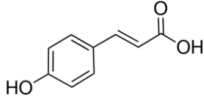
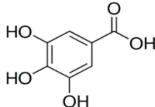
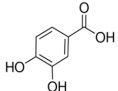
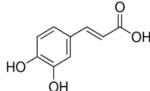
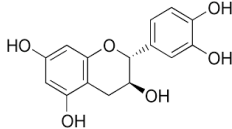
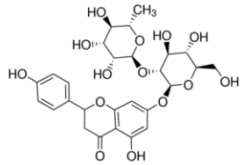
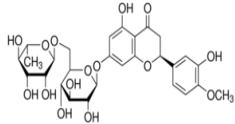
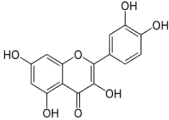
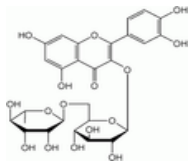

**Tabla 3.1. (Continuación).** Reactivos utilizados en los métodos de análisis, número CAS, pureza, proveedor y estructura molecular.

Reactivo	Análisis	CAS	Pureza	Proveedor	Estructura molecular
Acetonitrilo (ACN)	HPLC	75-05-8	pureza de HPLC	Honeywell	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}\equiv\text{N}$
Ácido acético	HPLC	64-19-7	Glacial	Labkem	
Agua	HPLC	7732-18-5	pureza de HPLC	Honeywell	

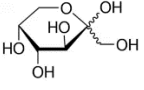
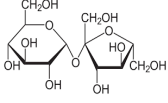
**Tabla 3.2.** Compuestos objeto de estudio, número CAS, pureza, proveedor y estructura molecular.

Reactivo	Pureza	CAS	Proveedor	Estructura molecular
Fenol (FE)	≥ 99% (p/p)	108-95-2	Sigma-Aldrich	
Siringol (SIR)	99% (p/p)	91-10-1	Sigma-Aldrich	
Guayacol (GUA)	99% (p/p)	90-05-1	Sigma-Aldrich	
o-cresol (oCRE)	99% (p/p)	95-48-7	Sigma-Aldrich	
Vainillina (VAN)	99% (p/p)	121-33-5	Sigma-Aldrich	
Furfural (FF)	99% (p/p)	98-01-1	Sigma-Aldrich	
5-Hidroximetilfurfural (5HMF)	> 99%(p/p)	67-47-0	Sigma-Aldrich	
Ácido 4-hidroxibenzoico (A4HB)	9% (p/p)	99-96-7	Sigma-Aldrich	
4-Hidroxibenzaldehído (4HBAlid)	9% (p/p)	123-08-0	Sigma-Aldrich	
Ácido vanílico (AV)	97% (p/p)	121-34-6	Sigma-Aldrich	

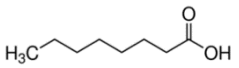
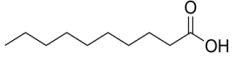
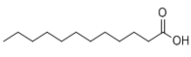
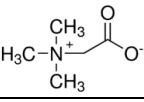
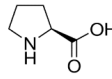
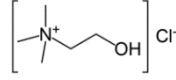
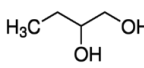
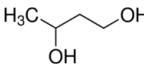
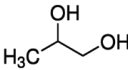
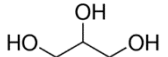
**Tabla 3.2. (Continuación).** Compuestos objeto de estudio, número CAS, pureza, proveedor y estructura molecular.

Reactivo	Pureza	CAS	Proveedor	Estructura molecular
Ácido <i>trans</i> -ferúlico (AF)	99% (p/p)	1135-24-6	Sigma-Aldrich	
Ácido <i>p</i> -cumárico (ApC)	≥ 98% (p/p)	501-98-4	Sigma-Aldrich	
Ácido gálico (AG)	≥ 97% (p/p)	149-91-7	Sigma-Aldrich	
Ácido protocatecuico (AP)	≥ 97% (p/p)	99-50-3	Sigma-Aldrich	
Ácido cafeico (ACaf)	≥ 98% (p/p)	331-39-5	Sigma-Aldrich	
Catequina (CAT)	≥ 98% (p/p)	225937-10-0	Sigma-Aldrich	
Naringina (NAR)	≥ 95% (p/p)	10236-47-2	Sigma-Aldrich	
Hesperidina (HESP)	≥ 80% (p/p)	520-26-3	Sigma-Aldrich	
Quercetina (QUER)	≥ 95% (p/p)	849061-97-8	Sigma-Aldrich	
Rutina (RUT)	≥ 94% (p/p)	207671-50-9	Sigma-Aldrich	
Glucosa (GLU)	≥ 99,5% (p/p)	50-99-7	Sigma-Aldrich	

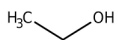
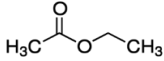
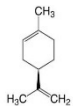
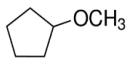
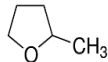
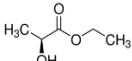
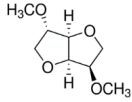

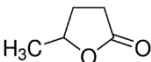
**Tabla 3.2. (Continuación).** Compuestos objeto de estudio, número CAS, pureza, proveedor y estructura molecular.

Reactivo	Pureza	CAS	Proveedor	Estructura molecular
Fructosa (FRU)	≥ 99% (p/p)	57-48-7	Sigma-Aldrich	
Sacarosa (SAC)	≥ 99% (p/p)	57-50-1	Sigma-Aldrich	

**Tabla 3.3.** Reactivos utilizados para la formación de los disolventes eutécticos, número CAS, pureza, proveedor y estructura molecular.

Reactivo	Pureza	CAS	Proveedor	Estructura molecular
<i>Disolventes eutécticos hidrófobos</i>				
Ácido octanoico (C8)	99% (p/p)	124-07-2	ACROS organic	
Ácido decanoico (C10)	99% (p/p)	334-48-5	ACROS organic	
Ácido dodecanoico (C12)	99% (p/p)	143-07-7	Sigma-Aldrich	
<i>Disolventes eutécticos hidrófilos</i>				
Betaína (Bet)	≥ 98% (p/p)	107-43-7	Sigma-Aldrich	
L-Prolina (Pro)	99% (p/p)	147-85-3	Sigma-Aldrich	
Cloruro de colina (ChCl)	≥ 98% (p/p)	67-48-1	Sigma-Aldrich	
1,2-Butanodiol (1,2B)	≥ 98% (p/p)	584-03-2	Sigma-Aldrich	
1,3-Butanodiol (1,3B)	99,5% (p/p)	107-88-0	Sigma-Aldrich	
1,2-Propanodiol (1,2P)	99,5% (p/p)	57-55-6	Sigma-Aldrich	
Glicerol (Gli)	99,5% (p/p)	56-81-5	Panreac	

**Tabla 3.4.** Disolventes moleculares utilizados, número CAS, pureza, proveedor y estructura molecular.

Reactivo	Pureza	CAS	Proveedor	Estructura molecular
Etanol (EtOH)	Absoluto	64-17-5	J. T. Baker	
Acetato de etilo (EA)	≥ 99,5% (p/p)	141-78-6	HoneyWell	
(R)-(+)-Limoneno (LIM)	97% (p/p)	5989-27-5	Sigma-Aldrich	
Ciclopentil metil éter (CPME)	≥ 99% (p/p)	5614-37-9	Sigma-Aldrich	
2-Metiltetrahidrofurano (2MeTHF)	≥ 99% (p/p)	96-47-9	Sigma-Aldrich	
(-)-Etil L-lactato (EL)	99% (p/p)	687-47-8	Sigma-Aldrich	
Dimetil isosorbida (DMI)	≥ 99% (p/p)	5306-85-4	Sigma-Aldrich	
Dihidrolevoglucosenona- Cyrene® (CYR)	≥ 98,5% (p/p)	53716-82-8	Sigma-Aldrich	
γ-Valerolactona (GVL)	≥ 99% (p/p)	108-29-2	Sigma-Aldrich	








## 3.2. Equipos

A continuación, en la **Tabla 3.5** se muestran los equipos e instrumentos utilizados durante el desarrollo de este trabajo.

**Tabla 3.5.** Equipos e instrumentos empleados durante la Tesis Doctoral, junto con sus características.

Equipo	Imagen	Características
Balanza analítica		Sartorius M - POWER AZ124. Repetitividad $\pm 0,0002$ g
Agitador magnético		Scilogex, MS-M-S10
Placa agitadora con control de temperatura		Ibx instruments, H03D series. Error de $\pm 0,5$ °C
Estufa		Digitronic (P. Selecta)
Bloque termostático		Lbx instruments, serie HBD120. Error de $\pm 0,5$ °C
Agitador orbital con control de temperatura		Labnet international, Inc. VORTEMP 1550. Error de $\pm 0,5$ °C
Baño de ultrasonidos con control de temperatura		Elmasonic S 15 H, Elma. Frecuencia de ultrasonidos: 37 kHz. Potencia de 35 W

**Tabla 3.5 (continuación).** Equipos e instrumentos empleados durante la Tesis Doctoral, junto con sus características.

Equipo	Imagen	Características
Sonda de ultrasonidos		UP200Ht, Hielscher Ultrasound technology. Frecuencia de ultrasonidos: 26 kHz. Potencia de 200W.
Reactor microondas		Monowave 400, Anton Paar
Espectrofotómetro UV-Visible		V-730, JASCO
HPLC-DAD/RI		Serie JASCO 4000, JASCO
Centrífuga		Unicen 21, Ortoalresa
Rotavapor con bomba de vacío		Rotavapor R-114/Bomba de vacío V-100, Büchi Labortechnik
Densímetro digital de tubo vibrante + Viscosímetro		DSA-5000 M, Anton Paar Lovis 2000/ME, Anton Paar

### 3.3. Preparación de disolventes eutécticos

La selección de los disolventes eutécticos (DE) utilizados en esta tesis doctoral se fundamenta en una búsqueda bibliográfica, cálculos computacionales realizados con el software “COnducto-like Screening MOdel for Real Solvents (COSMO-RS)” y su miscibilidad en agua. En concreto, los DE utilizados se pueden clasificar en dos grandes grupos en función de su afinidad por ésta: DE hidrófobos y DE hidrófilos.

Para preparar los disolventes eutécticos, independientemente de su carácter hidrófilo o hidrófobo, se pesan los componentes individuales de partida en una balanza analítica de precisión, se añaden en un vaso de precipitados y se agitan a 350 rpm y 60 - 80 °C hasta que se obtenga un líquido transparente y homogéneo (mezcla eutéctica). A continuación, la mezcla se enfría lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente y se guarda en frascos de vidrio hasta su uso.

#### 3.3.1. Disolventes eutécticos hidrófobos

Los DE hidrófobos estudiados en esta tesis doctoral consisten en una mezcla binaria de ácido octanoico, ácido decanoico y ácido dodecanoico, en una relación molar específica que ha sido obtenida de la bibliografía [156,239,240]. En la mezcla binaria ambos ácidos pueden actuar tanto como donante de enlaces de hidrógeno (HBD, del inglés *Hydrogen Bond Donor*), como aceptor de enlace de hidrógeno (HBA, del inglés *Hydrogen Bond Acceptor*), formando un líquido homogéneo, transparente e hidrófobo [239].

Todos los DE hidrófobos fueron utilizados en la extracción líquido-líquido de corrientes acuosas. En todos los casos, estos DE fueron previamente saturados con agua desionizada para evitar un cambio significativo en el volumen de las fases tras la extracción.

La caracterización de los DE hidrófobos puros se ha llevado a cabo en términos de densidad, viscosidad y  $^1\text{H}$ -RMN. En concreto, la densidad ( $\rho$ ) se determinó con un densímetro digital de tubo vibrante Anton Paar DSA-5000 M a 25 °C (incertidumbre en la medida:  $\pm 3,10^{-4}$  g·cm $^{-3}$  y precisión de la temperatura:  $\pm 0,01$  °C), mientras que para la medida de la viscosidad dinámica ( $\eta$ ), a la misma temperatura, se utilizó un viscosímetro Lovis 2000/ME, acoplado al primero. En este caso, la temperatura se controló con una precisión de  $\pm 0,02$  °C y el capilar utilizado fue de 1,59 mm, con una incertidumbre de  $\pm 0,005$  mPa·s. Los resultados de la caracterización por Resonancia Magnética Nuclear de Protones ( $^1\text{H}$ -RMN) de los DE se muestran en la **Figura A.1**,

disponible como Anexo. Todos los picos se atribuyen a los componentes que conforman los DE, lo que indica que no hay impurezas producidas por reacciones secundarias. Estos resultados están en sintonía con los previamente reportados en la bibliografía [239,240].

En la **Tabla 3.6.** se muestran los DE hidrófobos utilizados en esta tesis, incluyendo la nomenclatura utilizada, los componentes de partida, la relación molar, y los valores de densidad y viscosidad a 25 °C.

**Tabla 3.6.** Disolventes eutécticos hidrófobos utilizados.

Nomenclatura	Compuesto 1	Compuesto 2	Relación molar	Densidad (g/ cm <sup>3</sup> )	Viscosidad (mPa·s)
C8-C10	Ácido octanoico	Ácido decanoico	[1:1]	0,9011	6,922
C8-C12	Ácido octanoico	Ácido dodecanoico	[3:1]	0,9013	7,188
C10-C12	Ácido decanoico	Ácido dodecanoico	[2:1]	0,8935	10,348

### 3.3.2. Disolventes eutécticos hidrófilos

Los disolventes eutécticos hidrofílicos utilizados en este trabajo se han formado con el objetivo de estudiar la influencia de tres HBA (cloruro de colina, betaína y prolina) y diferentes HBD basados en polialcoholes (1,2-butanodiol; 1,3-butanodiol, 1,2-propanodiol y glicerol). La relación molar utilizada y las condiciones para su formación están basadas en estudios bibliográficos previamente publicados [141,152,241–243].

La nomenclatura, los compuestos que los conforman y la relación molar utilizada para la formación los DE hidrofílicos utilizados se presentan en la **Tabla 3.7.**

**Tabla 3.7.** Disolventes eutécticos hidrófilos utilizados.

Nomenclatura	HBA	HBD	Relación molar
ChCl:1,2B (1:3)	Cloruro de colina		[1:3]
ChCl:1,2B (1:4)			[1:4]
Pro:1,2B (1:3)	Prolina	1,2-Butanediol	[1:3]
Pro:1,2B (1:4)			[1:4]
Bet:1,2B (1:3)	Betaína		[1:3]
Bet:1,2B (1:4)			[1:4]
ChCl:1,3B (1:4)	Cloruro de colina	1,3-Butanediol	[1:4]
ChCl:1,2P (1:4)	Cloruro de colina		[1:4]
Pro:1,2P (1:4)	Prolina	1,2-Propanediol	[1:4]
Bet:1,2P (1:4)	Betaína		[1:4]
ChCl:Gli (1:4)	Cloruro de colina		[1:4]
Pro:Gli (1:4)	Prolina	Glicerol	[1:4]
Bet:Gli (1:4)	Betaína		[1:4]

### 3.4. Preparación de muestras

Como se ha comentado previamente, el objetivo principal de esta tesis doctoral es optimizar y mejorar diferentes procesos de extracción en el ámbito de las biorrefinerías. En concreto, los procesos estudiados pueden agruparse en: i) extracción líquido-líquido de compuestos inhibidores de la fermentación presentes en corrientes acuosas ricas en azúcares; y ii) extracción sólido-líquido de compuestos de interés presentes en el residuo sólido de naranja (RSN). A continuación, se describe la preparación de las muestras objeto de cada estudio.

#### 3.4.1. Disoluciones acuosas de inhibidores de la fermentación

Para el estudio de la extracción de inhibidores de la fermentación, se prepararon distintas disoluciones acuosas, que varían desde disoluciones de compuestos fenólicos inhibidores individuales y mezclas de estos, cuyo objetivo es estudiar su interacción con los disolventes de interés, hasta mezclas sintéticas complejas formadas tanto por estos inhibidores como por azúcares, para evaluar la selectividad de los disolventes hacia estos compuestos. A continuación, se explica la preparación de cada una de ellas.

### **Disolución de compuestos fenólicos individuales**

Con el fin de estudiar la interacción de los compuestos inhibidores con los disolventes objeto de estudio, en una primera etapa se prepararon disoluciones acuosas de fenol, *o*-cresol, guayacol, siringol y vainillina, respectivamente, debido a que son los compuestos fenólicos mayoritarios en las corrientes de biorrefinería ricas en azúcar [244,245]. En concreto, se prepararon disoluciones de concentración igual a 100 mg/L de cada compuesto fenólico, pesando el compuesto en una balanza analítica, disolviéndolo en un vaso de precipitados con agua desionizada y enrasando al volumen deseado en un matraz aforado. Esta concentración se seleccionó basándose en estudios previos realizados por el grupo de investigación [162].

### **Disolución multicomponente de compuestos fenólicos**

Una vez estudiadas las disoluciones formadas por los compuestos individuales, la siguiente etapa consistió en preparar una disolución multicomponente que incluyera los cinco compuestos fenólicos evaluados previamente. Esta mezcla, denominada 500-CF, se preparó por pesada, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. En este caso, se añadieron los diferentes compuestos fenólicos (fenol, *o*-cresol, guayacol, siringol y vainillina) en la misma proporción hasta obtener una concentración total de fenoles igual a 500 mg/L (100 mg/L de cada compuesto fenólico).

Dado que la concentración de inhibidores presentes en las corrientes ricas en azúcares puede variar dependiendo del pretratamiento utilizado, el tipo de corriente o la biomasa de partida utilizada [246], a partir de esta disolución inicial se prepararon otras de menor concentración con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración inicial sobre la capacidad de extracción de los disolventes estudiados. Para ello, se diluyó la disolución multicomponente de partida, 500-CF, hasta una concentración final de compuestos fenólicos de 250, 100 y 50 mg/L. Estas nuevas disoluciones se han denominado 250-CF, 100-CF y 50-CF, respectivamente.

### **Disolución de compuestos fenólicos y glucosa**

Posteriormente, con el fin de evaluar la selectividad de los disolventes hacia los compuestos fenólicos de interés y los azúcares se preparó una nueva disolución formada por 50 g/L de glucosa (azúcar de referencia) y 100 mg/L de cada uno de los compuestos fenólicos de interés (fenol, *o*-cresol, guayacol, siringol y vainillina). La concentración de glucosa se eligió como un valor intermedio basado en la literatura para diversas corrientes de biorrefinería [42,247,248]. Esta disolución fue etiquetada como CF-GLU.

### **Mezcla sintética de inhibidores y azúcares**

Por último, con el objetivo de simular una corriente generada tras el pretratamiento de la biomasa, se preparó una mezcla sintética que incluye tanto azúcares como inhibidores de naturaleza diversa, tales como furanos y compuestos fenólicos, los cuales se producen como subproductos no deseados [249]. Concretamente, esta disolución está formada por dos furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural), diez compuestos fenólicos (fenol, guayacol, siringol, 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vainíllinico, ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico) y tres azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa). Cada uno de los inhibidores de la fermentación están presentes en una concentración de 1000 mg/L, mientras que los azúcares se encuentran a una concentración de 50 g/L cada uno, como una composición representativa de este tipo de muestras [250–253]. Esta disolución se denomina IF-AZ.

En la **Tabla 3.8** se presenta un resumen de las muestras estudiadas en la extracción líquido-líquido, junto con su composición, concentración y la nomenclatura utilizada.

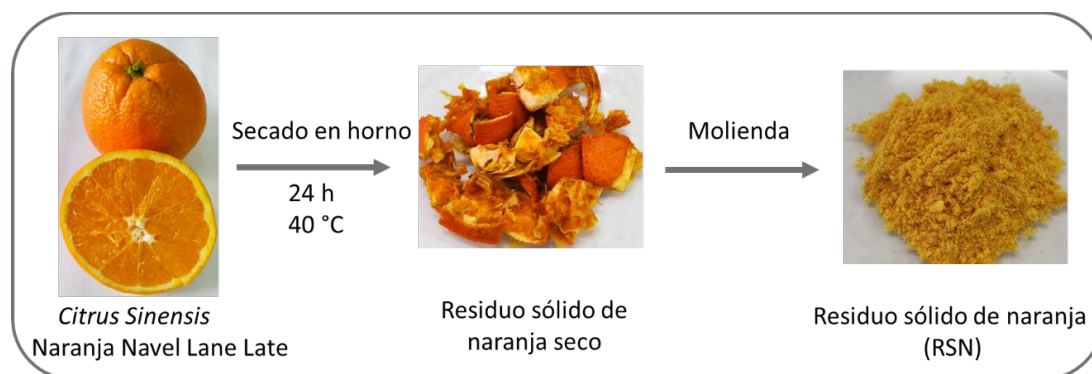
**Tabla 3.8.** Disoluciones acuosas estudiadas en la extracción líquido-líquido.

Muestra	Composición	Concentración	Nomenclatura
Disolución de compuestos individuales	fenol		100-FE
	<i>o</i> -cresol		100- <i>o</i> CRE
	siringol	100 mg/L	100-SIR
	guayacol		100-GUA
	vainillina		100-VAN
Disolución multicomponente de compuestos fenólicos		100 mg/L de cada compuesto fenólico	500-CF
	fenol, <i>o</i> -cresol, siringol, guayacol, vainillina	50 mg/L de cada compuesto fenólico	250-CF
		20 mg/L de cada compuesto fenólico	100-CF
		10 mg/L de cada compuesto fenólico	50-CF
Disolución de compuestos fenólicos y glucosa	fenol, <i>o</i> -cresol, siringol, guayacol, vainillina, glucosa	100 mg/L de cada compuesto fenólico 50 g/L glucosa	CF-GLU
Mezcla sintética de inhibidores y azúcares	<b>Furanos:</b> furfural, 5-hidroximetilfurfural	1000 mg/L de cada furano	
	<b>Compuestos fenólicos:</b> fenol, guayacol, siringol, 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico	1000 mg/L de cada compuesto fenólico	IF-AZ
	<b>Azúcares:</b> glucosa, fructosa, sacarosa	50 g/L de cada azúcar	

### 3.4.2. Muestras sólidas de residuo sólido de naranja

Con el objetivo de obtener un residuo similar al generado en la industria del zumo de naranja y estudiar su potencial valoración mediante la extracción de compuestos de alto valor añadido, como los compuestos fenólicos antioxidantes, se procedió a la preparación de las muestras a partir de naranjas comerciales. Para ello, se adquirieron 3 kg de naranjas frescas *Citrus Sinensis*, de la variedad Navel Lane Late, en una tienda local de Madrid (España). Las naranjas se exprimieron y el residuo sólido resultante se secó en la estufa a 40 °C durante 24 h. Una vez

seco, se molió utilizando un molinillo hasta obtener un polvo homogéneo. El polvo resultante fue etiquetado como residuo sólido de naranja (RSN) y almacenado a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso en los ensayos experimentales. El esquema de la preparación del residuo sólido de naranja (RSN) se muestra en la **Figura 3.1**.



**Figura 3.1.** Esquema de la preparación del residuo sólido de naranja (RSN).

## 3.5. Extracciones

### 3.5.1. Extracción líquido-líquido

Para llevar a cabo las extracciones líquido-líquido, se pusieron en contacto las muestras acuosas mencionadas en el **apartado 3.4.1**. con los diferentes disolventes objeto de estudio.

En una primera etapa, y con el fin de evaluar de manera general la capacidad de extracción de los diferentes disolventes, se realizaron las extracciones utilizando las condiciones de operación previamente establecidas por el grupo de investigación [162]. Para ello, se introdujeron volúmenes iguales de la disolución objeto de estudio y el disolvente (2,5 mL de cada uno) en un vial de vidrio y se agitaron a 550 rpm durante 15 min en el agitador magnético. Posteriormente, las muestras se dejaron en reposo durante toda la noche a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  para garantizar la completa separación de las fases.

Para estudiar el efecto de la temperatura en las extracciones líquido-líquido, se introdujeron las disoluciones y el disolvente en un vial de vidrio sellado en proporción disolvente: alimentación igual a 1, y se agitaron en un agitador orbital con temperatura controlada ( $40$  y  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a 550 rpm durante 15 min. La separación de fases se llevó a cabo en el bloque termostático a  $40$  o  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante la noche.

Finalmente, para la extracción de la mezcla compleja IF-AZ (inhibidores de la fermentación y azúcares), al tener una concentración más elevada de los compuestos de interés, se estudiaron distintas relaciones disolventes: muestra (D:M) (0,1; 0,5; 1; 1,5), utilizando un volumen total de 5 mL y distintos tiempos de extracción (5, 10, 15, 30 y 45 min). En la **Tabla 3.9** se muestra un resumen de las disoluciones, disolventes y condiciones de extracción utilizadas en cada caso.

**Tabla 3.9.** Disolventes y condiciones para cada tipo de muestra estudiadas en la extracción líquido-líquido.

Muestra	Disolventes	Condiciones	
Disolución de compuestos individuales	100-fenol	T: 25 °C	
	100- <i>o</i> -cresol	D:M 1	
	100-siringol	<b>Disolventes eutécticos hidrofóbicos:</b> C8-C10; C8-C12; C10-C12	
	100-guayacol		T: 15 min
	100-vainillina	550 rpm	
Disolución multicomponente de compuestos fenólicos	500-PC	<b>Disolventes eutécticos hidrofóbicos:</b> C8-C10; C8-C12; C10-C12	
	250-PC		T: 25; 40 y 60 °C
	100-PC	<b>Biodisolventes:</b> 2MeTHF; CPME; LIM	
	50-PC		D:M 1
Disolución de compuestos fenólicos y glucosa	PC-GLU	<b>Disolventes eutécticos hidrofóbicos:</b> C8-C10; C8-C12; C10-C12	
		<b>Biodisolventes:</b> 2MeTHF; CPME; LIM	
		T: 15 min	
Mezcla sintética de inhibidores y azúcares	IF-AZ	CPME	
			T: 25 °C
			D:M: 0,1; 0,5; 1; 1,5 T: 5; 10; 15; 30 y 45 min 550 rpm

### 3.5.2. Extracción sólido-líquido

Todas las extracciones sólido-líquido estudiadas a lo largo de este trabajo se realizaron añadiendo 0,5 g de RSN a 5 mL de disolvente, es decir, empleando una relación disolvente: muestra (D:M) constante, e igual a 10. Tras la extracción, y con el fin de favorecer la separación de fases, todas las muestras fueron centrifugadas a 4200 rpm durante 10 min. Los extractos resultantes se analizaron mediante distintas técnicas analíticas, tal y como se indica en el **Apartado 3.6**.

En el caso de la extracción convencional, los ensayos se llevaron a cabo utilizando un agitador orbital (EAO) con control de temperatura (**Tabla 3.5**). Las condiciones de extracción fueron evaluadas considerando la temperatura (30 y 60 °C) y el tiempo de extracción (30, 60, 90 o 100 min), con una agitación constante de 900 rpm.

### **3.5.3. Extracción asistida**

Con el objetivo de mejorar los rendimientos de extracción y reducir los tiempos de operación y el consumo energético, se han investigado diversas técnicas de extracción asistida, tales como ultrasonidos y microondas. Las variables estudiadas y los valores seleccionados están basados en ensayos preliminares y en los límites operativos de cada instrumento.

#### **3.5.3.1. Extracción asistida por ultrasonidos**

La extracción asistida por ultrasonidos se ha estudiado empleando dos vías diferentes, tanto utilizando un baño de ultrasonidos y como una sonda de ultrasonidos (**Tabla 3.5**). La extracción asistida por baño de ultrasonidos (EABU) se estudió a 60 °C durante 30 min. Para ello, se mezcló el RSN y el disolvente de interés en un tubo tipo falcon, que luego se colocó en el baño de ultrasonidos lleno con agua. El proceso de extracción asistida por sonda de ultrasonidos (EASU) se llevó a cabo utilizando una potencia de 10 y 20 W, variando el tiempo de extracción entre 1,5; 3; 6 y 9 min. En este caso, el RSN y el disolvente también se mezclaron en un tubo tipo falcon. Las condiciones de extracción estudiadas con la sonda están limitadas por la temperatura que se alcanza durante el proceso, ya que ésta no puede ser controlada. De hecho, se observó que, al aumentar el tiempo por encima de 9 min, o la potencia por encima de 20 W, tenía lugar la evaporación de los disolventes convencionales y de los biodisolventes, así como la degradación de los disolventes eutécticos. Aunque la temperatura no puede ser controlada directamente, es importante destacar que se realizó una medición de la misma justo al finalizar cada extracción.

#### **3.5.3.2. Extracción asistida por microondas**

En la extracción asistida por microondas (EAM) para la mezcla de RSN y disolvente se utilizó un vial de vidrio herméticamente cerrado y se introdujo en el reactor microondas (**Tabla 3.5**). En este caso, las condiciones de extracción estudiadas han sido la temperatura (60 y 100 °C) y el tiempo (1,5; 3; 6; 9 y 12 min), utilizando una velocidad de agitación de 1000 rpm en todas las extracciones.

En la **Tabla 3.10** se muestra un resumen de los disolventes y las condiciones de extracción estudiadas en la valorización de RSN a través de la extracción sólido-líquido.

**Tabla 3.10.** Disolventes y condiciones estudiadas en la extracción sólido-líquido de RSN.

Muestra	Disolventes estudiados	Condiciones estudiadas
Residuo sólido de naranja (RSN)	H <sub>2</sub> O; 80% (v/v) EtOH; EA	EAO T: 30, 60 °C t: 30, 60, 90 min
		EABU T: 60 °C t: 30 min
		EASU P: 10 W t: 1,5; 3; 6 min
		EAM T: 60; 100 °C t: 1,5; 3; 6 min
	ChCl:1,2But (1:3); ChCl:1,2But (1:4); Pro:1,2But (1:3); Pro:1,2But (1:4); Bet:1,2But (1:3); Bet:1,2But (1:4); ChCl:1,3But (1:4); ChCl:1,2Prop (1:4); Pro:1,2Prop (1:4); Bet:1,2Prop (1:4); ChCl:Gly (1:4); Pro:Gly (1:4); Bet:Gly (1:4)	EAO T: 60 °C; t: 100 min
		EASU P: 10; 20; 50 W t: 3; 6; 9; 12 min
	Bet:1,2But (1:4)	EAM T: 60; 100 °C t: 3; 6; 9 min
		EAO T: 60 °C; t:30 min
	2MeTHF; CPME; EL; DMI; CYR; GVL	EASU P: 10 W; t: 6 min
		EAM T:100 °C; t:6 min
		EASU P: 10; 20 W t: 1,5; 3; 6; 12 min
	GVL; EL	EAM T: 60; 80; 100 °C t: 1,5; 3; 6; 9; 12 min

## 3.6. Métodos de análisis

### 3.6.1. Análisis espectrofotométricos

#### 3.6.1.1. Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales (TPC-del inglés *Total Phenolic Content*) de los extractos ha sido determinado mediante cuantificación espectrofotométrica, siguiendo el método colorimétrico Folin-Ciocalteu, adaptado por Cañadas *et al.* [158]. Para ello, se mezclan 0,1 mL de la muestra y 0,1 mL del reactivo Folin-Ciocalteu en un vial de vidrio, y la mezcla resultante se incuba durante 3 min a temperatura ambiente y en ausencia de luz. A continuación, se añaden al vial 2 mL de una disolución acuosa de carbonato sódico al 2% (p/v) y se incuba durante otros 30 min en las mismas condiciones. Finalmente, se mide la absorbancia de la disolución resultante a 765 nm empleando el espectrofotómetro UV-VIS (**Tabla 3.5**).

Los valores de TPC, expresados como mg de ácido gálico equivalente (GAE) por g de muestra, se obtuvieron a partir de la **Ecuación 1**:

$$TPC \left( \frac{\text{mg GAE}}{\text{g muestra}} \right) = \frac{[GAE]}{m \text{ muestra}} \cdot V \text{ disolvente} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde  $[GAE]$  es la concentración de ácido gálico equivalente presente en el extracto medido en mg GAE/L, calculada con la recta de calibrado preparada con disoluciones estándar de ácido gálico (**Tabla A.1**, disponible en el Anexo);  $V \text{ disolvente}$  es el volumen de disolvente utilizado durante la extracción medido en litros; y  $m \text{ muestra}$  es la cantidad de muestra utilizada medida en gramos. En el caso de que las muestras se salieran del rango de calibración (0 – 400 mg GAE/L), se diluyeron utilizando el disolvente del ensayo correspondiente. Los análisis espectrofotométricos se realizaron por triplicado, utilizando el disolvente como blanco. Los resultados se expresan como TPC (mg GAE/ g muestra)  $\pm$  desviación estándar relativa (RSD, %). La RSD se calculó como la desviación estándar de los tres resultados obtenidos dividida por la media y multiplicado por 100.

#### 3.6.1.2. Determinación del contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales (TFC-del inglés *Total Flavonoid Content*) de los extractos ha sido determinado mediante el método colorimétrico de formación de complejos del cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>), siguiendo el procedimiento descrito por Peřkal *et al.* [254]. Para ello, en un vial

de vidrio se mezclan 1 mL de agua desionizada con 0,45 mL del extracto y 0,15 mL de una disolución acuosa de NaNO<sub>2</sub> al 5% (p/v), la mezcla resultante se agita en un agitador vórtex y se incuba 5 min a temperatura ambiente. Después, se añaden 0,15 mL de AlCl<sub>3</sub> al 10% (p/v), se agita y se incuba otros 5 min. A continuación, la disolución se neutraliza con 1 mL de disolución acuosa de NaOH 1 N y se incuba durante otros 15 min. Finalmente, se mide la absorbancia de la disolución resultante a 510 nm con el espectrofotómetro UV-VIS (**Tabla 3.5**).

Los resultados, expresados como mg de quercetina equivalente (QE) por g de muestra, se calcularon mediante **Ecuación 2**:

$$TFC \left( \frac{mg\ QE}{g\ muestra} \right) = \frac{[QE]}{m\ muestra} \cdot V\ disolvente \quad \text{Ecuación 2}$$

donde  $[QE]$  es la concentración de quercetina equivalente presente en el extracto medida en mg QE/L, calculada con la recta de calibrado obtenida con disoluciones patrón de quercetina (**Tabla A.1**, disponible en el Anexo);  $V\ disolvente$  es el volumen de disolvente utilizado durante la extracción, medido en litros; y  $m\ muestra$  es la cantidad de muestra utilizada medida en gramos. En el caso de que la concentración de las muestras excediera el rango de calibración (0 – 500 mg QE/L), se diluyen utilizando el disolvente del ensayo correspondiente. Los análisis espectrofotométricos se realizaron por triplicado, utilizando el disolvente como blanco. Los resultados se expresan como TFC (mg QE/ g muestra) ± desviación estándar relativa (RSD, %). La RSD se calculó como la desviación estándar de los tres resultados obtenidos dividida por la media y multiplicado por 100.

### 3.6.1.3. Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (AC-del inglés *Antioxidant Capacity*) de los extractos ha sido determinada mediante el ensayo del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), siguiendo el procedimiento reportado por Cañadas *et al.* [158]. Para ello, se mezclan 0,1 mL de muestra, o de metanol (blanco), con 2,9 mL de solución de radical DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  mol/L de DPPH en metanol), seguido de 30 min de incubación a temperatura ambiente y en ausencia de luz. A continuación, se mide la absorbancia de la disolución resultante a 515 nm. El porcentaje de inhibición de la disolución DPPH, medido como la decoloración provocada por el extracto, ha sido calculado mediante la **Ecuación 3**:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\text{Abs MeOH} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs MeOH}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

donde *Abs MeOH* es la absorbancia obtenida del blanco de metanol (mezcla de metanol y reactivo DPPH) y *Abs muestra* es la absorbancia de la muestra. Finalmente, la capacidad antioxidante, expresada como mg de trolox equivalente (TE) por g de muestra, se calculó mediante la **Ecuación 4**:

$$AC \left( \frac{\text{mg TE}}{\text{g muestra}} \right) = \frac{[TE]}{m \text{ muestra}} \cdot V \text{ disolvente} \quad \text{Ecuación 4}$$

donde *[TE]* es la concentración de trolox equivalente presente en el extracto medido en mg TE/L, calculados con la curva de calibración representada como % de inhibición de cada solución estándar de trolox frente a la concentración (**Tabla A.1**, disponible en el Anexo); *V disolvente* es el volumen de disolvente utilizado durante la extracción, medido en litros; y *m muestra* es la cantidad de muestra utilizada, medida en gramos. En el caso de que las muestras se salieran del rango de calibración (0 – 200 mg TE/L), se diluyen utilizando el disolvente del ensayo correspondiente. Los análisis espectrofotométricos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresan como AC (mg TE/ g muestra) ± desviación estándar relativa (RSD, %). La RSD se calculó como la desviación estándar de los tres resultados obtenidos dividida por la media y multiplicado por 100.

### 3.6.2. Análisis cromatográficos

Para la determinación específica de los compuestos de interés se ha utilizado cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC-del inglés *High Performance Liquid Chromatography*). Los análisis realizados para separar, identificar y cuantificar los compuestos presentes en las muestras objeto de estudio (inhibidores, compuestos antioxidantes y azúcares) se han llevado a cabo utilizando un equipo HPLC Serie 4000 de Jasco (**Tabla 3.5**), equipado con un detector arreglo de diodos (DAD) y un detector de índice de refracción (RI). Los métodos cromatográficos utilizados en esta Tesis Doctoral han sido desarrollados teniendo en cuenta las características de las muestras a analizar y se describen a continuación.

### 3.6.2.1. HPLC-DAD

#### Compuestos fenólicos

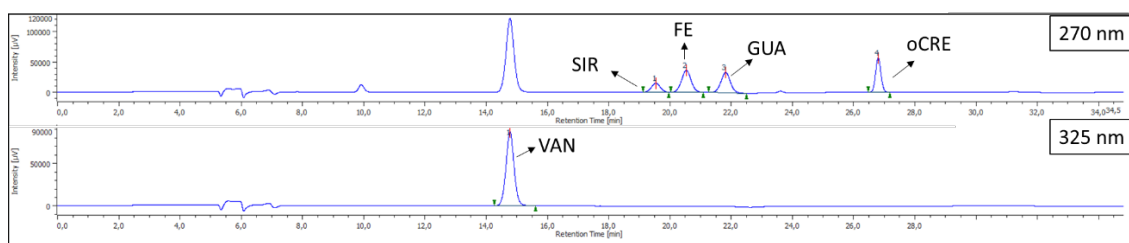
La detección e identificación de los compuestos fenólicos se realizó utilizando un detector DAD a las siguientes longitudes de onda: 270 nm para la detección de fenol, guayacol, siríngol y o-cresol, y 325 nm para la detección de vainillina.

Para la separación de los compuestos se utilizó una columna Fortis C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm) a temperatura ambiente. Los compuestos se separaron con una elución en gradiente utilizando diferentes proporciones de disolución acuosa de ácido acético al 2% (v/v) (A) y acetonitrilo (B). Las condiciones del método de gradiente están representadas en la **Tabla 3.11**. El análisis total por muestra se realizó en 35 min.

**Tabla 3.11.** Gradiente utilizado para la separación cromatográfica de los compuestos fenólicos. A: disolución acuosa de ácido acético al 2% (v/v); B: acetonitrilo.

Tiempo (min)	A%	B%
0	70	30
7	70	30
13,5	65	35
18,5	45	55
22,5	40	60
25,5	20	80
30	70	30
35	70	30

El perfil obtenido con este método cromatográfico para una mezcla estándar de 50 mg/L de siríngol, fenol, guayacol, o-cresol y vainillina se muestra en la **Figura 3.2**.



**Figura 3.2.** Perfil del cromatograma de HPLC-DAD de la disolución patrón de 50 mg/L de los compuestos fenólicos inhibidores de la fermentación a 270 nm (siríngol, fenol, guayacol y o-cresol) y a 325 nm (vainillina).

### Compuestos inhibidores (compuestos fenólicos y furanos)

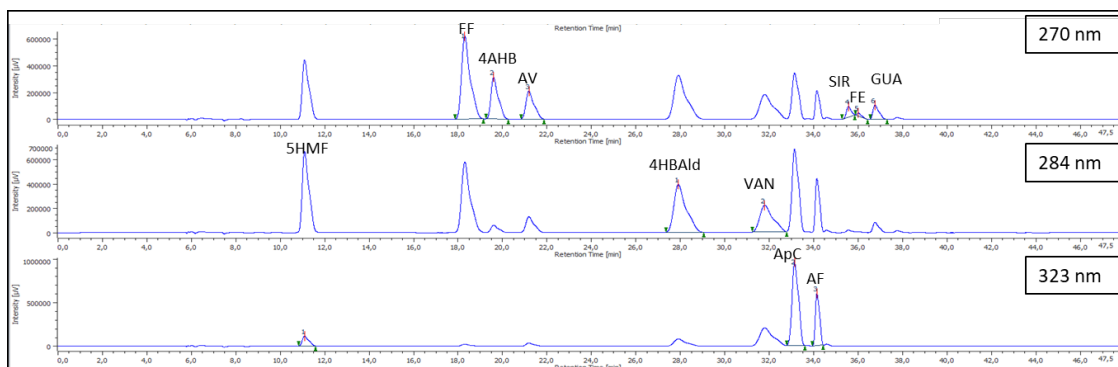
La detección y cuantificación de los compuestos inhibidores de la fermentación se realizó utilizando el detector DAD a las siguientes longitudes de onda: 270 nm para la detección de furfural, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, siringol, fenol y guayacol; 284 nm para la detección de 5-hidroximetilfurfural, 4-hidroxibenzaldeido y vainillina, y 323 nm para la detección de ácido p-cumárico y ácido ferúlico.

Para la separación de los compuestos se utilizó una columna Fortis C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) a temperatura ambiente. Los compuestos se separaron con una elución en gradiente utilizando diferentes proporciones de solución acuosa de ácido acético al 1,25% (v/v) (A) y acetonitrilo (B), las cuales se indican en la **Tabla 3.12**. El análisis total por muestra se realizó en 48 min.

**Tabla 3.12.** Gradiente utilizado para la separación cromatográfica de los inhibidores (furanos y compuestos fenólicos). A: disolución acuosa de ácido acético al 1,25% (v/v); B: acetonitrilo.

Tiempo (min)	A%	B%
0	85	15
7	80	20
22	80	20
27	55	45
30	52	48
38	52	48
41	85	15
48	85	15

El perfil obtenido con este método de cromatografía para una mezcla estándar de 50 mg/L de los compuestos inhibidores de la fermentación (furfural, ácido 4-hidroxibenzoicosiringol, ácido vanílico, siringol, fenol, guayacol, 5-hidroximetilfurfural, 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, ácido cumárico y ácido ferúlico) se muestra en la **Figura 3.3**.



**Figura 3.3.** Perfil del cromatograma de HPLC-DAD de la solución patrón de 50 mg/L de los compuestos inhibidores de la fermentación a 270 nm (furfural, ácido 4-hidroxibenzoicosiringol, ácido vanílico, sirringol, fenol y guayacol), a 284 nm (5-hidroximetilfurfural, 4-hidroxibenzaldehído y vainillina) y 323 nm (ácido cumárico y ácido ferúlico).

### Compuestos fenólicos presentes en los residuos sólidos de naranja

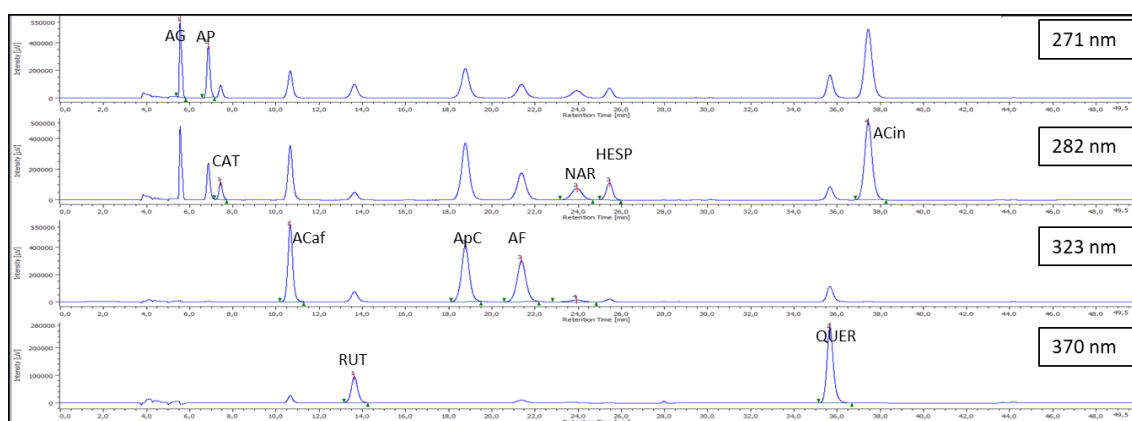
La detección y cuantificación de los compuestos fenólicos encontrados en el residuo sólido de naranja (hesperidina, naringina, catequina, rutina, quercetina, ácido gálico, ácido cafeico, ácido cumárico y ácido ferúlico) [85,86,94–96] se realizó utilizando el detector DAD a las siguientes longitudes de onda: 271 nm para la detección de ácido gálico y ácido protocatéuico; 282 nm para la detección de catequina, naringina y hesperidina y ácido cinámico; 323 nm para la detección de ácido cafeico, ácido cumárico y ácido ferúlico; y 370 nm para la detección de rutina y quercetina. El ácido cinámico no fue detectado en ningún análisis cromatográfico, por lo que no se incluyó en el análisis de los datos.

Para la separación de los compuestos se utilizó una columna Fortis C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm) a temperatura ambiente. Los compuestos se separaron con una elución en gradiente utilizando diferentes proporciones de solución acuosa de ácido acético al 1,25% (v/v) (A) y acetonitrilo (B), representado en la **Tabla 3.13**. El análisis total por muestra se realizó en 50 min.

**Tabla 3.13.** Gradiente utilizado para la separación cromatográfica de antioxidantes presentes en RSN. A: disolución acuosa de ácido acético al 1,25% (v/v); B: acetonitrilo.

Tiempo (min)	A%	B%
0	79	21
17	79	21
22	65	35
32	65	35
40	50	50
45	21	21
50	21	21

El perfil obtenido con este método cromatográfico para una mezcla estándar de 50 mg/L de los compuestos fenólicos presentes en RSN (ácido gálico, ácido protocatecuico, catequina, naringina, hesperidina, ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico, rutina y quercetina) se muestra en la **Figura 3.4**.

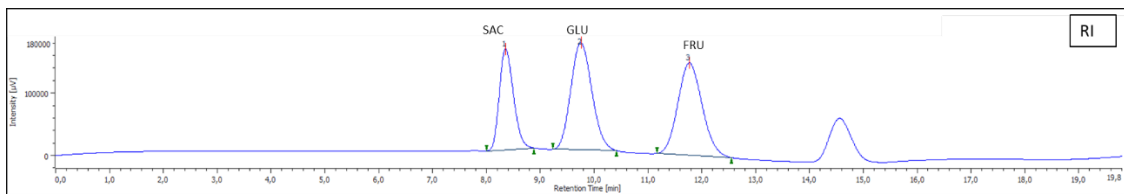


**Figura 3.4.** Perfil del cromatograma de HPLC-DAD de la solución patrón de 50 mg/L de los compuestos fenólicos presentes en RSN a 271 nm (ácido gálico y ácido protocatecuico), a 282 nm (catequina, naringina y hesperidina), 323 nm (ácido caféico, ácido cumárico y ácido ferúlico), y a 370 nm (rutina y quercetina).

### 3.6.2.2. HPLC-RI

La detección y cuantificación de los azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) se llevó a cabo utilizando el detector de índice de refracción (RI). Para la separación de los compuestos se utilizó una columna  $\text{Ca}^{2+}$  Carbohydrate (columna BP- 800 Ca 300 x 7,8 mm, de Jasco) y una precolumna (BP-800 Ca Guard. 50 x 4,6 mm, de Jasco) a 80 °C. Como fase móvil se utilizó agua para HPLC con un caudal de 0,7 mL/min. El análisis total por muestra se realizó en 20 min.

El perfil obtenido con este método de cromatografía para la disolución patrón de 10 g/L de los azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) se muestra en la **Figura 3.5**.



**Figura 3.5.** Perfil del cromatograma de HPLC-RI de la disolución patrón de 10 g/L de los azúcares: sacarosa, glucosa y fructosa.

### 3.6.2.3. Tratamiento de los datos obtenidos por HPLC

Tras el análisis cromatográfico, la cuantificación de los compuestos de interés se realizó integrando el área del pico y calculando la concentración a partir de la recta de calibrado preparada con disoluciones estándar de cada compuesto. Los análisis por HPLC se realizaron siempre por triplicado.

En las extracciones líquido-líquido, la eficiencia de extracción se determinó empleando la **Ecuación 5**, midiendo la concentración de los compuestos en la fase acuosa, antes y después de la extracción:

$$EE (\%) = \frac{C_i - C_f}{C_i} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

donde  $C_i$  y  $C_f$  son las concentraciones inicial y final de soluto en la fase acuosa, obtenidas con las rectas de calibrado preparadas con las disoluciones estándar (**Tabla A.2**, disponible en el Anexo). Los resultados se expresaron como eficiencia de extracción (EE) (%)  $\pm$  desviación estándar relativa (RSD) (%). La RSD se calculó como la desviación estándar de los tres resultados obtenidos dividida por la media, y luego multiplicada por 100.

La selectividad de los disolventes en las mezclas acuosas complejas (PC-GLU y IF-AZ) se calculó utilizando la **Ecuación 6**:

$$S = \frac{C_{CF \text{ disolvente}} / C_{CF \text{ fase acuosa}}}{C_{az \text{ disolvente}} / C_{az \text{ fase acuosa}}} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde  $C_{CF \text{ disolvente}}$  y  $C_{CF \text{ fase acuosa}}$  son las concentraciones de los compuestos fenólicos en el disolvente y en la fase acuosa, respectivamente; y  $C_{az \text{ disolvente}}$  y  $C_{az \text{ fase acuosa}}$  son las concentraciones de los azúcares en el disolvente y en la fase acuosa, respectivamente. Las concentraciones en

las fases ricas en disolvente se calcularon por diferencia de la concentración inicial y final de la fase acuosa.

En las extracciones sólido-líquido los resultados se expresaron como mg de compuesto de interés entre g de RSN, calculado según la **Ecuación 7**:

$$CF - AZ \left( \frac{mg}{g \text{ muestra}} \right) = \frac{[CF-AZ]}{m \text{ muestra}} \cdot V \text{ disolvente} \quad \text{Ecuación 7}$$

donde  $[CF-AZ]$  es la concentración medida en mg/L del compuesto de interés (compuestos fenólicos o azúcares) medidos en el HPLC y calculado con la recta de calibrado (**Tabla A.2**, disponible en el Anexo);  $V \text{ disolvente}$  es el volumen de disolvente utilizado durante la extracción en litros; y  $m \text{ muestra}$  es la cantidad de muestra utilizada medido en gramos. Los resultados se expresan como CF-AZ (mg / g muestra)  $\pm$  desviación estándar relativa (RSD, %). La RSD se calculó como la desviación estándar de los tres resultados obtenidos dividida por la media, y luego multiplicada por 100.

### 3.7. Recuperación del disolvente

En el caso de la mezcla líquida sintética formada por inhibidores y azúcares (IF-AZ), una vez establecidas las condiciones óptimas de extracción, se ha estudiado también la recuperación del mejor disolvente; en este caso, el ciclopentil metil éter (CPME), como parte fundamental de la viabilidad del proceso. Dicha recuperación se realizó mediante la evaporación del disolvente y su posterior condensación. Para ello, tras la extracción, se recogió la fase rica en disolvente y se evaporó utilizando un rotavapor conectado a una bomba de vacío (**Tabla 3.5**), obteniéndose dos fracciones: por un lado, el disolvente, que se recicla siendo utilizado en una nueva extracción; y, por otro, el residuo sólido rico en los compuestos inhibidores de la fermentación. El proceso fue estudiado en tres ciclos consecutivos para evaluar la capacidad de extracción del disolvente recuperado, como se representa en la **Figura 3.6**.

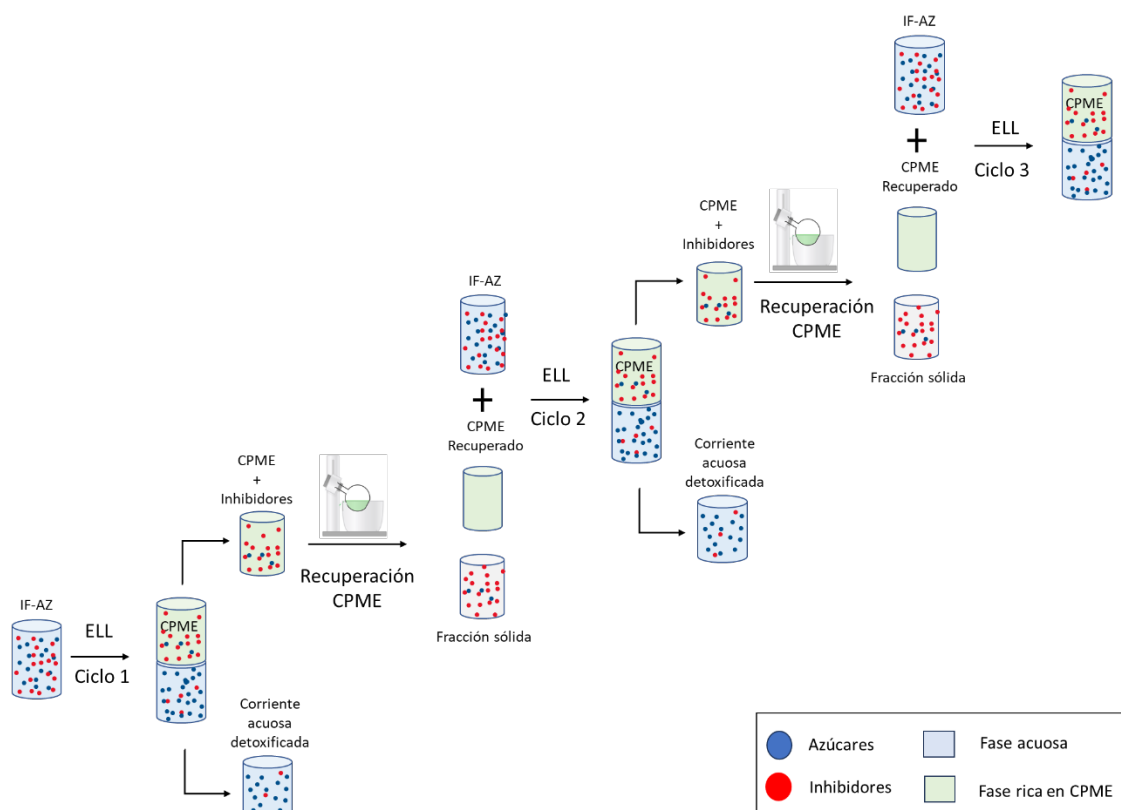


Figura 3.6. Esquema de recuperación del disolvente.

## 3.8. Cálculos computacionales

### 3.8.1. Optimización de la geometría molecular empleando Turbomole

Las estructuras moleculares de los compuestos no disponibles en la base de datos COSMOtherm (CPME, GVL) fueron optimizadas hasta su estado mínimo de energía utilizando el software Turbomole 7.3. [255] y la interfaz gráfica TmoleX [256]. Se seleccionó la base de cálculo def-TZVP (Triple Zeta Valencia Polarizada) para todos los átomos. Los cálculos del funcional de densidad (DFT-del inglés *Density functional theory*) se realizaron utilizando el método B88-P86 con el método funcional de correlación Perdew86 y la aproximación de intercambio de energía Becke88 con un comportamiento asintótico correcto [257]. Primero, para obtener los archivos \*.energy se realizó una optimización de la geometría en fase gas. A continuación, para obtener los archivos \*.cosmo se realizó un cálculo del tipo “single point” empleando el método de solvatación continua COSMO [214]. Esto permite obtener un archivo \*.cosmo con toda la

información necesaria para realizar los cálculos COSMO-RS [258]. Por último, se garantizó que las estructuras optimizadas presentan el mínimo nivel de energía (considerando los diferentes conformeros de los compuestos) mediante un cálculo de frecuencias vibracionales (“*single point*”), asegurando que todas estas frecuencias tengan valores positivos. Los compuestos que existen en las bases de datos COSMOtherm se utilizan como aparecen en el software.

### 3.8.2. Detalles computacionales del método COSMO-RS

Una vez obtenidos los archivos \*.cosmo, se introdujeron en el software COSMOtherm v.19 para determinar los distintos parámetros termodinámicos. Para los cálculos, se seleccionó la parametrización implícita en el software: BP\_TZVP\_19.

En las extracciones líquido-líquido, se ha estudiado mediante COSMO-RS la interacción de distintos compuestos de interés (fenol, *o*-cresol, guayacol, siringol, vainillina y glucosa), con los disolventes eutécticos y biodisolventes hidrofóbicos (C8-C10, C8-C12, C10-C12, 2MeTHF, CPME, LIM). En primer lugar, con el objetivo de asegurar que el método COSMO-RS puede predecir el comportamiento de las dos fases líquidas entre DE/biodisolventes y agua, se realizó un cálculo líquido-líquido (propiedad del diagrama de fases en COSMOthermX), activando "Buscar punto ELL" en los ajustes adicionales. Para ello, se seleccionó agua como primer compuesto y disolvente eutéctico (definido como líquido iónico teniendo en cuenta la relación molar de cada uno de los componentes) o biodisolvente como segundo compuesto. A continuación, se realizó el mismo cálculo para obtener las energías de Gibbs de exceso y las entalpías de exceso ( $H_{\text{exceso}}$ ) para cada sistema con el fin de estudiar las interacciones entre los solutos y los disolventes. Los cálculos se realizaron considerando las relaciones molares de los disolventes eutécticos y tomando mezclas equimolares de soluto/disolvente para realizar los análisis energéticos de los sistemas.

Con el objetivo de proporcionar una visión más profunda de las mezclas soluto/disolvente, las entalpías de exceso se dividieron en sus tres contribuciones energéticas (van der Waals, electrostática o Misfits, y enlace de hidrógeno) con el fin de analizar cuál o cuáles promueven las interacciones. Estas contribuciones fueron obtenidas, una vez más, activando las contribuciones detalladas computadas a  $H_{\text{exceso}}$  en los cálculos ELL. Por último, también se calcularon las solubilidades de los compuestos fenólicos en los disolventes evaluados en el trabajo mediante el método COSMO-RS. Para ello, se seleccionó la opción “Multiple Solutes

Solubility” en COSMOtherm con un ajuste adicional iterativo con el fin de garantizar la alta calidad de los resultados.

En las extracciones sólido-líquido, se ha utilizado COSMO-RS para comprender la interacción de la hesperidina (como referencia al ser el compuesto fenólico mayoritario en RSN) con los biodisolventes (2MeTHF, CPME, EL, DMI, CYR, GVL). En este caso, además de considerar la energía de Gibbs de exceso y la entalpía de exceso, la interacción se evaluó mediante los coeficientes de actividad a dilución infinita calculados a 25 °C. Estos datos se pueden obtener mediante la realización de un cálculo del tipo “*Activity Coefficient*” en COSMOthermX. Para mayor comprensión de la interacción entre los disolventes y los solutos, el coeficiente de reparto octanol/agua ( $K_{ow}$ ) también fue calculado utilizando el método COSMO-RS (cálculo del tipo logP/logD en el software activando la opción “*compute octanol-water partition*”). Este parámetro dará una idea del carácter hidrófobo o hidrófilo del compuesto a evaluar.



## **4. Resultados y discusión**



## 4.1. Extracción selectiva de inhibidores y azúcares

En este apartado se presentan y discuten los resultados obtenidos en la extracción líquida de inhibidores presentes en corrientes acuosas ricas en azúcares, empleando diferentes disolventes hidrófobos de origen natural. En concreto, se han utilizado disolventes eutécticos (DE) formados por ácidos carboxílicos (C8-C10, C8-C12, C10-C12) y biodisolventes (2MeTHF, CPME, LIM).

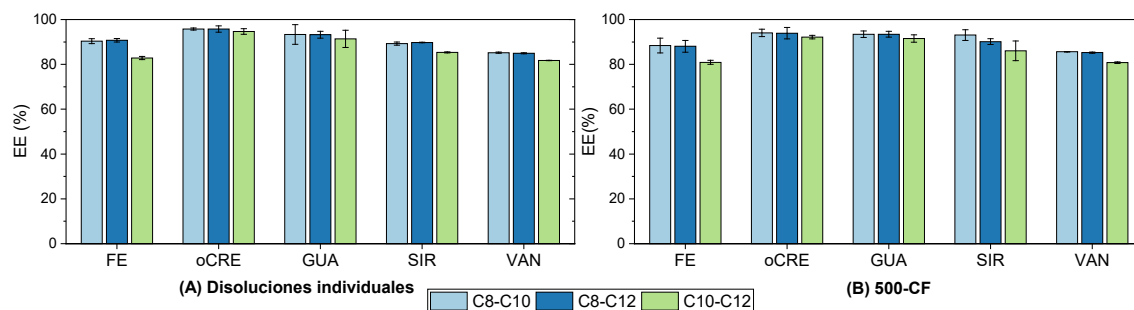
En una primera etapa se estudió la extracción de diferentes compuestos fenólicos individuales (fenol, o-cresol, guayacol, siringol y vainillina) en varias disoluciones acuosas de concentración 100 mg/L, con el fin de estudiar la interacción de estos compuestos con los diferentes disolventes. Posteriormente, con el objetivo de evaluar el efecto de la presencia de varios compuestos en la mezcla, se preparó una mezcla multicomponente de concentración 500 mg/L, constituida por estos cinco compuestos fenólicos. Esta mezcla multicomponente ha sido utilizada también para analizar el efecto de la concentración inicial (muestras 500-CF, 250-CF, 100-CF, 50-CF) y el efecto de la temperatura (muestra 500-CF a 25, 40 y 60 °C). A continuación, a esta mezcla de compuestos fenólicos se le añade también glucosa (muestra CF-GLU) para evaluar la afinidad de los disolventes hacia los compuestos fenólicos y el azúcar, y así seleccionar el más adecuado, analizando las interacciones moleculares existentes entre los solutos y los disolventes con el método COSMO-RS. A partir de todos estos ensayos previos se selecciona el disolvente que ofrece mejores resultados, en términos de eficiencia de extracción y selectividad, y se amplía el estudio a una mezcla sintética (muestra IF-AZ) formada por inhibidores de diferente naturaleza, 1000 mg/L de inhibidores de la fermentación (fenoles y furanos) y 50 g/L de tres azúcares (glucosa, sacarosa y fructosa). Esta mezcla se ha utilizado también para estudiar el efecto de la relación disolvente: muestra (D:M) y el tiempo de agitación a la hora de llevar a cabo la extracción selectiva de los inhibidores y los azúcares.

Finalmente, una vez establecidas las condiciones óptimas de la extracción de la muestra IF-AZ, se estudió la recuperación y reutilización del disolvente en varios ciclos consecutivos, con el objetivo de mejorar la viabilidad operacional y económica del proceso.

### 4.1.1. Extracción líquido-líquido de compuestos fenólicos

La eficiencia de extracción de los DE hidrófobos (C8-C10, C8-C12, C10-C12) se estudió en disoluciones acuosas de compuestos fenólicos individuales con una concentración de 100 mg/L

de fenol, *o*-cresol, guayacol, siringol y vainillina, respectivamente. Los resultados obtenidos, utilizando una relación D:M igual a 1, un tiempo de agitación de 15 min y una temperatura de 25 °C, se muestran en la **Figura 4.1 (A)** y en la **Tabla A.3**, disponible en el Anexo.



**Figura 4.1.** Comparación de la eficiencia de extracción de los DE hidrófobos (C8-C10, C8-C12, C10-C12): (A) disoluciones de compuestos fenólicos individuales (100 mg/L); (B) mezcla multicomponente de compuestos fenólicos (500-CF). Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación = 15 min; T = 25 °C; separación de fases: reposo durante la noche.

Como se puede observar en la **Figura 4.1 (A)**, la eficiencia de extracción es similar utilizando C8-C10 y C8-C12, para todos los compuestos fenólicos estudiados, y ligeramente inferior cuando se utiliza el disolvente C10-C12. Esto puede deberse a la menor viscosidad y menor tamaño de los DE formados con C8, lo que facilitaría la transferencia de masa del soluto hacia el disolvente, favoreciendo así la extracción [239]. Por el contrario, el DE C10-C12, más hidrófobo y de mayor tamaño, ofrece peores eficiencias de extracción. Esto sugiere que la extracción de los solutos estudiados se ve favorecida por el uso de los DE con la cadena más corta.

Con respecto al efecto de las estructuras de los compuestos fenólicos, la eficiencia de extracción sigue la tendencia general: *o*-cresol > guayacol > fenol > siringol > vainillina. Dado que el fenol es la molécula más simple de las estudiadas (un anillo de benceno con un grupo hidroxilo), se utiliza este compuesto como referencia. Si comparamos la extracción del fenol y el *o*-cresol, los mejores resultados se obtienen con este último (90 y 95%, respectivamente), lo cual puede ser debido a la presencia del grupo metilo (-CH<sub>3</sub>), que hace que la molécula sea más hidrófoba, disminuyendo su interacción con el agua y facilitando su transferencia al disolvente. Estos resultados concuerdan con los publicados por Sas *et. al* [165], quienes estudiaron la extracción del fenol y *o*-cresol con C8-C12 y C10-C12, y obtuvieron eficiencias de extracción del 95% para el *o*-cresol y del 75% para el fenol con el DE C8-C12, así como del 92% para el *o*-cresol y del 68% para el fenol con el DE C10-C12.

Por otro lado, comparando los resultados obtenidos con el fenol y el guayacol, se observa que la presencia del grupo metoxilo (-CH<sub>3</sub>O) mejora la extracción (90% de eficiencia de extracción

del fenol y 93% del guayacol con C8-C10 y C8-C12; 83% de eficiencia de extracción del fenol y 91% del guayacol con C10-C12). Sin embargo, los resultados obtenidos resaltan el hecho de que el número de grupo funcionales también es un factor importante, pues la eficiencia de extracción para el siringol, que tiene dos grupos  $-\text{CH}_3\text{O}$ , es menor que las alcanzadas para el guayacol y el fenol. En este caso, la estructura química del siringol podría fomentar un impedimento estérico mayor, lo que estaría limitando las interacciones soluto-disolvente y, en consecuencia, dando lugar a porcentajes de extracción más bajos. Este comportamiento ha sido previamente reportado por González *et. al* [162] en la extracción de fenol, guayacol y siringol utilizando DE hidrófobos formados con ácidos carboxílicos y mentol. Por último, la menor eficiencia de extracción se observa para la vainillina, lo que podría explicarse por la presencia de un grupo aldehído (CHO-), que tiene mayor polaridad que el grupo metoxilo, lo que podría estar promoviendo interacciones más fuertes con el agua y limitando su transferencia hacia disolvente.

En definitiva, la presencia de un grupo metoxilo o metilo en el compuesto fenólico mejora su extracción, debido a la mayor hidrofobicidad; sin embargo, cuando aumenta el número de grupos funcionales, o se incluyen grupos de mayor polaridad, se obtienen peores resultados debido al impedimento estérico y/o su mayor interacción con el agua.

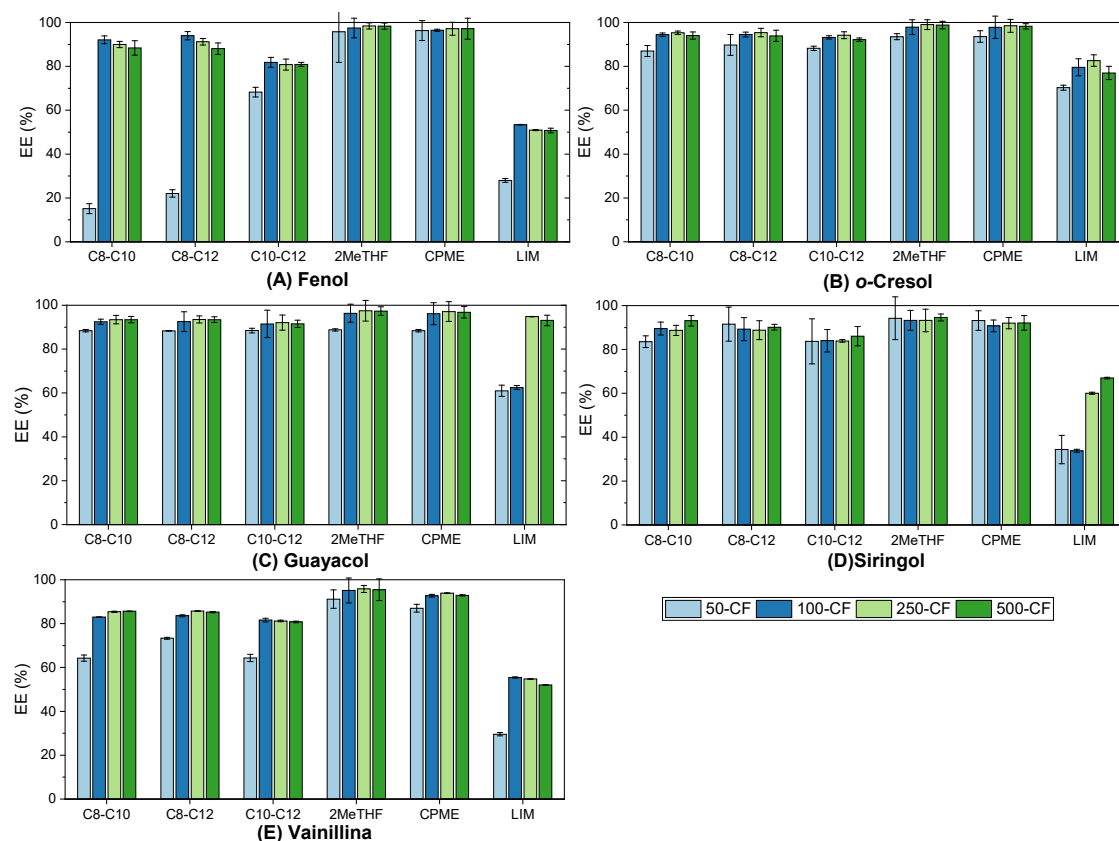
Tras estudiar la capacidad extracción de los DE hidrófobos para las disoluciones de compuestos fenólicos individuales, se estudió la extracción en una mezcla multicomponente, la cual contiene 100 mg/L de cada uno de los compuestos fenólicos (fenol, *o*-cresol, guayacol, siringol y vainillina); es decir, una concentración total de 500 mg/L de compuestos fenólicos (muestra 500-CF). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4.1 (B)**. Como se puede observar al comparar la **Figura 4.1 (A) y (B)**, tanto la eficiencia de extracción como las tendencias son similares a las observadas para las disoluciones de compuestos fenólicos individuales, lo que pone de manifiesto que la presencia de varios compuestos fenólicos en la mezcla no tiene un efecto importante sobre los porcentajes de extracción. Al igual que en el caso anterior, las mejores eficiencias de extracción se obtuvieron con los DE formados con C8 (C8-C10 y C8-C12), mientras que la eficiencia de extracción fue menor con C10-C12.

Dado que no se observaron diferencias importantes entre ambas disoluciones (compuestos fenólicos individuales y mezcla multicomponente) al emplear DE hidrófobos, el estudio se amplió a la extracción de la mezcla multicomponente (muestra 500-CF), utilizando también biodisolventes. En concreto, se incluyeron tres biodisolventes (2MeTHF, CPME y LIM) y, además,

se estudió el efecto de la concentración inicial y de la temperatura en la extracción de esta mezcla. Los resultados obtenidos se muestran en los siguientes apartados.

#### 4.1.1.1. Efecto de la concentración

Con el objetivo de estudiar el efecto de la concentración inicial de compuestos fenólicos en la eficiencia de extracción, la muestra 500-CF se diluyó para obtener varias disoluciones con una concentración total de inhibidores fenólicos de 250, 100, 50 mg/L. Estas muestras se denominaron 250-CF, 100-CF, 50-CF, respectivamente. La eficiencia de extracción de los DE hidrófobos (C8-C10, C8-C12, C10-C12) y biodisolventes (2MeTHF, CPME y LIM) en las muestras 50-CF, 100-CF, 250-CF y 500-CF se muestran en la **Figura 4.2** y también en la **Tabla A.4**, disponible en el Anexo.



**Figura 4.2.** Eficiencia de extracción de (A) fenol, (B) o-cresol, (C) guayacol, (D) siringol y (E) vainillina de los disolventes estudiados (C8-C10, C8-C12, C10-C12, 2MeTHF, CPME y LIM) a diferentes concentraciones iniciales de la mezcla multicomponente (50-CF, 100-CF, 250-CF y 500-CF). Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 15 min; T= 25 °C; separación de fases: reposo durante la noche.

De forma general, tal y como se puede observar en la **Figura 4.2**, el aumento de la concentración en las disoluciones objeto de estudio provoca una mejora significativa en la eficiencia de extracción de 50-CF a 100-CF para todos los disolventes estudiados. La menor extracción

obtenida con la muestra 50-CF podría deberse a que, a bajas concentraciones, las moléculas de interés están completamente rodeadas de agua. Esto dificulta su extracción a pesar de que los disolventes no están saturados y tienen capacidad para extraer una cantidad mayor de compuestos, como puede observarse con las disoluciones más concentradas [162,165]. Resultados similares han sido reportados por Sas *et al.* [259] en la extracción de fenol y *o*-cresol con distintos líquidos iónicos basados en el anión bis(trifluorometilsulfonil)imida, [NTf<sub>2</sub>], donde estudiaron el efecto de la concentración inicial desde 3 hasta 15.000 mg/L y concluyeron que el aumento de la concentración inicial mejoraba la eficiencia de extracción, posiblemente debido a la no saturación del disolvente.

Por otro lado, cuando la concentración inicial es superior a 100 mg/L, no se encontraron grandes diferencias en la eficiencia de extracción de los DE estudiados. Previamente, Sas *et al.* [165] obtuvieron resultados similares al estudiar el efecto de la concentración en la extracción de fenol y *o*-cresol con C8-C12 y C10-C12, concluyendo que cuando la concentración del compuesto fenólico es superior a 50 mg/L, la eficiencia de extracción permanece prácticamente constante. Además, Fan *et al.* [68] en la extracción de disoluciones de 4 a 282 mg/L de compuestos fenólicos (fenol, resorcinol, *p*-nitrofenol, guayacol y *o*-cresol) empleando distintos líquidos iónicos encontraron una eficiencia de extracción casi constante en función de la concentración.

Sin embargo, en nuestro trabajo, se observan algunas excepciones para la extracción de fenol con C8-C10 y C8-C12 cuando la concentración inicial es superior a 100 mg/L. En este caso, el aumento de la concentración inicial provocó una ligera disminución de la eficiencia de extracción, que podría atribuirse a la saturación de los disolventes para extraer el fenol. Resultados similares han sido descritos por González *et al.* [216], donde observaron un descenso en la eficiencia de extracción de fenol con el líquido iónico bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-hexil-1-metilpirrolidinio, [HMpyr][NTf<sub>2</sub>], al aumentar la concentración inicial del compuesto fenólico. Sin embargo, podrían requerirse investigaciones adicionales para corroborar este aspecto.

Con respecto a la extracción utilizando biodisolventes, es importante destacar que empleando 2MeTHF y CPME se alcanzaron eficiencias de extracción superiores al 87%, mejorando los resultados alcanzados con los DE. Al igual que sucede con los DE, en líneas generales, también se observó un ligero aumento de la eficiencia de extracción al aumentar la concentración inicial de 50 a 100 mg/L; sin embargo, no se observaron diferencias significativas al incrementar la concentración inicial de 100 a 500 mg/L, obteniéndose eficiencias de extracción superiores al 95% para todos los compuestos fenólicos. Estos resultados concuerdan con los publicados

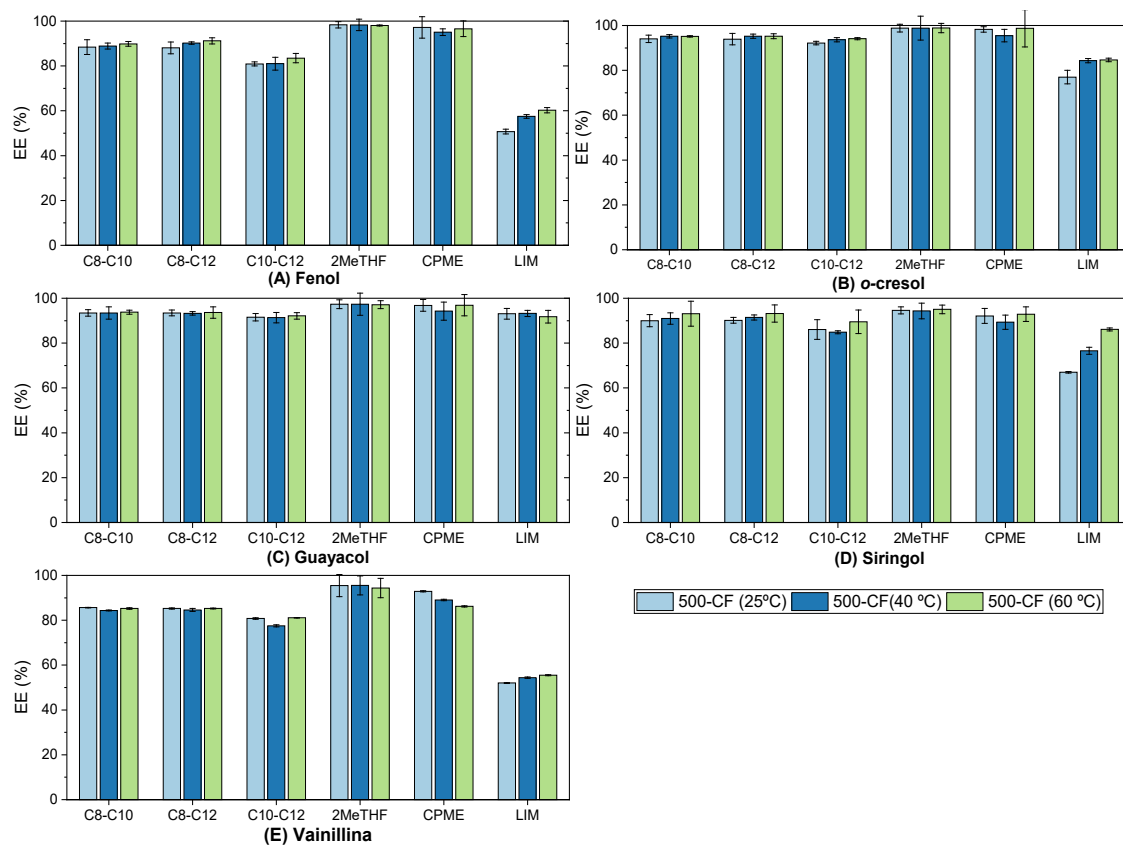
previamente para la extracción de diferentes ácidos fenólicos utilizando estos mismos biodisolventes, alcanzando eficiencias de extracción cercanas al 100% con 2MeTHF y CPME [176]. En cuanto a la estructura química de los compuestos fenólicos estudiados utilizando 2MeTHF y CPME, no se encontraron diferencias significativas en la extracción de fenol, *o*-cresol y guayacol, estando en torno al 97% en todos los casos, siendo ligeramente inferior para el siringol y la vainillina, lo que puede ser debido al mayor volumen molecular de estos dos compuestos, lo que provocaría un mayor impedimento estérico.

En relación con la extracción usando LIM como biodisolvente, se obtuvieron eficiencias de extracción menores. Este comportamiento puede atribuirse a interacciones más débiles entre el LIM y los compuestos de interés, fruto de impedimentos estéricos, así como a los grupos funcionales presentes en el LIM, los cuales no estarían favoreciendo la interacción con los compuestos fenólicos [176]. Para la extracción de fenol, *o*-cresol y vainillina con LIM, se encontró un aumento en la eficiencia de extracción al aumentar la concentración de 50 a 100 mg/L, pero no a concentraciones superiores a 100 mg/L. Sin embargo, para la extracción de guayacol y siringol se encontró una eficiencia de extracción considerablemente menor a una concentración inicial más baja. Este comportamiento posiblemente esté relacionado con una baja influencia del carácter hidrófobo de los grupos metoxilo presentes en estas moléculas a bajas concentraciones [165].

En resumen, se encontraron resultados de eficiencia de extracción más bajos para la muestra 50-CF en comparación con las muestras 100-CF, 250-CF y 500-CF, donde no se observaron variaciones relevantes en las eficiencias de extracción. Algunas excepciones fueron la extracción de fenol con C8-C10 y C8-C12, donde se encontró un efecto negativo en la eficiencia de extracción al aumentar la concentración inicial de 100 a 500 mg/L; y para la extracción de guayacol y siringol con LIM, donde el aumento de la concentración inicial mejoró los rendimientos de extracción.

#### **4.1.1.2. Efecto de la temperatura**

En este apartado, se estudia el efecto de la temperatura a partir de la Muestra 500-CF, realizando la extracción a tres temperaturas diferentes (25, 40 y 60 °C) y empleando como disolvente los tres DE hidrófobos (C8-C10, C18-C12, C10-C12) y los tres biodisolventes (2MeTHF, CPME y LIM). Los resultados obtenidos en la extracción, utilizando una relación D:M = 1 y un tiempo de agitación de 15 min, se muestran en la **Figura 4.3** y en la **Tabla A.5**, disponible en el Anexo.



**Figura 4.3.** Eficiencia de extracción de (A) fenol, (B) o-cresol, (C) guayacol, (D) siringol y (E) vainillina con los disolventes ensayados (C8-C10, C8-C12, C10-C12, 2MeTHF, CPME y LIM) a diferentes temperaturas (25, 40 y 60 °C) para la disolución 500-CF. Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 15 min;  $C_0$ = 500 mg/L (100 mg/L de cada compuesto fenólico); separación de fases: reposo durante la noche.

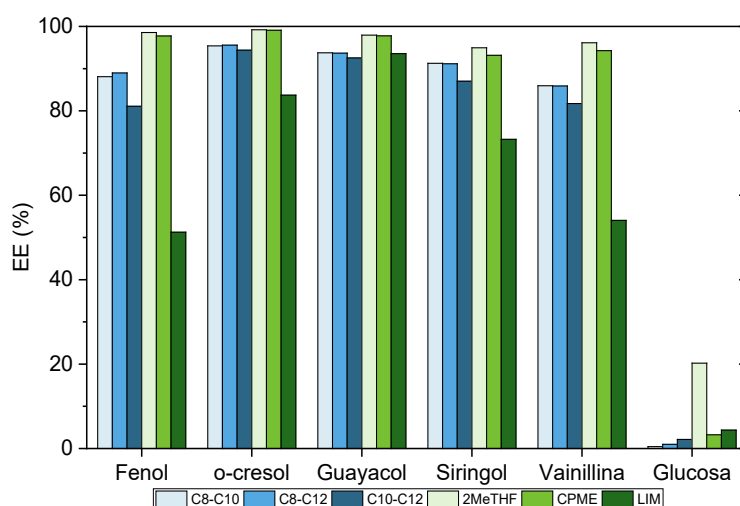
En general, tal y como se puede observar en la **Figura 4.3**, el aumento de la temperatura no mostró una mejora significativa en la eficiencia de la extracción, excepto cuando se utilizó el limoneno. No obstante, incluso a la temperatura más alta, la extracción con este disolvente es inferior en comparación con el resto de los disolventes estudiados. En todos los casos, los mejores resultados se obtuvieron con el 2MeTHF y el CPME, corroborando así la capacidad de estos dos biodisolventes para llevar a cabo la extracción de compuestos fenólicos a partir de medios acuosos. En investigaciones previas, Sas *et al.* [259] han reportado resultados similares para la extracción de fenol y *o*-cresol utilizando distintos líquidos iónicos basados en el anión bis(trifluorometilsulfonyl)imida, [NTf<sub>2</sub>]. Estos autores estudiaron el efecto de la temperatura en el rango 15 - 45 °C y no observaron una variación significativa en la eficiencia de extracción al incrementar la temperatura. Por otro lado, en el estudio llevado a cabo por Sidek *et al.* [260], donde se investigó el efecto de la temperatura en la extracción de fenol con líquidos iónicos basados en imidazol, encontraron que se obtienen mejores eficiencias de extracción a temperatura ambiente.

Aunque la temperatura puede ejercer un efecto significativo en el proceso de extracción, se considera un parámetro más influyente en la extracción sólido-líquido. En el caso de extracción líquido-líquido, el aumento de la temperatura puede mejorar ligeramente la eficiencia de extracción al disminuir la viscosidad y, por tanto, mejorar el contacto y la transferencia de materia. Sin embargo, los disolventes utilizados tienen una viscosidad bastante baja, lo que facilita el proceso de extracción sin necesidad de aplicar temperatura, lo cual a su vez supone un ahorro energético. Por otro lado, el aumento de la temperatura también puede favorecer la miscibilidad de ambas fases, lo que podría dificultar la extracción [176,261].

En resumen, los disolventes C8-C10, C18-C12, C10-C12, 2MeTHF y CPME han demostrado una eficacia destacada en la extracción líquido-líquido de compuestos fenólicos. Estos disolventes logran una alta eficiencia de extracción sin necesidad de aumentar la temperatura, lo que resulta en una reducción de los costes asociados al calentamiento.

#### 4.1.2. Extracción líquido-líquido de compuestos fenólicos y glucosa

Con el objetivo de estudiar la afinidad de los disolventes hacia los compuestos fenólicos y su capacidad para separarlos de la glucosa, se realizó la extracción de la muestra CF-GLU, que contiene 500 mg/L de compuestos fenólicos (100 mg/L de fenol, o-cresol, guayacol, siringol y vainillina) y 50 g/L de glucosa. La eficiencia de extracción de los disolventes estudiados utilizando una relación D:M igual a 1, un tiempo de agitación de 15 min y una temperatura de 25 °C, se muestra en la **Figura 4.4** y en la **Tabla A.6** disponible en el Anexo.



**Figura 4.4.** Eficiencia de extracción de los disolventes (C8-C10, C8-C12, C10-C12, 2MeTHF, CPME y LIM) para la muestra CF-GLU. Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 15 min; T= 25 °C; C<sub>0</sub> compuestos fenólicos= 500 mg/L; C<sub>0</sub> glucosa= 50 g/L; separación de fases: reposo durante la noche.

Tal y como se puede observar en la **Figura 4.4**, las tendencias obtenidas para la extracción de compuestos fenólicos en presencia de glucosa fueron similares a las obtenidas en ausencia de ésta (**Figura 4.3**), por lo que la presencia de este azúcar no parece influir en la extracción de los compuestos fenólicos. En concreto, con 2MeTHF y CPME se obtuvieron eficiencias de extracción superiores al 95% para los compuestos fenólicos, incluso en presencia del azúcar.

Por otro lado, se obtuvieron resultados prometedores al estudiar el comportamiento de los disolventes para extraer glucosa en la mezcla CF-GLU, ya que las eficiencias de extracción fueron muy bajas, lo que pone de manifiesto la baja afinidad de estos disolventes por este azúcar. La mayor eficiencia de extracción de glucosa fue del 20% al utilizar 2MeTHF, pero no superó el 4% con el resto de los disolventes.

La selectividad de los disolventes estudiados en la muestra CF-GLU (S), calculada a partir de la **Ecuación 6**, se presenta en la **Tabla 4.1**. Tal y como se puede observar, los valores de S obtenidos son significativamente superiores a 1, por lo que la separación de los inhibidores fenólicos y la glucosa es posible con todos los disolventes. La alta selectividad hacia los compuestos fenólicos y los bajos porcentajes de extracción para la glucosa pueden explicarse considerando la baja afinidad entre la glucosa y los disolventes, atribuida al gran número de grupos hidroxilo en la molécula. Estos grupos, además, proporcionan fuertes interacciones de enlace de hidrógeno entre la glucosa y el agua, ya que son sustituyentes hidrófilos que reducen la afinidad hacia los disolventes apolares [262].

**Tabla 4.1.** Selectividad de los disolventes estudiados en la extracción de la muestra CF-GLU. Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 15 min; T= 25 °C;  $C_o$  compuestos fenólicos= 500 mg/L;  $C_o$  glucosa= 50 g/L.

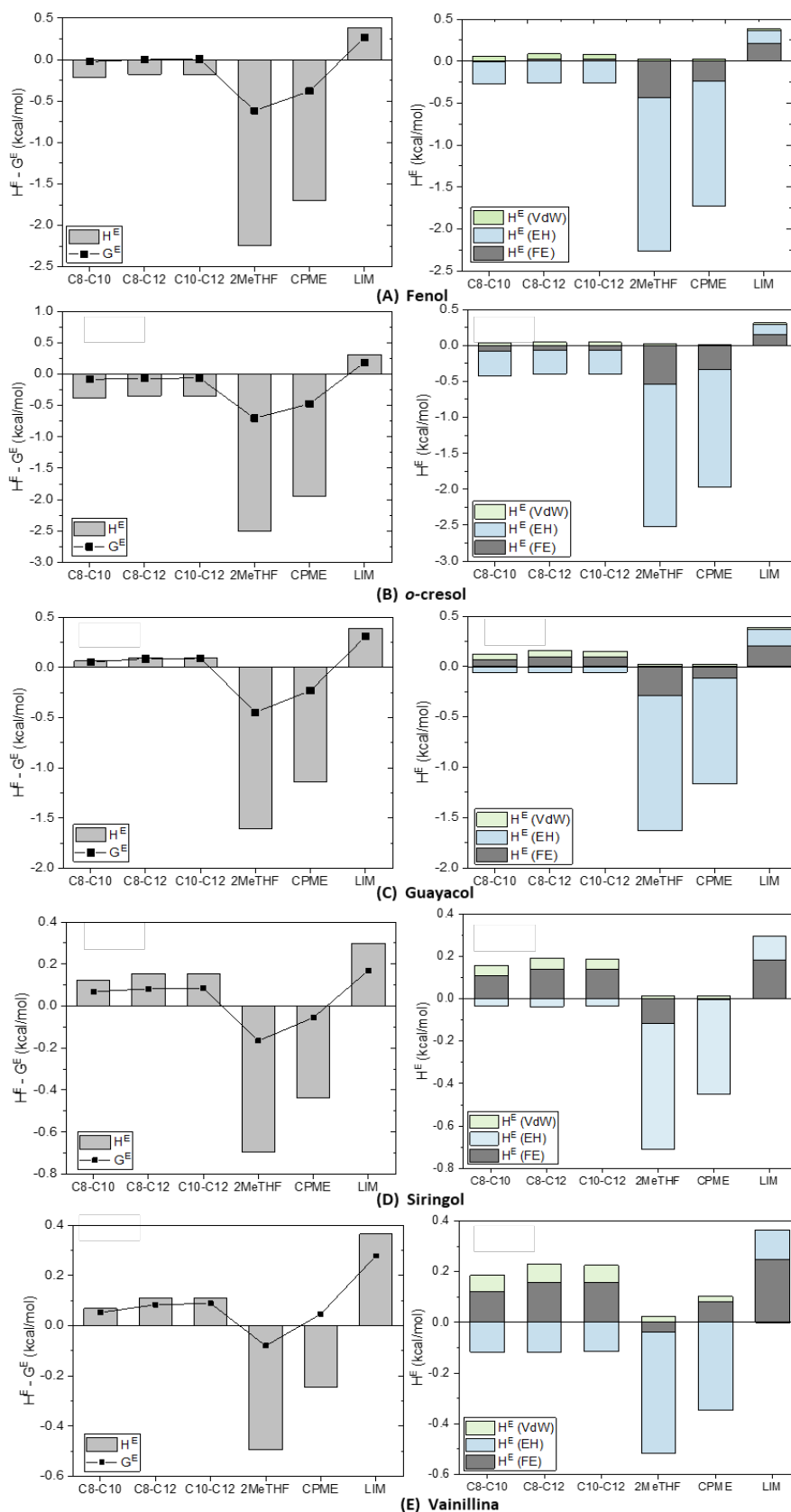
Disolvente	S
C8-C10	2224
C8-C12	1019
C10-C12	316
2MeTHF	145
CPME	800
LIM	54

Comparando la selectividad de los disolventes estudiados, los valores más altos de selectividad se obtuvieron con C8-C10 y C8-C12 (S =2224 y 1019, respectivamente), ya que su eficiencia de extracción de glucosa fue cercana a cero. De forma general, los DE hidrófobos fueron los disolventes más selectivos, pero con una menor eficiencia de extracción de compuestos fenólicos (EE= 85-95%). Sin embargo, el biodisolvente CPME mostró una selectividad elevada (S=800), con eficiencias de extracción de compuestos fenólicos superiores al 93% (EE = 93-99%) y de glucosa inferiores al 4%. Las selectividades proporcionadas por 2MeTHF y LIM fueron las

más bajas obtenidas, lo que puede explicarse por la mayor eficiencia de extracción de glucosa empleando 2MeTHF, y la menor eficiencia de extracción de compuestos fenólicos con LIM.

Estos resultados evidencian que los disolventes estudiados podrían utilizarse para extraer selectivamente compuestos fenólicos de disoluciones acuosas ricas en glucosa. Por lo tanto, un proceso de separación basado en la extracción selectiva de compuestos fenólicos utilizando estos disolventes podría ser un enfoque adecuado para llevar a cabo el proceso de detoxificación. En concreto, el biodisolvente CPME proporcionó una alta selectividad ( $S=800$ ), manteniendo la eficiencia de extracción de los compuestos fenólicos superior al 93%, por lo que será el utilizado para llevar a cabo la separación selectiva de inhibidores y azúcares presentes en una mezcla acuosa sintética formada por un mayor número de compuestos inhibidores y azúcares, tal y como se detalla en el **apartado 4.1.3**.

La interacción de los compuestos de interés (fenol, *o*-cresol, guayacol, siringol y vainillina) con los disolventes estudiados ha sido evaluada mediante cálculos con el modelo COSMO-RS. En la **Figura 4.5** se presentan la energía de Gibbs y la entalpía de exceso (en el lado izquierdo), así como las distintas contribuciones a la entalpía (fuerzas de Van der Waals, fuerzas electrostáticas, y enlace de hidrógeno) (en el lado derecho), para las siguientes mezclas equimolares: fenol/disolvente, *o*-cresol/disolvente, guayacol/disolvente, siringol/disolvente y vainillina/disolvente.



**Figura 4.5.** Energía de Gibbs y entalpía de exceso (izquierda) y contribuciones a la entalpía de exceso (VdW, EH, FE) (derecha), para las siguientes mezclas equimolares: (A) fenol/disolvente, (B) o-cresol/disolvente, (C) guayacol/disolvente, (D) siringol/disolvente y (E) vainillina/disolvente.

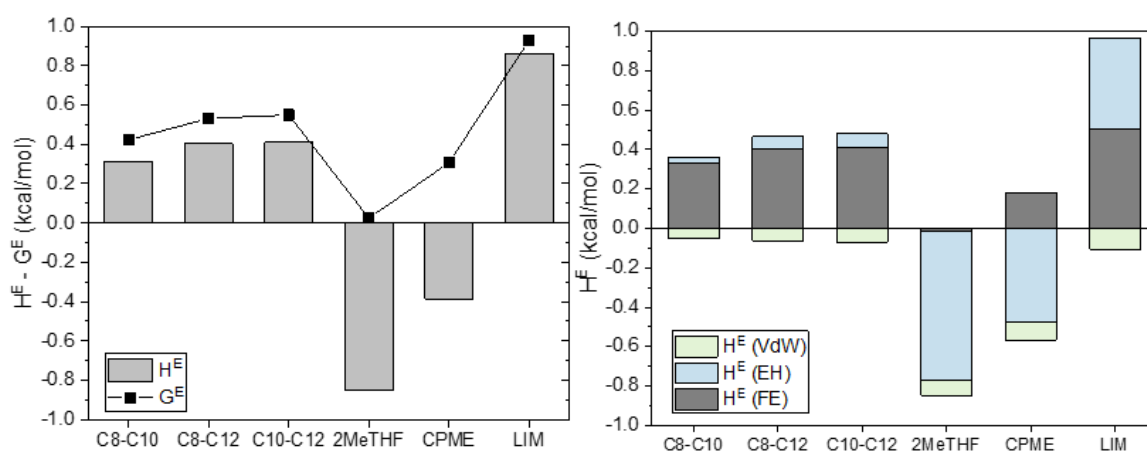
En primer lugar, como se observa en la **Figura 4.5** las mezclas fenol/disolventes y *o*-cresol/disolventes presentan un comportamiento termodinámico favorable al tener la energía de Gibbs y la entalpía de exceso negativa, para todos los disolventes estudiados excepto con LIM. La energía de Gibbs negativa significa que el proceso es espontáneo, por lo que la transferencia de la muestra al disolvente ocurrirá de manera natural. Además, la entalpía de exceso negativa favorece la extracción, ya que no es necesario aplicar calor para que se produzca [263]. Por otro lado, las mezclas guayacol/disolvente,iringol/disolvente y vainillina/disolvente muestran una energía de Gibbs y entalpía de exceso positiva, lo que significa que el proceso de extracción no se encuentra favorecido, con excepción de los biodisolventes 2MeTHF y CPME.

En el caso de los DE hidrófobos, la energía de Gibbs no muestra diferencias significativas entre los tres DE, siendo ligeramente inferior para el DE C8-C10, lo que está en concordancia con los resultados obtenidos experimentalmente, ya que con energías de Gibbs inferiores el proceso está más favorecido y con el DE C8-C10 la eficiencia de extracción fue ligeramente superior. Por otro lado, como se observa en las gráficas de la derecha, en la interacción con los DE predominan los enlaces de hidrógeno, al mostrar valores negativos, mientras que las interacciones electrostáticas y de Van der Waals no favorecen el proceso (valores positivos), salvo para el sistema *o*-cresol/DE, donde las fuerzas electrostáticas también están favorecidas en la mezcla.

En cuanto a los biodisolventes, se puede observar que el 2MeTHF presenta un comportamiento más exotérmico en su interacción con los compuestos fenólicos en comparación con el resto de los disolventes, lo que explica la mayor eficiencia de extracción obtenida experimentalmente con este compuesto. Esto se debe principalmente a la capacidad del 2MeTHF para formar enlaces por puente de hidrógeno con estos compuestos, como se evidencia en la figura que muestra las contribuciones entálpicas (parte derecha de la **Figura 4.5**). Respecto al biodisolvente CPME, este compuesto también forma mezclas altamente exotérmicas con los compuestos fenólicos, aunque la mezcla está ligeramente menos favorecida que con el 2MeTHF, lo que muestra buena concordancia con los resultados experimentales. En este caso, la contribución del enlace de hidrógeno también es la que rige la mezcla. Por último, el LIM es el único de los biodisolventes evaluados que presenta mezclas endotérmicas y desfavorables con los compuestos fenólicos, principalmente porque es el único disolvente que presenta contribuciones de enlaces de hidrógeno desfavorables, lo que explica las bajas eficiencias de extracción proporcionadas experimentalmente por este disolvente.

Para comprender los valores de selectividad obtenidos experimentalmente, también se ha estudiado la energía de Gibbs y la entalpía de exceso para las mezclas glucosa/disolvente, cuyos

resultados se muestran en la **Figura 4.6**. En general, los valores de energía de Gibbs y entalpía de exceso obtenidos para la glucosa son menos negativos que los obtenidos para los compuestos fenólicos. Esto indica que los disolventes estudiados en esta Tesis Doctoral tienen mayor afinidad por los compuestos fenólicos, lo que posibilita la extracción selectiva de estos compuestos en presencia de glucosa. Estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos experimentalmente. Los DE hidrófobos presentan mezclas desfavorables con la glucosa porque la formación de enlaces de hidrógeno no se ven favorecida. En cambio, el 2MeTHF y el CPME forman mezclas exotérmicas con la glucosa, ya que en estos casos sí se favorece la formación de enlaces de hidrógeno, lo que resulta en valores de selectividad más bajos.



**Figura 4.6.** Energía de Gibbs y entalpía de exceso (izquierda) y contribuciones de a la entalpía de exceso (VdW, EH, FE) (derecha), para la mezcla equimolar glucosa/disolvente.

En resumen, las predicciones realizadas con COSMO-RS concuerdan con las tendencias experimentales obtenidas. Por consiguiente, el método COSMO-RS puede resultar útil tanto para explicar el comportamiento experimental como para predecir las tendencias de la selectividad de cada disolvente.

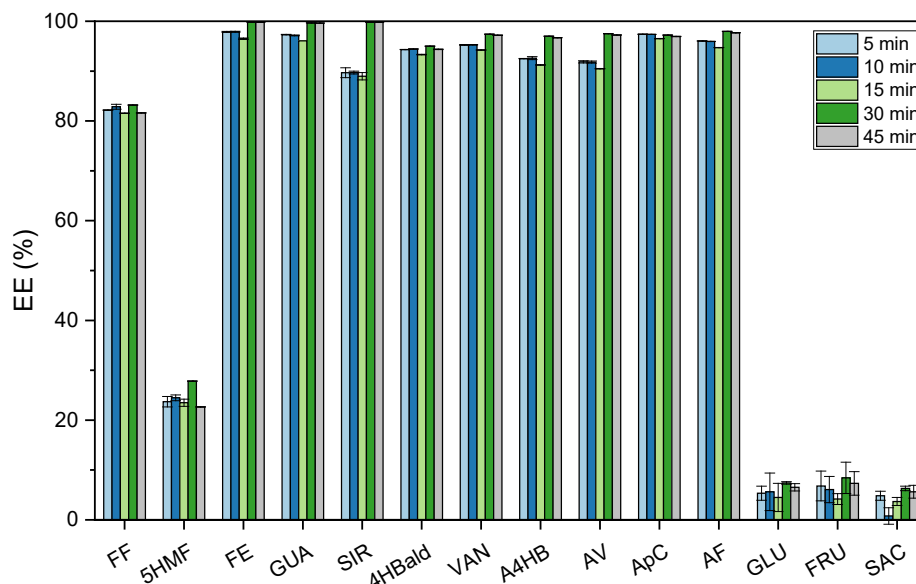
### 4.1.3. Extracción líquido-líquido de inhibidores y azúcares

Tras confirmar que los disolventes previamente estudiados, especialmente el CPME, permiten la extracción selectiva de compuestos fenólicos y glucosa, se decide ampliar el estudio a una mezcla sintética formada por un mayor número de compuestos, utilizando CPME como disolvente. Para ello, se parte de una mezcla formada por inhibidores de diferente naturaleza (compuestos fenólicos y furanos) y azúcares (glucosa, sacarosa y fructosa). La mezcla sintética estudiada, denominada IF-AZ, está formada por 1000 mg/L de cada inhibidor de la fermentación

(furfural, 5-hidroximetilfurfural, fenol, guayacol, siringol, 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico), junto con 50 g/L de cada uno de los azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa). Al tratarse de una mezcla más compleja, constituida por más compuestos y concentraciones superiores, esta mezcla se utilizó también para optimizar el tiempo de agitación y la relación disolvente: muestra.

#### 4.1.3.1. Efecto del tiempo de agitación

En este apartado, se estudia el efecto del tiempo de agitación en la extracción de la mezcla IF-AZ empleando CPME como disolvente. Los resultados obtenidos en la eficiencia de extracción del CPME en función del tiempo de agitación (5, 10, 15, 30, 45 min), utilizando una relación D:M igual a 1 y temperatura de agitación de 25 °C, se muestran en la **Figura 4.7** y en la **Tabla A.7**, disponible en el Anexo.



**Figura 4.7.** Eficiencia de extracción del CPME en la mezcla sintética IF-AZ a diferentes tiempos de agitación (5, 10, 15, 30, 45 min). Condiciones experimentales: relación muestra: disolvente=1; t agitación= 5, 10, 15, 30 y 45 min; T= 25 °C; separación de fases: reposo durante la noche.

Como se puede observar en la **Figura 4.7**, para todos los compuestos estudiados (compuestos fenólicos, furanos y azúcares) la eficiencia de extracción aumenta durante los primeros 30 min, manteniéndose prácticamente constante, o disminuyendo ligeramente, al aumentar el tiempo de agitación. Esto puede deberse a que, a los 30 min de extracción, se haya alcanzado el equilibrio, pues de acuerdo con la segunda ley de difusión de Fick, la transferencia de materia del soluto de la fase acuosa al disolvente sólo se produce hasta que el sistema alcanza el equilibrio [264]. Por otro lado, cuando la extracción supera los 30 min, se empieza a observar

una disminución en la eficiencia de extracción, lo cual puede atribuirse a que, por la naturaleza de los compuestos estudiados, se esté produciendo su degradación por influencia de la luz o del aire [265–267]. Anteriormente, Cañadas *et al.* [163] han reportado comportamientos similares en la extracción de compuestos fenólicos derivados de la vainilla utilizando CPME, observando un máximo de eficiencia de extracción de vainillina y ácido vanílico a 30 min de extracción, y disminuyendo ligeramente cuando se realiza la extracción a tiempos superiores. Llano *et al.* [268] en el estudio de la extracción líquido-líquido de corrientes ricas en compuestos fenólicos generadas en el tratamiento de Eucalipto (licor de sulfito), utilizando para ello disolventes tradicionales (cloroformo y dietiléter) y tiempos de extracción entre 10 y 390 min, también encontraron que el equilibrio de extracción se alcanza en los primeros minutos, siendo suficientes 30 min para llevar a cabo la extracción. Por otro lado, en el estudio de Sas *et al.* [269] sobre la extracción de *o*-cresol con el líquido iónico bis(fluorosulfonil)amida de 1-etilmetilimidazol, [C<sub>2</sub>mim]FSI, se reportó que una vez alcanzado el equilibrio, la influencia del tiempo de agitación es pequeña y el porcentaje de eficiencia de extracción permanece prácticamente constante.

De cara a evaluar al efecto de la estructura química de los inhibidores en la extracción, los compuestos de interés se dividen en varias categorías: furanos (FF y 5HMF), fenoles simples (FE, GUA, SIR), aldehídos fenólicos (4HBald, VAN) y ácidos fenólicos (AV, ApC y AF). Al comparar la eficiencia de extracción entre estas categorías, se observa la siguiente tendencia general: los compuestos fenólicos simples muestran una mayor eficiencia de extracción en comparación con los ácidos fenólicos, seguidos por los aldehídos fenólicos y los furanos. En resumen, se observa que las estructuras químicas más sencillas, como los compuestos fenólicos simples, muestran mejores eficiencias de extracción.

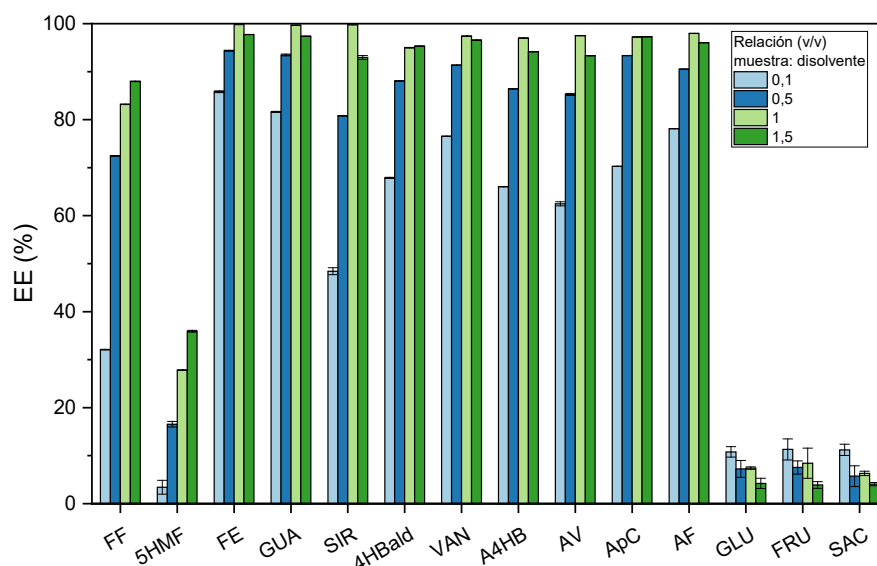
Si nos fijamos en la extracción de los furanos a 30 min, se puede observar que la eficiencia de extracción del furfural ( $EE_{FF} = 83,2\%$ ) es muy superior a la alcanzada con el 5-hidroximetilfurfural ( $EE_{5HMF} = 27,8\%$ ). A pesar de la similitud estructural entre el FF y 5HMF, ambos con un anillo furano y un grupo formilo, podría esperarse una compatibilidad similar con el disolvente. Sin embargo, la presencia de del grupo hidroximetilo en el 5HMF le confiere un comportamiento aceptor y donante de enlace de hidrógeno más fuerte, lo que dificulta su extracción de medios acuosos en comparación con el FF [270]. En el caso de los compuestos fenólicos simples, una vez alcanzado el equilibrio, los tres compuestos (FE, GUA, y SIR) alcanzan una eficiencia de extracción cercana al 100% ( $EE_{FE} = 99,8\%$ ;  $EE_{GUA} = 99,7\%$ ;  $EE_{SIR} = 99,8\%$ ). En la extracción de los aldehídos fenólicos, la eficiencia de extracción obtenida en el equilibrio fue  $VAN > 4HBald$  ( $EE$

$VAN = 97,4\%$ ;  $EE_{4HBAld} = 95,0\%$ ). La molécula vainillina, con un grupo funcional metoxilo, es más hidrófoba y su extracción es más favorable en comparación con el 4-hidroxibenzaldehído. Además el grupo funcional metoxilo en la vainillina le otorga un carácter más apolar, lo que podría estar facilitando su extracción [162]. Por último, para los tres ácidos fenólicos se obtiene una eficiencia de extracción similar al alcanzar el equilibrio ( $EE_{A4HB} = 97,0\%$ ;  $EE_{AV} = 97,5\%$ ;  $EE_{APC} = 97,2\%$ ;  $EE_{AF} = 98,0\%$ ). Resultados similares han sido reportados por Cañadas *et al.* [176] en estudio de la extracción de ácidos fenólicos con CPME en relación disolvente: muestra igual a 1, a temperatura ambiente y durante 30 min de agitación, donde se obtuvieron eficiencias de extracción superior al 96%.

En cuanto a la selectividad en la extracción de la mezcla IF-AZ, se observa que el CPME es un buen disolvente para la extracción selectiva de inhibidores y azúcares. Para la mezcla sintética IF-AZ, el CPME mantiene una alta selectividad, logrando una eficiencia de extracción superior al 95% para los compuestos fenólicos con 30 min de extracción, mientras que para los furanos FF y 5HMF alcanza una eficiencia de extracción de 83 y 28%, respectivamente. Sin embargo, la extracción de los azúcares de la disolución no superó el 8%. En resumen, el biodisolvente CPME resulta adecuado para la extracción selectiva de inhibidores de la fermentación en presencia de azúcares, alcanzando un equilibrio en la extracción a los 30 min.

#### **4.1.3.2. Efecto de la relación disolvente: muestra**

Una vez establecido el tiempo óptimo de extracción de la mezcla sintética de inhibidores y azúcares, IF-AZ, fijado en 30 min, se estudió el efecto de la relación disolvente: muestra, con el fin de evaluar la cantidad óptima de disolvente necesario para llevar a cabo la extracción. En concreto, se analizó el efecto de la relación disolvente: muestra (0,1; 0,5; 1; 1,5) en la extracción de la mezcla IF-AZ, durante 30 min de agitación a 25 °C, empleando CPME: los resultados se presentan en la **Figura 4.8** y **Tabla A.8**, disponible en el Anexo.



**Figura 4.8.** Eficiencia de extracción del CPME en la mezcla sintética IF-AZ con diferentes relaciones muestra: disolvente (0,1; 0,5; 1; 1,5). Condiciones experimentales:  $t$  agitación= 30 min;  $T$ = 25 °C; separación de fases: reposo durante la noche.

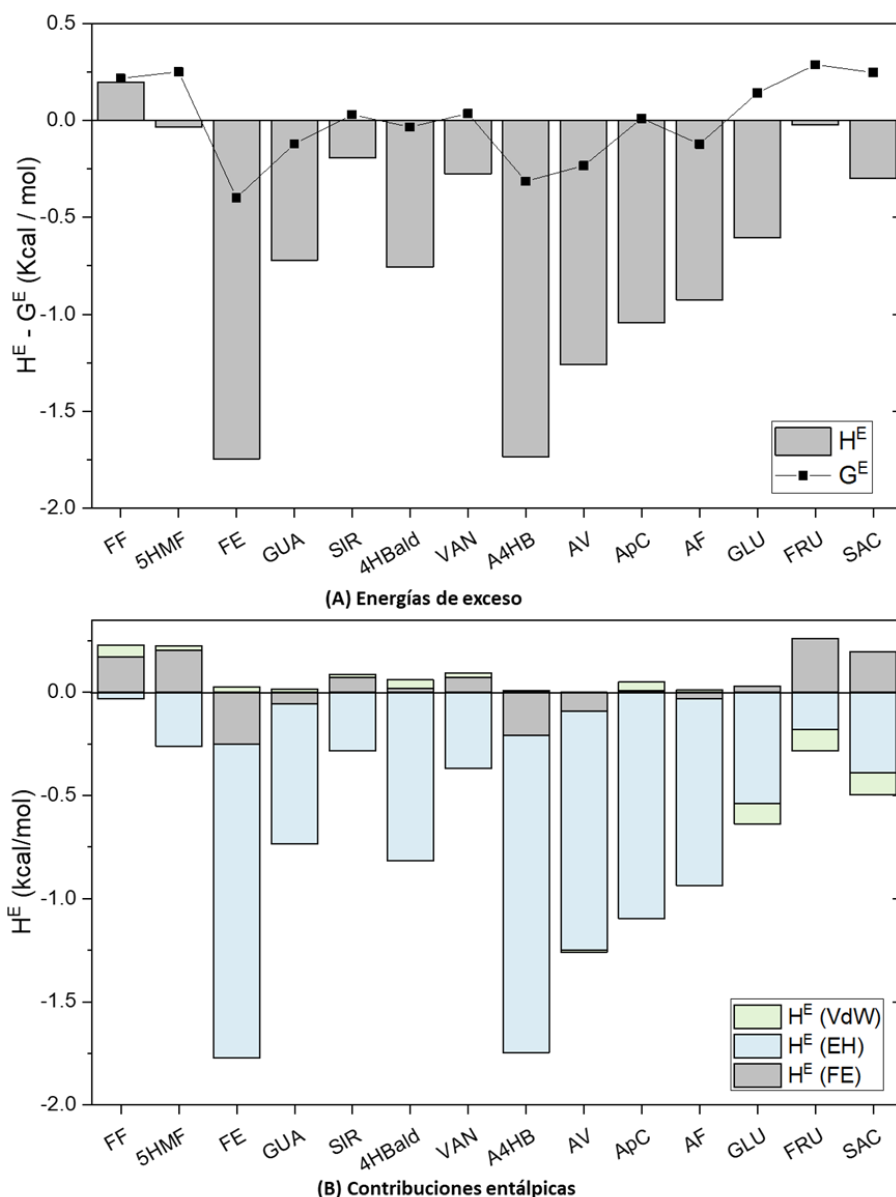
Como puede observarse en la **Figura 4.8**, al aumentar la cantidad de disolvente utilizado en la extracción se observa un notable aumento en la eficiencia de extracción hasta alcanzar la relación disolvente: muestra igual a 1 para todos los inhibidores estudiados (furanos y compuestos fenólicos). Resultados similares han sido reportados por Cañadas *et al.* [176] en la extracción de ácidos fenólicos con CPME, donde se estudió el efecto de la relación D:M (0,25; 0,5; 1), encontrando un máximo de eficiencia de extracción con la relación muestra disolvente igual a 1. En relaciones D:M inferiores a uno, la disponibilidad del disolvente disminuye al quedar dispersa en un mayor volumen de fase acuosa, dificultando la extracción [68,70]. Sin embargo, con una relación disolvente: muestra de 1,5, donde la cantidad de disolvente es mayor que la de muestra, se puede observar un aumento en la eficiencia de extracción para el FF y 5HMF, probablemente debido a la no saturación del disolvente para extraer estos compuestos. Sin embargo, en la extracción de compuestos fenólicos se produce un ligero descenso en la eficiencia de extracción al aumentar el volumen de disolvente utilizado, menos para 4-hidroxibenzaldehído y ácido *p*-cumárico, donde se mantiene prácticamente constante.

En cuanto a la extracción de azúcares, se puede observar la misma tendencia para los tres azúcares estudiados, donde la eficiencia de extracción disminuye al aumentar la cantidad de disolvente utilizado.

Tras evaluar estos resultados, se puede concluir que los mejores resultados en términos de eficiencia, selectividad y consumo de disolvente se obtienen con la relación disolvente: muestra igual a 1.

#### 4.1.3.3. Análisis termodinámico mediante el método COSMO-RS

La interacción de los compuestos de interés (furfural, 5-hidroximetilfurfural, fenol, guayacol, siringol, 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico) con el disolvente CPME ha sido estudiada mediante cálculos COSMO-RS. En la **Figura 4.9 (A)** se muestran la energía de Gibbs y la entalpía de exceso y la **Figura 4.9 (B)** las distintas contribuciones a la entalpía (fuerzas de Van der Waals, fuerzas electrostáticas, y enlace de hidrógeno), para las mezclas equimolares formadas por los diferentes inhibidores y el CPME.



**Figura 4.9.** (A) Energía de Gibbs y entalpía de exceso y (B) contribuciones de a la entalpía de exceso (VdW, EH, FE), para la mezcla equimolar soluto/CPME.

Como puede observarse en la **Figura 4.9 (A)**, en todos los sistemas estudiados, la contribución de la entalpía gobierna el proceso, al ser más negativa que la energía libre de Gibbs. Por otro lado, las mezclas más favorables son las de compuestos fenólicos/CPME, ya que tanto la energía de Gibbs como la entalpía de exceso son negativas, a excepción de la interacción con SIR y VAN, donde la energía de Gibbs es positiva pero cercana al cero. En el caso de los furanos y los azúcares la energía libre de Gibbs es positiva, lo que explica la menor eficiencia de extracción de este disolvente con estos compuestos. Estos datos concuerdan con los resultados experimentales, donde la eficiencia de extracción de los compuestos fenólicos fue mayor que para el resto de los compuestos estudiados.

Por otro lado, como se observa en la **Figura 4.9 (B)**, los enlaces de hidrógeno gobiernan el proceso, al tener una contribución negativa en todos los sistemas estudiados. En el caso de los furanos, especialmente con el furfural, la interacción por enlaces de hidrógeno es muy pequeña, mostrando una interacción positiva por fuerzas electrostáticas y de Van der Waals, indicando que la interacción no está favorecida. Por otro lado, con los compuestos fenólicos, los resultados muestran una gran interacción por enlaces de hidrógeno entre éstos y el CPME. Todos los compuestos fenólicos muestran una contribución positiva por fuerzas de Van der Waals, menos el ácido vanílico, que muestra una ligera contribución negativa por este tipo de interacción. Por último, como puede observarse, la interacción entre los azúcares y el CPME también está gobernada por los enlaces de hidrógeno, pero con una significativa contribución negativa de fuerzas de Van der Waals. En el caso de la fructosa y la sacarosa, muestran una contribución positiva por fuerzas electrostáticas, lo que explica la baja interacción de estos compuestos con el disolvente.

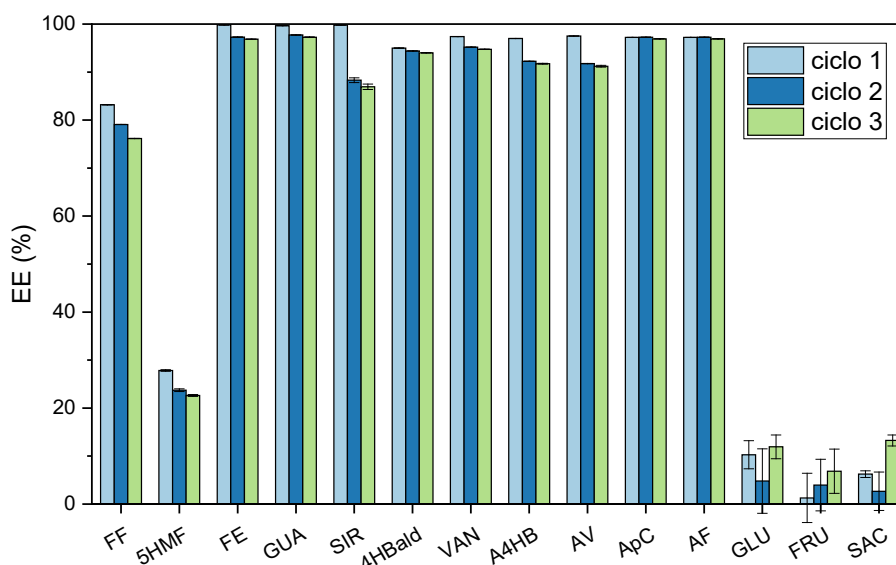
En general los cálculos COSMO-RS concuerdan con las tendencias experimentales, donde la interacción con los compuestos fenólicos es favorable, obteniéndose alta eficiencia de extracción. Sin embargo, la interacción con los azúcares no está favorecida, habiéndose obtenido valores de energía de Gibbs positivos, y valores de entalpía generalmente menos negativos, lo que significa que el CPME tiene mayor afinidad por los compuestos fenólicos. Estos resultados explican la alta selectividad obtenida con el CPME para extraer inhibidores de la fermentación en corrientes ricas en azúcares.

#### 4.1.4. Recuperación de disolvente

Por último, una vez optimizada la extracción de inhibidores de la fermentación en la mezcla sintética IF-AZ con el biodisolvente CPME, se ha llevado a cabo el estudio de recuperación del disolvente en tres ciclos de extracción consecutivos. Para ello, se utilizó un rotavapor para la separación eficiente del disolvente y los compuestos extraídos, ya que es reconocido por ser un método eficaz para separar compuestos fenólicos de disolventes con cierta volatilidad [271,272]. Las tres extracciones se han llevado a cabo utilizando las condiciones previamente optimizadas: relación D:M igual a 1, tiempo de extracción de 30 min y temperatura de 25 °C.

En la **Figura 4.10** y **Tabla A.9** (disponible en el Anexo, como información suplementaria) se puede observar la eficiencia de extracción tras cada ciclo de recuperación de disolvente. El ciclo 1 corresponde a la extracción con disolvente fresco, mientras que los ciclos 2 y 3 representan la extracción con el disolvente recuperado.

Aunque la recuperación del disolvente mediante el uso de rotavapor es bastante satisfactoria, logrando recuperar gran parte del disolvente introducido, siempre hay una pérdida de disolvente entre ciclos debido al volumen perdido durante la separación de las fases y el propio proceso de evaporación/condensación. Por este motivo, para mantener constantes los volúmenes utilizados y compensar las pérdidas durante de la recuperación, se realizó el primer ciclo por triplicado, el segundo por duplicado y el tercero solo una vez.



**Figura 4.10.** Estudio de la recuperación del disolvente en tres ciclos para la mezcla sintética IF-AZ utilizando CPME como disolvente. Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 30 min; T= 25 °C; separación de fases: reposo durante la noche.

Como puede observarse en la **Figura 4.10**, de manera general, el CPME pierde un poco de eficiencia de extracción tras cada ciclo. En la extracción de los furanos se encontró una disminución en la eficiencia entre el ciclo 1 y 3 de 5-7% para el FF y 5HFM, respectivamente. En la extracción de los compuestos fenólicos, la disminución en la eficiencia entre el ciclo 1 y 3 difiere en función de cada categoría. En el caso de los fenoles simples, se encuentra una caída en la eficiencia de extracción de un 2,9 y 2,4% para el fenol y el guayacol, respectivamente. Sin embargo, la eficiencia de extracción del siringol disminuye un 12,8%. El descenso en la eficiencia de extracción de los aldehídos fenólicos fue de 1,0 y 2,6% para el 4HBald y VAN, respectivamente. Los ácidos fenólicos muestran comportamientos diferentes según familias. En el caso de los ácidos hidroxicinámicos, la extracción apenas varía en tras los ciclos de recuperación (0,3% de disminución de la eficiencia para ApC y AF). Sin embargo, con los ácidos hidroxibenzoicos se observa un descenso más evidente, disminuyendo en un 5,2 y 6,3% para el A4HB y AV, respectivamente. Por el contrario, en la extracción de los azúcares se observó un ligero aumento de entre 1,6 y 7,0% en su eficiencia de extracción.

En líneas generales, la recuperación y la reutilización del CPME puede llevarse a cabo para mejorar las condiciones de sostenibilidad del proceso, manteniendo la alta eficacia para la extracción de inhibidores de la fermentación. Sin embargo, se requieren más estudios experimentales sobre este punto para mejorar los rendimientos tras la recuperación.



## 4.2. Extracción de antioxidantes a partir de residuo sólido de naranja

En este apartado se presentan y discuten los resultados obtenidos en la extracción sólido-líquido empleada para la recuperación de compuestos fenólicos antioxidantes del residuo sólido de naranja (RSN). Para ello, se han utilizado distintos disolventes y técnicas de extracción asistida.

Primero, se ha estudiado la recuperación de los compuestos fenólicos utilizando disolventes convencionales ( $H_2O$ , 80% EtOH y EA) con el objetivo de determinar los límites operacionales y optimizar las técnicas de extracción asistida (baño de ultrasonidos, sonda de ultrasonidos y microondas). A continuación, se estudia la extracción con distintos disolventes sostenibles, en concreto, DE hidrófilos y biodisolventes, así como el rendimiento de estos disolventes utilizando las técnicas de extracción asistida. En la extracción con DE hidrófilos se ha evaluado la influencia de diferentes HBA (cloruro de colina, betaína y prolina), junto con diferentes polialcoholes como HBD (1,2-butanodiol; 1,3-butanodiol, 1,2-propanodiol y glicerol). A partir de estos ensayos, se ha seleccionado el DE hidrófilo que ofrece mejores resultados en la extracción de compuestos fenólicos, para posteriormente emplearlo en la extracción asistida utilizando microondas y sonda de ultrasonidos.

En el caso de la extracción utilizando biodisolventes (2MeTHF, CPME, EL, DMI, CYR y GVL), se ha cuantificado tanto la extracción de los compuestos fenólicos de interés como la de los azúcares mayoritarios presentes en el RSN, con el objetivo de evaluar la selectividad de estos biodisolventes. Adicionalmente, se ha empleado COSMO-RS para una mayor comprensión de las interacciones entre los compuestos de interés y los biodisolventes. Una vez identificados los biodisolventes más adecuados, en términos de eficiencia y selectividad, se propone una recuperación en cascada de los compuestos de interés: primero, la extracción de antioxidantes y luego, la de azúcares, con el objetivo de realizar una valorización completa del RSN.

### 4.2.1. Extracción sólido-líquido empleando disolventes convencionales

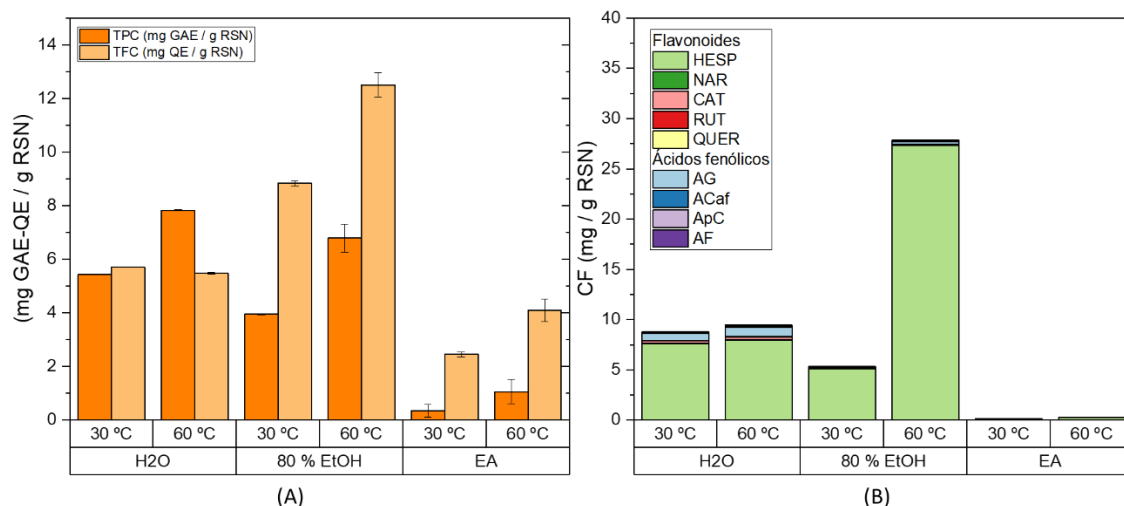
La extracción de antioxidantes fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos) del RSN se ha estudiado mediante el empleo de disolventes convencionales: agua desionizada ( $H_2O$ ), una disolución 20% (v/v) de agua en etanol (80% EtOH) y acetato de etilo (EA). El agua fue seleccionada como disolvente de referencia en las extracciones. La composición de la mezcla agua/etanol se

seleccionó a partir de los resultados previos obtenidos por Li *et al.* [273], quienes analizaron el efecto del uso de distintas concentraciones de etanol (desde agua pura hasta 95% de etanol) en la extracción de antioxidantes de la piel de cítricos. En este estudio encontraron que la eficiencia de extracción mejoró con el aumento de la concentración de etanol hasta el 80%, por lo que este porcentaje fue la composición elegida para estos ensayos. Por otro lado, se escogió el acetato de etilo (EA) como disolvente orgánico no polar, con el objetivo de estudiar el efecto de la polaridad del disolvente en la eficiencia de extracción.

Además, se ha optimizado la extracción utilizando estos disolventes con un agitador orbital como método convencional, y se ha comparado con distintas técnicas de extracción asistida (baño de ultrasonidos, sonda de ultrasonidos y por microondas).

#### **4.2.1.1. Extracción con agitador orbital**

En primer lugar, se evaluó la extracción de los compuestos de interés del RSN utilizando el agitador orbital como técnica convencional de referencia y estudiando el efecto de la temperatura en el proceso. Los ensayos de extracción se realizaron a 30 y 60 °C, fijando el tiempo de extracción en 60 min. Tras la extracción las muestras son centrifugadas a 4200 rpm durante 10 min para favorecer la separación de fases. No se estudiaron temperaturas superiores a 60 °C para evitar una posible degradación térmica de los compuestos fenólicos, ya que el tiempo de extracción es bastante extenso. Los resultados de los análisis por TPC, TFC y HPLC de los extractos obtenidos para los tres disolventes evaluados se muestran en la **Figura 4.11.** y **Tabla A.10**, disponible en el Anexo.



**Figura 4.11.** Efecto de la temperatura en la extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando agitador orbital: (A) contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) y contenido de flavonoides totales (TFC) y (B) cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 60 min; T extracción= 30 y 60 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

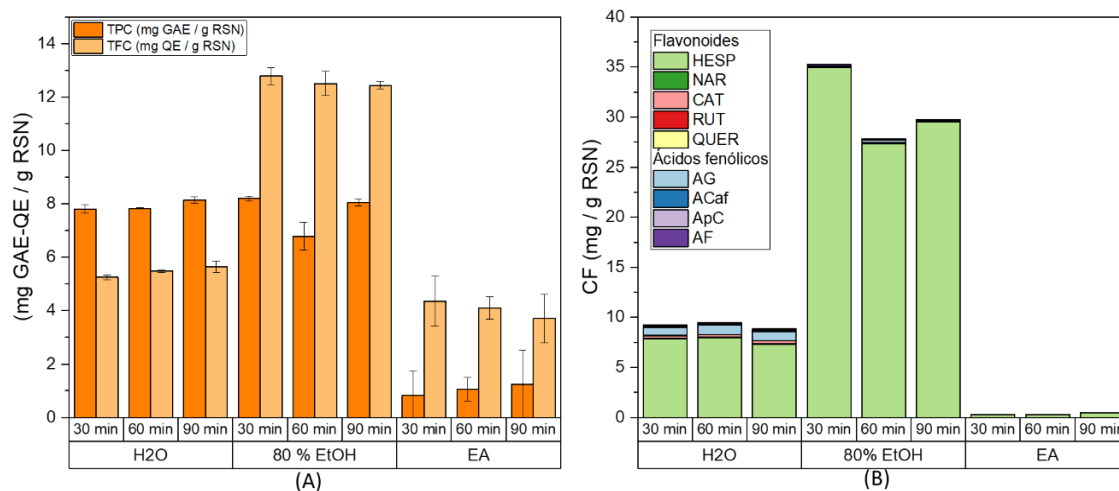
Como puede observarse en la **Figura 4.11 (A)**, en general, el TPC y TFC aumentan con la temperatura, excepto en el caso del agua, cuyos valores de TFC son similares a ambas temperaturas. Estos resultados sugieren que una temperatura más alta mejora la extracción de compuestos fenólicos utilizando el agitador orbital. El efecto positivo de la temperatura en la extracción, concretamente utilizando 80% EtOH y acetato de etilo (EA) como disolventes, podría deberse a la reducción de la tensión superficial y la viscosidad del disolvente con la temperatura, lo que favorece la solubilidad y aumenta la difusión de los compuestos fenólicos al promover el contacto entre el soluto y el disolvente [274,275]. Además, al aumentar la temperatura se reducen las fuerzas intermoleculares, como los enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y las interacciones dipolo-dipolo, lo que facilita la desorción de los compuestos extraíbles al disminuirse la energía de activación requerida [276]. Este efecto fue observado especialmente cuando se utilizó la disolución al 80% de EtOH, donde el TPC aumentó de 3,9 a 6,8 mg GAE/g RSN, el TFC aumentó de 8,8 a 12,5 mg QE/g RSN, y los compuestos fenólicos totales cuantificados por HPLC aumentaron de 5 a 29 mg PC/g RSN al incrementar la temperatura de 30 a 60 °C.

Por otra parte, comparando la **Figura 4.11 (A) y (B)**, se observa que los análisis por TFC y HPLC muestran una tendencia similar, lo que podría estar relacionado con el hecho de que el principal compuesto identificado por HPLC fue la hesperidina (HESP). Estudios previos han demostrado el aumento en la extracción de hesperidina del RSN al aumentar la temperatura de extracción [277,278]. La hesperidina es un flavonoide, por lo que la medida espectrofotométrica de TFC (contenido total de flavonoides) es más precisa. En relación con los valores de TPC, los valores

obtenidos con el agua no concuerdan con los resultados de HPLC y TFC, lo que podría atribuirse a la baja selectividad de este disolvente. El agua podría estar favoreciendo la extracción de otros compuestos presentes en el RSN como los azúcares, hidratos de carbono de cadena corta, o el ácido ascórbico [279], que son compuestos que interfieren en el método Folin-Ciocalteu debido a su capacidad reductora [67,280]. La menor selectividad del agua se confirma por el análisis mediante HPLC (**Tabla A.10**), ya que en la extracción con agua es notable la presencia de ácido gálico (AG), catequina (CAT) y ácido ferúlico (AF), lo que no ocurre con el resto de los disolventes. El porcentaje de HESP en el extracto acuoso representa cerca del 84% de los compuestos fenólicos identificados, mientras que con 80% EtOH se alcanzó un 99% de HESP y con EA un 100% (único compuesto identificado). Además, es importante señalar que en ningún análisis se identificó quercetina (QUER).

Respecto a la eficiencia de extracción de los distintos disolventes utilizados, la mejor eficiencia de extracción se consiguió utilizando 80% EtOH a 60 °C. Estos resultados coinciden con los publicados por Li *et al.* [273], quienes compararon la capacidad de extracción del agua pura y del 80% EtOH para extraer compuestos fenólicos de residuos sólidos de cítricos. El uso de etanol aumenta la capacidad de extracción porque la solubilidad de los compuestos de interés es mayor en etanol que en agua, mientras que la presencia de agua mejora la desorción de los solutos desde la matriz [281]. Por el contrario, los resultados más bajos de eficiencia de extracción se obtuvieron utilizando EA como disolvente, donde solo se identificó HESP en los análisis por HPLC. Los análisis por HPLC revelan que la presencia de flavonoides y ácidos fenólicos es limitada en el extracto de EA cuando se compara con los extractos de agua y 80% EtOH, ya que se obtuvieron entre 8,7-9,4 y 5,3-27,8 mg CF/ g RSN para agua y 80% EtOH, respectivamente; mientras que para EA se obtuvieron 0,1-0,3 mg CF/ g RSN. Estos resultados están de acuerdo con los publicados por Safdar *et al.* [281], quienes compararon la capacidad de 80% EtOH y EA para extraer compuestos fenólicos de *Citrus reticulata L.*, obteniendo 25 mg GAE / g con 80% EtOH y 9 mg GAE/g con EA, respectivamente. Esto podría explicarse debido al carácter hidrófobo del acetato de etilo, cuya capacidad para introducirse en la pared celular es menor que la de los disolventes hidrófilos. Esto concuerda con los resultados publicados anteriormente por Hegazy *et al.* [282], quienes encontraron una gran correlación entre la capacidad de extracción de compuestos antioxidantes de cáscara de naranja con la polaridad de los disolventes empleados, concluyendo que disolventes apolares, como el hexano o acetato de etilo, tienen una menor eficiencia de extracción que disolventes polares, como metanol o etanol.

Una vez analizado el efecto de la temperatura y teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se fijó la temperatura en 60 °C para evaluar el efecto de distintos tiempos de agitación en la extracción: 30, 60, 90 min. Los resultados de los análisis del extracto por TPC, TFC y HPLC obtenidos para los tres disolventes evaluados a distintos tiempos de extracción se muestran en la **Figura 4.12** y **Tabla A.10**, disponible en el Anexo.



**Figura 4.12.** Efecto del tiempo de extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando agitador orbital: (A) contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) y contenido de flavonoides totales (TFC) y (B) cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 30, 60 y 90 min; T extracción= 60 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

Los resultados obtenidos (**Figura 4.12**) muestran poca influencia del tiempo de extracción sobre la eficiencia de extracción de los compuestos fenólicos, lo que sugiere que 30 min deberían ser suficientes para alcanzar el equilibrio utilizando estos disolventes. Una conclusión similar fue obtenida por Vergara-Salinas *et al.* [283], quienes no encontraron ninguna influencia en el tiempo de extracción entre 5 y 30 min al extraer compuestos fenólicos de muestras de tomillo utilizando agua como disolvente. También, Silva *et al.* [284], en el estudio de extracción de compuestos fenólicos de la hoja de árbol *Inga Edulis* utilizando etanol como disolvente, concluyeron que el aumento del tiempo de extracción no es necesario para obtener más compuestos fenólicos una vez alcanzado el equilibrio, ya que no hay más transferencia de materia al estar limitado por la segunda ley de difusión de Fick. Por otro lado, la disminución de la eficiencia de extracción de los compuesto fenólicos en las extracciones de 90 min utilizando agua y 80% EtOH podría atribuirse a la degradación de algunos compuestos fenólicos por la exposición prolongada al aire o la luz [285–287].

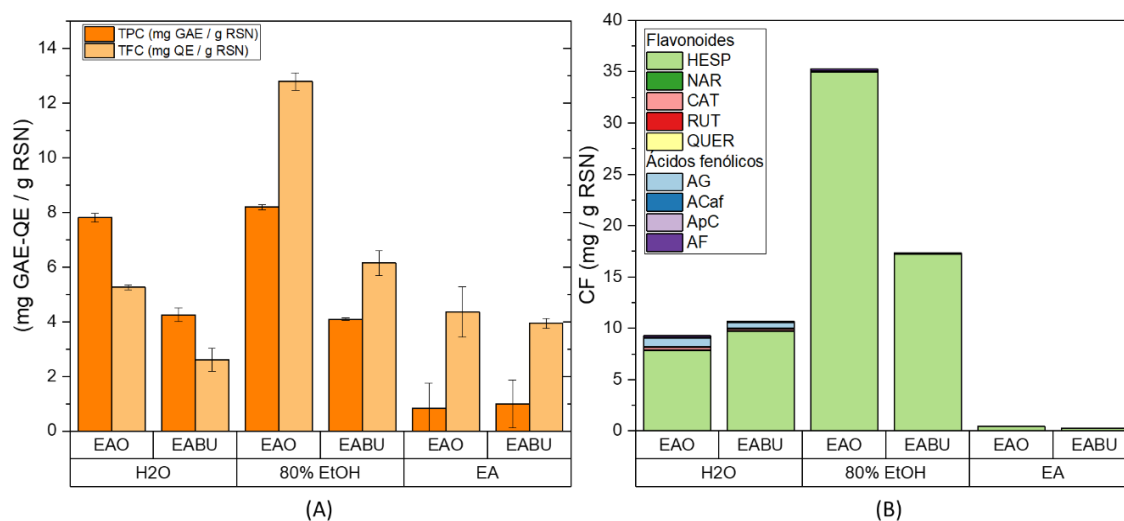
Los resultados obtenidos en el estudio del efecto del tiempo de extracción concuerdan con las conclusiones obtenidas en el estudio de la temperatura, confirmando que la mezcla 80% EtOH

es el disolvente con mayor capacidad de extracción (27,8-35,2 mg CF/g RSN), seguido del agua (8,8-9,5 mg CF/g RSN) y el EA (0,3-0,4 mg CF/g RSN), como muestran los resultados del HPLC.

En resumen, dado que los tiempos de extracción más largos no promueven una mayor recuperación de compuestos fenólicos del RSN utilizando la agitación orbital, se podría concluir que las mejores condiciones operativas para esta técnica son 60 °C y 30 min, evitando la exposición prolongada de los compuestos fenólicos para prevenir una posible degradación y ahorrando costes al reducir el tiempo de extracción.

#### 4.2.1.2. Extracción asistida por ultrasonidos

Con el objetivo de estudiar la extracción asistida por baño de ultrasonidos (EABU), se han utilizado las condiciones establecidas previamente con el agitador orbital de 60 °C y 30 min, después las muestras se centrifugan a 4200 rpm durante 10 min para favorecer la separación de fases. En la **Figura 4.13** se muestra la comparación en la extracción de compuestos antioxidantes utilizando agitador orbital y baño de ultrasonidos bajo estas condiciones.



**Figura 4.13.** Comparación de la extracción utilizando agitador orbital (EAO) y baño de ultrasonidos (EABU): (A) contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) y contenido de flavonoides totales (TFC) y (B) cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 30 min; T extracción= 60 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

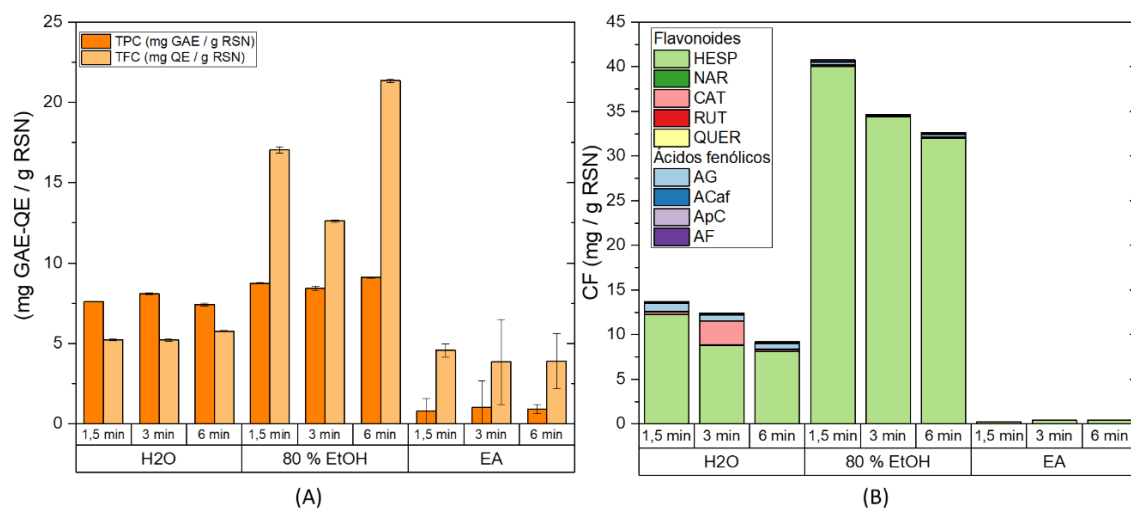
Como puede observarse en la **Figura 4.13 (A)**, contrario a los resultados esperados, el baño de ultrasonidos no mejora el proceso de extracción. De hecho, los valores de TPC y TFC disminuyen cuando se utiliza el baño de ultrasonidos con los tres disolventes estudiados. Por otro lado, los resultados obtenidos por HPLC, mostrados en la **Figura 4.13 (B)** y en la **Tabla A.11** (disponible en el Anexo), revelan un pequeño aumento de compuestos fenólicos en la extracción utilizando

agua como disolvente (9,3 a 10,7 mg CF / g RSN), pero también una disminución significativa de compuestos fenólicos en el extracto de 80% EtOH (35,2 a 17,4 mg CF / g RSN) y en el extracto de EA (0,4 a 0,3 mg CF / g RSN). Al igual que en la extracción con el agitador orbital, en los análisis de HPLC se detectó hesperidina como compuesto mayoritario en comparación el resto de los compuestos fenólicos identificados (**Tabla A.11**).

Los ultrasonidos se aplican para intensificar la extracción al aumentar el número de burbujas de cavitación, las cuales provocan la ruptura de la pared celular, reduciendo el tamaño de partícula y mejorando la transferencia de materia [84,288]. Sin embargo, en este caso, el baño de ultrasonidos no mejoró los resultados de la extracción convencional llevada a cabo mediante la agitación orbital. Esto podría deberse al hecho de que este baño sólo permite controlar la temperatura, y no otros parámetros como la frecuencia, la potencia o la distancia de la muestra a la superficie de irradiación, que se sabe que también afectan al proceso de intensificación [289]. Además, el rendimiento del equipo también podría verse influido por la orientación de la muestra, el volumen de sonicación y la pureza del agua utilizada en el baño [221,290].

Dado que la extracción llevada a cabo en el baño ultrasonidos no resultó tan eficaz como se esperaba, se probó una sonda de ultrasonidos como alternativa. Con la sonda de ultrasonidos no hay posibilidad de controlar la temperatura de la extracción ni de llevar a cabo la extracción en un vial cerrado, solo se puede controlar la temperatura final de la muestra con un termómetro. Tras algunos ensayos preliminares, la potencia se fijó en 10 W, ya que valores de potencia superiores provocaban la evaporación del disolvente.

Una vez fijada la potencia en 10 W, se evaluó el efecto del tiempo de extracción (1,5; 3 y 6 min). Con 10 W y sin superar los 6 min, la temperatura final de la muestra no superó los 60 °C. Los resultados de los análisis por TPC, TFC y HPLC del extracto obtenidos para los tres disolventes evaluados a distintos tiempos de extracción utilizando la sonda de ultrasonidos se pueden observar en la **Figura 4.14** y en la **Tabla A.12** (disponible en el Anexo).



**Figura 4.14.** Efecto del tiempo de extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando la sonda de ultrasonidos: (A) contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) y contenido de flavonoides totales (TFC) y (B) cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; P= 10 W; t extracción= 1,5; 3 y 6 min; T extracción≈ 60 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

Como puede observarse en la **Figura 4.14 (A)**, el aumento del tiempo de extracción utilizando la sonda de ultrasonidos no produce un aumento en el contenido de TPC y TFC; sin embargo, en la **Figura 4.14 (B)** se observa un descenso en la extracción de compuestos fenólicos cuantificados por HPLC. Esto puede deberse al calor generado durante el proceso de extracción con ultrasonidos o a la oxidación de la muestra en los viales, lo que puede conducir a un cambio en las características del medio y resultar en la degradación de los compuestos fenólicos [224]. Tal disminución no se observó en los valores de TPC y TFC, ya que el uso de la sonda de ultrasonidos podría estar facilitando la extracción de otros compuestos que pueden interferir en las medidas espectrofotométricas. Por lo tanto, se considera suficiente un tiempo de 1,5 min utilizando la sonda de ultrasonidos para asegurar un alto rendimiento de extracción y evitar una posible degradación de los compuestos fenólicos.

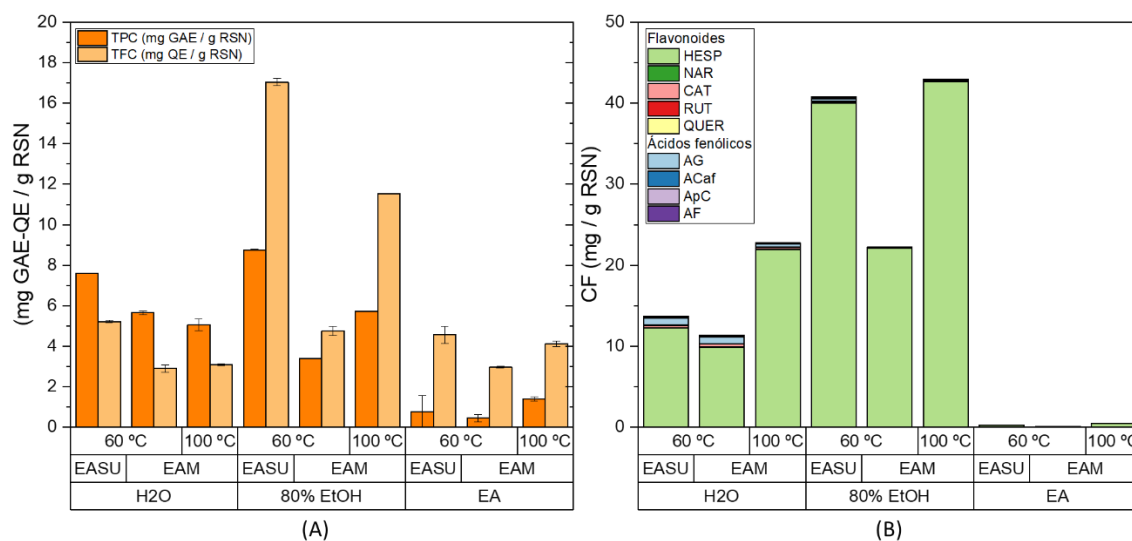
Con respecto a los disolventes utilizados en la extracción, una vez más, la mejor eficiencia de extracción se consiguió utilizando 80% EtOH como disolvente. Comparando las figuras **Figura 4.14** y **Figura 4.12** se observa una tendencia similar, aunque los resultados obtenidos con la sonda de ultrasonidos son mejores que con el agitador orbital, además de reducir significativamente los tiempos de extracción (30-90 min para el agitador orbital frente a 1,5-6 min para la sonda de ultrasonidos). Estos resultados confirman que la extracción asistida por ultrasonidos utilizando una sonda en lugar de un baño mejora la extracción de compuestos fenólicos del RSN. Con la sonda de ultrasonidos se mejora la transferencia de energía al medio

al no haber barreras en la trayectoria de las ondas de ultrasonido, lo que permite mejorar los rendimientos de extracción a la vez que se reduce el tiempo [221,224].

En resumen, la extracción asistida por ultrasonidos es eficaz cuando se utiliza una sonda en lugar de un baño, debido al efecto directo de las ondas de ultrasonidos en la muestra. Además, la extracción con la sonda de ultrasonidos mejora la eficiencia del agitador orbital y permite reducir el tiempo de extracción de 30 a 1,5 min.

#### 4.2.1.3. Extracción asistida por microondas

Una vez establecidas las mejores condiciones en la extracción utilizando la sonda de ultrasonidos (EASU) (1,5 min; 60 °C), se compara con la extracción asistida por microondas (EAM) bajo las mismas condiciones de operación. Además, debido a las características del microondas utilizado, donde se puede fijar la temperatura, pero no la potencia de microondas, este estudio se amplió a 100 °C. En la **Figura 4.15** se muestra la comparación en la extracción de compuestos antioxidantes utilizando la extracción asistida por sonda de ultrasonidos y por microondas.

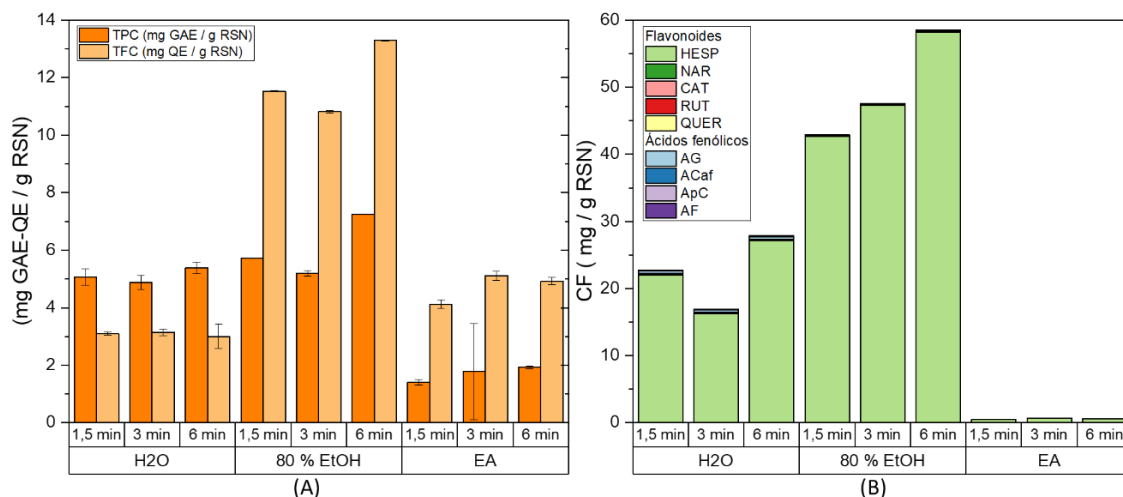


**Figura 4.15.** Comparación de la extracción utilizando sonda de ultrasonidos (EASU) y microondas (EAM): (A) contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) y contenido de flavonoides totales (TFC) y (B) cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 1,5 min; T extracción= 60 y 100 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

Como puede observarse en la **Figura 4.15**, la extracción asistida por microondas a 60 °C no consigue mejorar los resultados obtenidos con la sonda de ultrasonidos. Esto podría deberse a que la energía de microondas aportada para aumentar la temperatura hasta 60 °C es muy baja, y por lo tanto el efecto de estas ondas es insignificante. Sin embargo, a partir del análisis por HPLC (**Tabla A.13**, disponible en el Anexo), se puede apreciar que cuando la temperatura

aumenta hasta 100 °C en la extracción con microondas, la eficiencia de extracción mejora considerablemente, pasando de 11,4 a 22,8 mg CF / g RSN con agua, de 22,3 a 43 mg CF / g RSN usando 80% EtOH y de 0,1 a 0,4 mg CF / g RSN con EA. La mejora de la eficiencia al aumentar la temperatura a 100 °C puede deberse a que el efecto del microondas es más relevante, ya que la temperatura y la potencia del microondas están interconectadas. Las microondas elevan la temperatura y la presión dentro de las paredes celulares de las plantas, lo que resulta en un incremento de la porosidad. Además, este proceso conlleva la disminución de la tensión superficial y la viscosidad del disolvente. Como resultado, se facilita la desorción de los compuestos de la matriz y se mejora la penetración del disolvente [233,291]. Además, la temperatura juega un papel muy importante en la extracción con microondas, ya que los distintos mecanismos de conversión de energía microondas, como la rotación dipolo-dipolo y conducción iónica, vienen dictados por la temperatura. Inicialmente, el calentamiento está dominado por la contribución de la rotación dipolar y, a medida que aumenta la temperatura, pasa a estar dominado por la conducción iónica. La contribución relativa de estos dos mecanismos de calentamiento depende de la movilidad y la concentración de los iones de la muestra [229]. Este aumento en la eficiencia de extracción es especialmente relevante en la extracción de la hesperidina, ya que con agua y 80% EtOH la cantidad extraída se duplica (de 9,8 a 21,9 mg HESP / g RSN con agua y de 22,0 a 42,6 mg HESP / g RSN con EtOH), mientras que con EA se cuadruplica (de 0,1 a 0,4 mg HESP / g RSN). Este aumento podría atribuirse a la mayor solubilidad de la hesperidina a temperaturas superiores a 100 °C [292,293].

Considerando los buenos resultados obtenidos en la extracción asistida por microondas a 100 °C, este trabajo se completó evaluando el efecto del tiempo extracción (1,5; 3 y 6 min). Los resultados de los análisis de los extractos obtenidos para los tres disolventes evaluados a distintos tiempos de extracción utilizando extracción asistida por microondas se pueden observar en la **Figura 4.16** y en la **Tabla A.13**, disponible en el Anexo.



**Figura 4.16.** Efecto del tiempo de extracción de compuestos fenólicos de RSN mediante extracción asistida por microondas: (A) contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) y contenido de flavonoides totales (TFC) y (B) cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 1,5; 3 y 6 min; T extracción= 100 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

Como puede observarse en la **Figura 4.16**, la eficiencia de extracción utilizando microondas aumenta con el tiempo. En concreto, los mejores resultados se alcanzaron con 80% EtOH a 6 min (58,6 CF / g RSN). El disolvente 80% EtOH muestra los mejores resultados en términos de eficiencia de extracción para todas las técnicas estudiadas, pero utilizando el microondas se han obtenido los mejores resultados. Esto puede explicarse por el hecho de que el etanol es conocido como un buen absorbente de microondas, mejorando la eficiencia del microondas cuando se utiliza este disolvente [292].

En resumen, en este apartado se evalúa la extracción de compuestos fenólicos a partir de RSN comparado la extracción convencional llevada a cabo en un agitador orbital, con las distintas técnicas de extracción asistida (baño de ultrasonidos, sonda de ultrasonidos y microondas). Este estudio se ha llevado a cabo empleando tres disolventes convencionales (H<sub>2</sub>O, 80% EtOH y EA). En concreto, se ha estudiado el efecto de la temperatura y el tiempo en el agitador orbital, concluyendo que el aumento de la temperatura a 60 °C mejora la eficiencia de extracción, mientras que tiempos superiores a 30 min disminuyen los rendimientos, posiblemente debido a la degradación de los compuestos de interés. En cuanto a la extracción asistida por ultrasonidos, se observó que el uso de un baño de ultrasonidos no mejoraba el rendimiento de la extracción, mientras que el uso de una sonda de ultrasonidos aumenta la eficiencia de la extracción. La sonda de ultrasonidos permite transmitir una mayor energía directamente a la matriz, lo que reduce el tiempo de extracción de 60 a 1,5 min. Por otro lado, la extracción asistida por microondas a 100 °C ha demostrado ser la técnica más eficaz, ya que el tiempo de extracción

se puede reducir de 60 a 6 min, mientras aumenta significativamente la recuperación de compuestos fenólicos.

En cuanto al efecto del disolvente utilizado ( $H_2O$ , 80% EtOH y EA), se ha observado que los disolventes hidrófobos, como el EA, no son eficaces para la extracción sólido-líquido de RSN. Esto se debe a su menor capacidad de penetración en la matriz y a la menor solubilidad de los compuestos de interés en este disolvente. En cuanto a los disolventes polares, la extracción con agua resultó ser menos selectiva, mientras que la extracción con 80% EtOH ha sido la más eficaz, ya que la solubilidad de los compuestos fenólicos es mayor en etanol, y la adición de agua favorece la desorción de los compuestos objetivo de la matriz.

## 4.2.2. Extracción sólido-líquido empleando disolventes eutécticos

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en la extracción de compuestos fenólicos empleando disolventes eutécticos (DE) hidrófilos. En concreto, se han estudiado tres HBA (cloruro de colina, betaína y prolina), junto con diferentes polialcoholes como HBD (1,2-butanodiol; 1,3-butanodiol, 1,2-propanodiol y glicerol), con el objetivo de evaluar la influencia de los constituyentes de los DE en la extracción. Primero, se llevó a cabo un estudio preliminar con los distintos DE hidrófilos con el propósito de analizar la extracción de compuestos fenólicos. Este proceso se llevó a cabo mediante el uso de un agitador orbital. A continuación, se optimizó la extracción utilizando técnicas de extracción asistida por sonda de ultrasonidos y microondas, empleando para ello el DE con mejor eficiencia de extracción de compuestos fenólicos presentes en el residuo sólido de naranja (RSN).

### 4.2.2.1. Extracción con agitador orbital

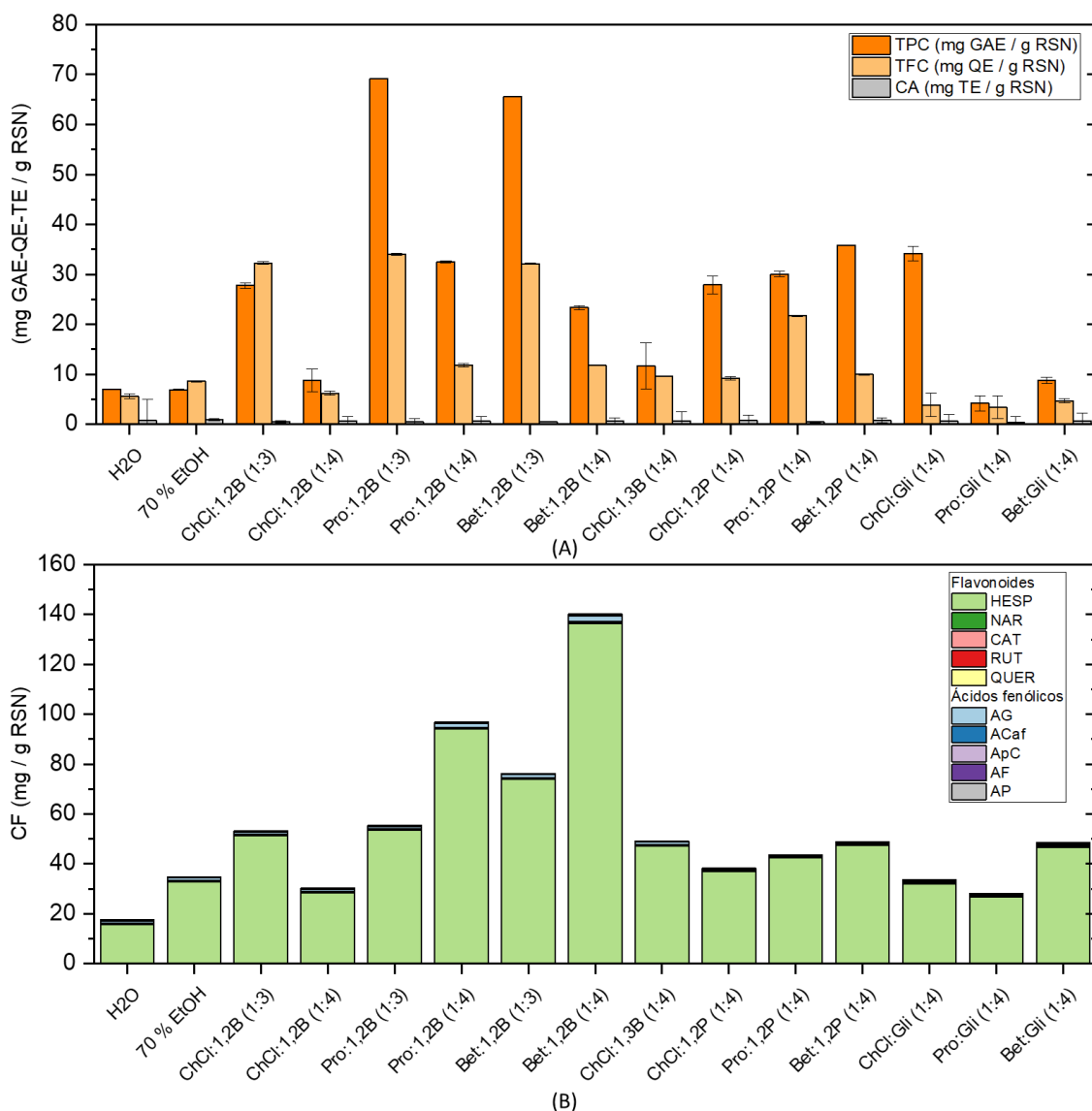
Con el objetivo de encontrar el DE más adecuado para la extracción de compuestos fenólicos de RSN, se llevó a cabo un estudio preliminar con diferentes DE hidrofílicos empleando un agitador orbital. Este enfoque nos permitió evaluar la eficiencia de extracción de distintos DE hidrófilos formados con cloruro de colina, betaína y prolina como HBA y distintos polialcoholes como HBD (1,2-Butanodiol; 1,3-Butanodiol; 1,2-propanodiol; glicerol). Además, se estudió el efecto de la relación molar entre HBA y HBD sobre la extracción. Como es sabido, los distintos componentes que conforman los DE influyen significativamente en sus propiedades fisicoquímicas, tales como la polaridad, viscosidad o solubilidad, las cuales inciden en la capacidad de extraer los compuestos de interés [294].

Todos los DE hidrófilos se utilizaron con un 30% (v/v) de agua con el objetivo de aumentar la polaridad del disolvente y al mismo tiempo reducir su viscosidad, facilitando así su manejo. La presencia de agua favorece una mayor afinidad por los compuestos polares, mejorando la solubilidad y la transferencia de materia de la muestra sólida al disolvente [295,296]. No obstante, hay que tener en cuenta la cantidad de agua añadida a los DE, ya que se ha observado que un contenido en agua superior al 40% puede provocar la desestabilización de la estructura de enlaces de hidrógeno que caracteriza al DE [149,150]. Además, un alto contenido en agua podría resultar perjudicial en la extracción de los compuestos de interés, puesto que la alta polaridad del agua puede contribuir a la extracción de otros compuestos, disminuyendo así la concentración de compuestos fenólicos en el extracto [139]. Por otro lado, se utilizaron agua

pura y una disolución al 70% (v/v) de etanol en agua como disolventes de referencia en todas las extracciones.

Los ensayos de extracción se realizaron a 60 °C y 100 min, empleando una relación D:M igual a 10, después para favorecer la separación de fases, las muestras se centrifugaron a 4200 rpm 10 min. El tiempo de extracción se fijó en 100 min basándonos en estudios reportados por Ozturk *et al.* [297], donde se estudió la influencia del tiempo entre 15 y 180 min en la extracción de compuestos fenólicos utilizando DE hidrófilos formados con cloruro de colina y glicerol. Los resultados mostraron que el rendimiento de extracción aumenta gradualmente hasta 100-120 min, alcanzando un máximo a partir del cual la extracción disminuye. Esto puede explicarse por la segunda ley de difusión de Fick, que establece que una vez alcanzado el equilibrio en la extracción ya no se produce más transferencia de materia [149,298]. El aumento de la temperatura de extracción acelera el tiempo necesario para lograr el equilibrio. Sin embargo, no se consideraron temperaturas superiores a 60 °C para prevenir la posible degradación térmica de los compuestos fenólicos. Esto se debe a que el proceso de extracción ya es prolongado y temperaturas más altas podrían resultar en la degradación de estos compuestos [299].

Los resultados de los análisis espectrofotométricos por TPC, TFC y AC y del análisis cromatográfico por HPLC obtenidos en la extracción con el agitador orbital utilizando los DE hidrófilos, a 60 °C y 100 min, se muestran en la **Figura 4.17** y en las **Tabla A. 14** y **Tabla A. 15**, ambas disponibles en el Anexo.



**Figura 4.17.** Extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando disolventes eutécticos mediante extracción con agitador orbital: (A) contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y capacidad antioxidante (CA) y (B) cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 100 min; T extracción= 60 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

Como puede observarse en la **Figura 4.17 (A)** los resultados de TFC y TPC son mayores cuando se utilizan los DE en comparación con los disolventes de referencia (agua y 70% EtOH). Estos resultados coinciden con los reportados en la literatura, donde el empleo de DE formados por polialcoholes mejora la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos en comparación con disolventes tradicionales. Esto se atribuye al mayor número de interacciones electrostáticas y de enlace de hidrógeno que pueden formar los DE con los compuestos de interés [144,266].

En general, se observaron valores más elevados de TPC que de TFC, a pesar de que los flavonoides son los compuestos mayoritarios presentes en el RSN. Esta discrepancia podría

atribuirse a las posibles interferencias que ciertos componentes de los DE mostraron con los reactivos utilizados en las técnicas colorimétricas. Dichas interferencias pueden dar lugar a medidas poco precisas, incluso realizando blancos con el disolvente.

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó mediante el ensayo DPPH. Este método se basa en una reacción antirradical no competitiva, donde se determina la pérdida de coloración debida a la transferencia de átomos de hidrógeno, a la transferencia de un electrón o a otros mecanismos [300]. Se observó que el extracto con mayor capacidad antioxidante fue obtenido con 70% EtOH (0,85 mg TE/ g RSN). De los DE estudiados, Bet:1,2P presentó la mayor capacidad antioxidante (0,71 mg TE /g RSN).

Comparando las **Figura 4.17 (A)** y **(B)**, se puede observar que los resultados entre las medidas espectrofotométricas y cromatográficas siguen las mismas tendencias, excluyendo las extracciones realizadas con los DE Bet:1,2B (1:3) y (1:4) y Pro:1,2B (1:3) y (1:4). Dado que las medidas por HPLC son más fiables, al no estar afectadas por posibles interferencias que alteran los métodos colorimétricos, se utilizarán para comparar la eficiencia de extracción de los distintos DE estudiados.

En primer lugar, se estudió el efecto de la relación molar en los DE formados con los distintos HBA, cloruro de colina, betaína y prolina, utilizando 1,2-Butanodiol como HBD en relación (1:3) y (1:4). Como puede observarse en **Figura 4.17 (B)**, al aumentar la cantidad de HBD que conforma el DE con prolina y betaína, se incrementa la eficiencia de extracción. Por ejemplo, cuando se utiliza el DE Pro:1,2B, la extracción aumenta de 55,5 a 96,9 mg CF / g RSN al aumentar la relación molar de (1:3) a (1:4), y de 76,3 a 140,2 mg CF / g RSN con Bet:1,2B. Este comportamiento podría estar relacionado con la disminución de la viscosidad y la tensión superficial al incrementar la proporción de HBD, ya que el 1,2-Butanodiol es líquido a temperatura ambiente [67]. Sin embargo, al aumentar la relación molar de (1:3) a (1:4) en el DE ChCl:1,2B la eficiencia de extracción disminuye de 53,3 a 30,3 mg CF / g RSN. Esto puede deberse a que al reducir la cantidad de cloruro de colina que forma el DE, también se reduce su basicidad y la facilidad para establecer interacciones con los compuestos de interés [301].

Las propiedades de los DE dependen de los compuestos que lo conforman, lo que resalta la importancia de encontrar la mezcla adecuada entre HBA y HBD para favorecer la extracción de los compuestos deseados [130]. Por lo tanto, en esta Tesis Doctoral, además de considerar la relación HBA: HBD como factor clave, también se estudió la influencia de la estructura de cada uno de los componentes. Para ello, se han comparado aquellos DE con una relación HBA: HBD

igual a 1:4. Primero, se estudió el efecto de la posición del grupo hidroxilo comparando los DE basados en cloruro de colina con 1,2-butanodiol y 1,3-butanodiol. Se encontró un aumento 30,3 a 49,2 mg CF / g RSN cuando se utilizó ChCl:1,3B (1:4) en comparación con ChCl:1,2B (1:4). Esto podría atribuirse a efectos relacionados con el impedimento estérico, ya que al estar más separados los grupos hidroxilos se mejora la extracción al favorecer las interacciones intermoleculares disolvente-soluto [266]. Por otro lado, también se estudió el efecto de la longitud de la cadena del HBD, comparando los DE basados en 1,2-butanodiol y 1,2-propanodiol. En este caso, los resultados mostraron cierta variabilidad, y el efecto de la longitud de la cadena no es tan evidente, y varía en función del HBA utilizado. En el caso de los DE basados en colina, se observó un aumento en la extracción de los compuestos fenólicos, pasando de 30,3 a 49,2 mg CF / g RSN al disminuir la cadena alquílica, mientras que con los DE basados en prolina, se observó un ligero descenso de 55,5 a 43,7 mg CF / g RSN al cambiar de 1,2-butanodiol y 1,2-propanodiol. Sin embargo, con betaína, la eficiencia de extracción con 1,2-propanodiol (48,8 mg CF / g RSN) fue significativamente menor que con 1,2-butanodiol (140,2 mg CF / g RSN). Cuando se utiliza betaína como HBA, la extracción de compuestos fenólicos se ve favorecida cuando la cadena alquílica del HBD tiene cuatro carbonos [295,298]. Por otro lado, se estudió el efecto del número de grupos hidroxilos presentes en el HBD, comparando la eficiencia de extracción utilizando 1,2-propanodiol, que presenta 2 grupos hidroxilos, frente al glicerol, con 3 grupos hidroxilos. Como se puede observar en la **Figura 4.17**, la extracción con glicerol dio lugar a los resultados más bajos de todos los HBD estudiados. En términos generales, al aumentar el número de grupos -OH, se observa una disminución en la extracción de los compuestos de interés. El glicerol como HBD aumenta la viscosidad del disolvente, lo que minimiza la transferencia de materia del RSN al disolvente [266,303]. Resultados similares han sido reportados por Xu *et al.* [148], donde se encontró que el DE formado por cloruro de colina y glicerol no es efectivo para la extracción de flavonoides del residuo de naranja.

Con respecto al efecto del HBA, se puede observar que, para todos los HBD estudiados, los DE formados con betaína proporcionan mejores eficiencias de extracción comparando con los basados en cloruro de colina y prolina. La betaína es un compuesto zwitteriónico, lo que significa que posee un grupo funcional cargado positivamente y otro negativamente, lo que le concede un carácter anfótero [151]. Esto le permite formar agregados similares a micelas y actuar como como compuesto hidrófilo o hidrófobo dependiente del entorno, así como experimentar variaciones de carga en función del pH [304]. Estas características químicas hacen que la betaína sea un compuesto muy versátil en la extracción de compuestos fenólicos, lo que favorece la eficiencia de este proceso. En concreto, con el DE Bet:1,2B se alcanzó la mejor eficiencia de

extracción de compuestos fenólicos (140,2 mg CF / g RSN). Resultados similares han sido reportados por Krisanti *et al.* [242], quienes estudiaron la extracción de compuestos fenólicos de granos de café usados utilizando distintos DE formados con betaína y distintos polialcoholes. En su estudio, obtuvieron los mejores resultados de eficiencia de extracción utilizando DE formado a partir de betaína y 1,2-butanodiol.

Finalmente, a través de los análisis cuantitativos por HPLC también se ha estudiado la selectividad de los distintos DE para extraer hesperidina. Esta selectividad se ha calculado considerando el porcentaje de hesperidina en el extracto frente al resto de los compuestos fenólicos cuantificados. Como puede observarse en la **Tabla 4.2**, los DE son más selectivos frente a la hesperidina que los disolventes tradicionales. El agua resultó ser el disolvente menos selectivo de los estudiados, extrayendo un 89% de hesperidina, mientras que los DE logran extraer entre un 93% y un 97% de hesperidina.

**Tabla 4.2.** Selectividad hacia la hesperidina de los disolventes estudiados.

Disolvente	Hesperidina (%)
H <sub>2</sub> O	89,1
70% EtOH	94,2
ChCl:1,2B (1:3)	96,1
ChCl:1,2B (1:4)	93,4
Pro:1,2B (1:3)	96,4
Pro:1,2B (1:4)	97,1
Bet:1,2B (1:3)	96,9
Bet:1,2B (1:4)	97,4
ChCl:1,3B (1:4)	96,1
ChCl:1,2P (1:4)	96,2
Pro:1,2P (1:4)	97,2
Bet:1,2P (1:4)	97,2
ChCl:Gli (1:4)	95,1
Pro:Gli (1:4)	95,3
Bet:Gli (1:4)	96,1

En resumen, los DE formados con cloruro de colina, betaína y prolina como HBA y distintos polialcoholes como HBD son una buena alternativa para la extracción de compuestos fenólicos del RSN, especialmente para obtener extractos ricos en hesperidina, ya que son altamente selectivos. En concreto, el DE Bet:1,2B (1:4) proporcionó los resultados de eficiencia de extracción más altos, por lo que se seleccionó para optimizar la extracción asistida de compuestos fenólicos, utilizando sonda de ultrasonidos y microondas.

#### 4.2.2.2. Extracción asistida por ultrasonidos

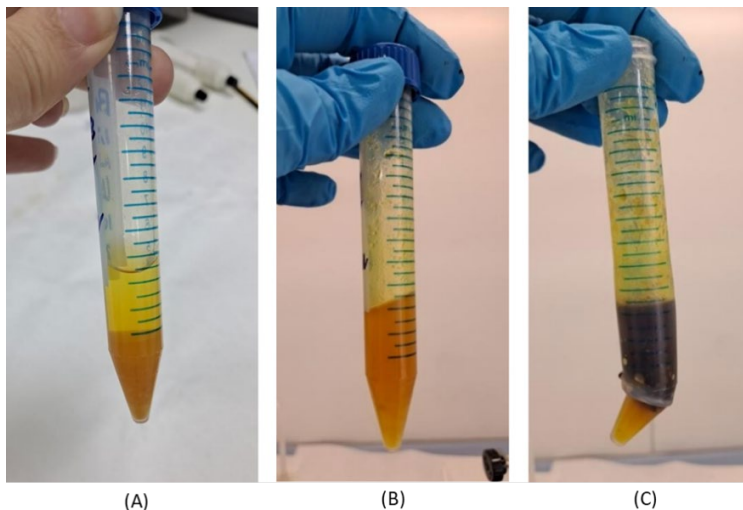
En este apartado se presentan los resultados obtenidos en la intensificación de la extracción utilizando la sonda de ultrasonidos. Para ello, se ha utilizado el DE Bet:1,2B (1:4), al ofrecer

mayor eficiencia de extracción con el agitador orbital, y la disolución de 70% EtOH como disolvente de referencia. En este caso, se ha estudiado el efecto de distintas condiciones de operación, como la potencia (10, 20 y 50 W) y el tiempo (3, 6, 9 y 12 min). En la **Tabla 4.3** se muestra la temperatura final que alcanzaron los extractos, así como el estado en el que se encontraron al finalizar la extracción. Como se puede observar, los resultados muestran que la temperatura aumenta al incrementar tanto la potencia como el tiempo de aplicación de ultrasonidos. En las extracciones con 70% EtOH, también se observó que, al aplicar potencias de 20 y 50 W durante tiempos superiores a 9 min, el disolvente se evapora completamente. Además, en la extracción con Bet:1,2B (1:4), cuando la temperatura aumenta por encima de 100 °C, se produce la gelificación del extracto, lo que imposibilita su análisis. Este efecto se observó a 10 W y 12 min; 20 W y 9 y 12 min; 50 W y 6 min, y podría deberse a la co-extracción de pectina [29,305], un compuesto presente en el RSN. Sin embargo, se necesitan más análisis para corroborar este fenómeno. Por último, a 50 W y 9 min se quemó la muestra, quedando totalmente degradado el extracto.

**Tabla 4.3.** Temperatura final y aspecto de los extractos durante la extracción asistida por sonda de ultrasonidos del RSN.

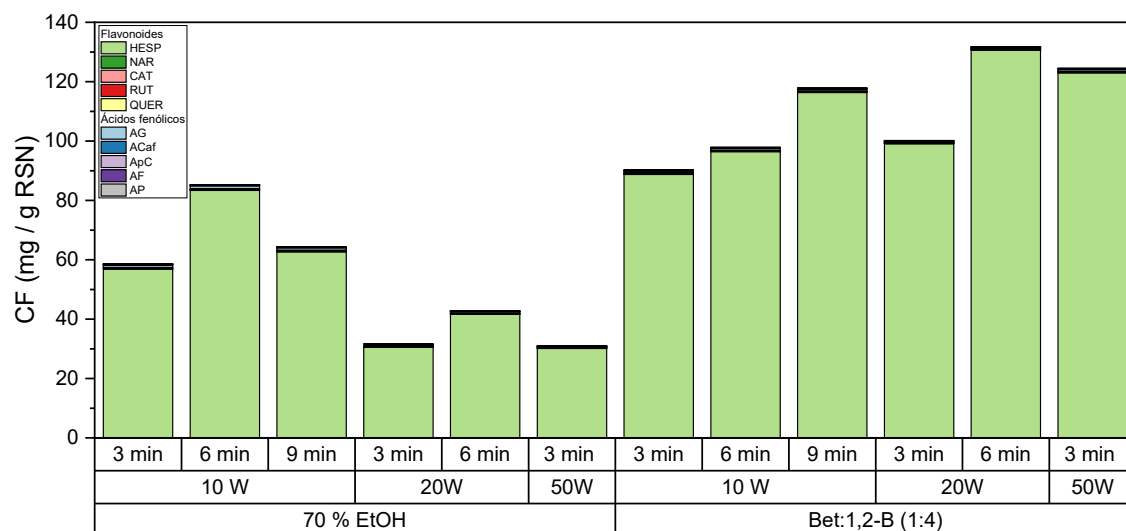
	P (W)	t (min)	T (°C)	Extracto
70% EtOH	10	3	63	Líquido
		6	69	Líquido
		9	73	Líquido
		12	75	Líquido
	20	3	70	Líquido
		6	70	Líquido
		9	-	Evaporado
		12	-	Evaporado
	50	3	71	Líquido
		6	70	Líquido
		9	-	Evaporado
		12	-	Evaporado
Bet:1,2B (1:4)	10	3	72	Líquido
		6	91	Líquido
		9	98	Líquido
		12	102	Gel
	20	3	98	Líquido
		6	100	Líquido
		9	102	Gel
		12	109	Gel
	50	3	100	Líquido
		6	109	Gel
		9	139	Quemado

En la **Figura 4.18** se puede observar el aspecto de las muestras a 50 W en función del tiempo, a 3 min (A), el extracto se mantiene líquido; a los 6 min (B), el extracto se gelifica; y a los 9 min (C), el extracto está totalmente degradado.



**Figura 4.18.** Extracto de RSN con Bet:1,2B (1:4) a 50 W. (A) Tiempo de extracción 3 min, extracto líquido, (B) tiempo de extracción 6 min, extracto gelificado, (C) tiempo de extracción 12 min, extracto quemado.

En la **Figura 4.19** y la **Tabla A.16** (disponible en el Anexo) se muestran los resultados de la cuantificación por HPLC de las extracciones con Bet:1,2B (1:4), en las cuales se obtuvo un extracto líquido, y con 70% EtOH, utilizado como disolvente de referencia.



**Figura 4.19.** Cuantificación por HPLC de la optimización de la extracción asistida por ultrasonidos utilizando 70% EtOH y Bet:1,2B (1:4). Condiciones experimentales: relación D:M= 10; P= 10, 20, 50 W; t extracción= 3, 6, 9 min; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

Como se observa en la **Figura 4.19**, el uso de Bet:1,2B (1:4) ofrece mejores resultados en la extracción de compuestos fenólicos que la disolución de etanol al 70%. Con respecto al tiempo

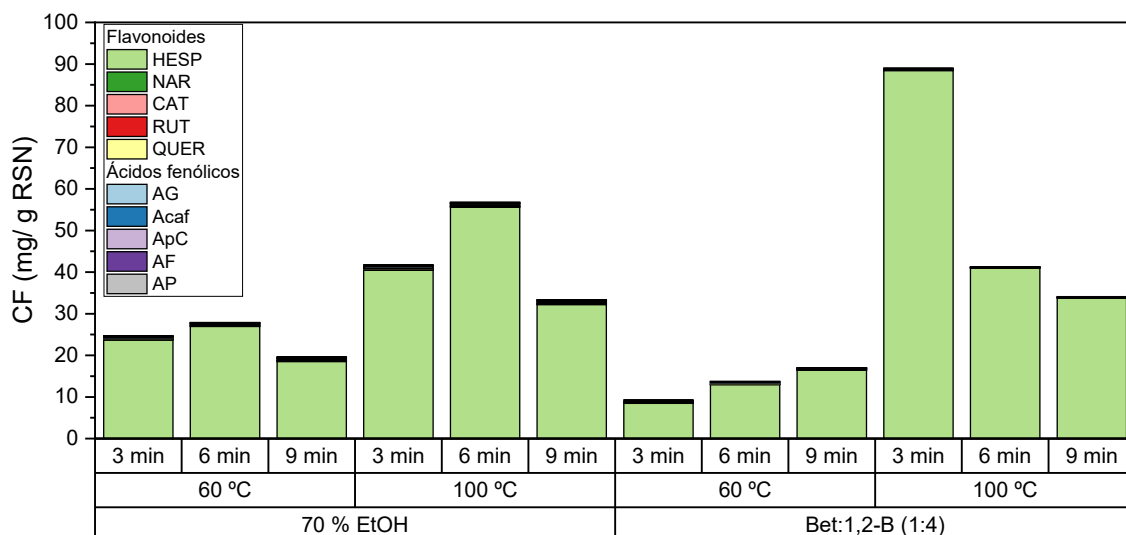
de extracción, a 10 W de potencia para 70% EtOH se obtiene un máximo de extracción a 6 min, disminuyendo la eficiencia cuando aumenta el tiempo a 9 min. Sin embargo, cuando se utiliza Bet:1,2B (1:4), la eficiencia de extracción aumenta al aumentar el tiempo. El tiempo de extracción está relacionado con la temperatura final del proceso. En el caso del 70% EtOH, al tratarse de un disolvente volátil, el aumento de la temperatura de los extractos da lugar a una mayor evaporación y, por lo tanto, a una disminución en el volumen de disolvente disponible para extracción. Este efecto no se produce cuando se utiliza Bet:1,2B (1:4), al ser un disolvente no volátil. Además, en este caso, el aumento de la temperatura también resulta en una reducción de la viscosidad del DE, lo que mejora la interacción soluto – disolvente y, en consecuencia, aumenta la eficiencia de extracción [149,306]. Como se observa en la figura, empleando Bet:1,2B (1:4) se logra un incremento en la eficiencia de extracción desde 90,3 mg CF / g RSN, a 10 W durante 3 min, hasta 117,9 mg CF / g RSN, a 10 W durante 9 min.

Por otro lado, al aumentar la potencia de ultrasonidos en la extracción, se observa un descenso en la eficiencia cuando se utiliza la disolución al 70% de etanol como disolvente, de 58,6 mg CF / g RSN a 10 W y 3 min, a 31,7 y 30,9 mg CF / g RSN a 20 y 50 W, respectivamente. Sin embargo, con el disolvente Bet:1,2B (1:4) se produjo el efecto contrario. En este caso, se obtuvo un incremento en la eficiencia de extracción al aumentar la potencia y mantener fijo el tiempo de extracción en 3 min, desde 90,3 mg CF / g RSN a 10 W, a 100,2 y 124,5 mg CF / g RSN a 20 y 50 W, respectivamente.

En concreto, la extracción con Bet:1,2B (1:4) a 20 W de potencia durante 6 min de extracción dio lugar a la mejor eficiencia de extracción de compuestos fenólicos del RSN, utilizando la sonda de ultrasonidos como técnica de extracción, alcanzando 131,9 mg CF / g RSN. Si bien la extracción asistida por ultrasonidos no mejora la eficiencia de extracción obtenida utilizando agitación orbital a 60 °C durante 100 min (140,2 mg CF / g RSN), sí reduce notablemente el tiempo de extracción de 100 a 6 min.

#### **4.2.2.3. Extracción asistida por microondas**

A continuación, se presentan los resultados de la optimización de la extracción asistida por microondas usando Bet:1,2B (1:4) y 70% EtOH. En este caso, se ha estudiado el efecto de la temperatura (60 y 100 °C) y el tiempo (3, 6 y 9 min) en la eficiencia del proceso. La cuantificación por HPLC de los resultados obtenidos se muestra en la **Figura 4.20** y **Tabla A. 17** (disponible en el Anexo).



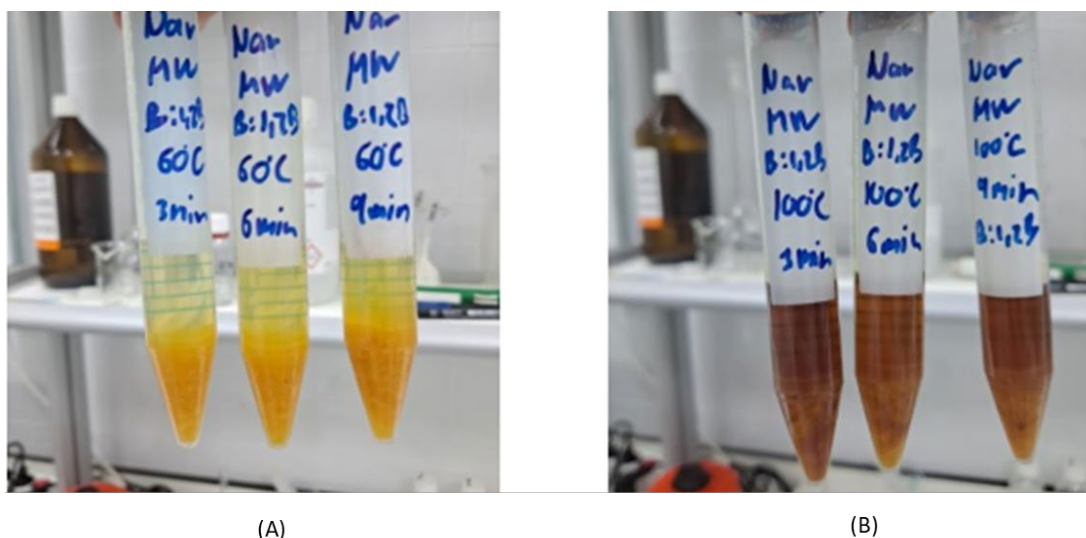
**Figura 4.20.** Cuantificación por HPLC de la optimización de la extracción asistida por microondas utilizando 70% EtOH y Bet:1,2B (1:4). Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 3, 6, 9 min; T= 60, 100 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

Los disolventes eutécticos pueden absorber de forma efectiva la energía microondas, lo que los hace buenos candidatos para su uso en extracciones asistidas [267]. Sin embargo, como se puede ver en la **Figura 4.20**, la extracción con Bet:1,2B (1:4), no mejora los resultados obtenidos con 70% EtOH utilizado como disolvente de referencia, a excepción de la extracción a 100 °C y 3 min.

La temperatura es uno de los factores que más influyen en la extracción asistida por microondas, por lo que es importante identificar la temperatura óptima para extraer los compuestos de interés [307]. El aumento de la temperatura de extracción disminuye la viscosidad y la tensión superficial, y también reduce de la interacción entre los compuestos de interés y la matriz de la muestra, lo que favorece la extracción. Por otro lado, la viscosidad del disolvente afecta a la capacidad de rotación molecular, y por lo tanto, a la capacidad de absorber la radiación de microondas [308]. Por otra parte, las altas temperaturas pueden producir la degradación térmica de ciertos compuestos, subrayando la importancia de establecer la temperatura óptima que equilibre estos efectos [309].

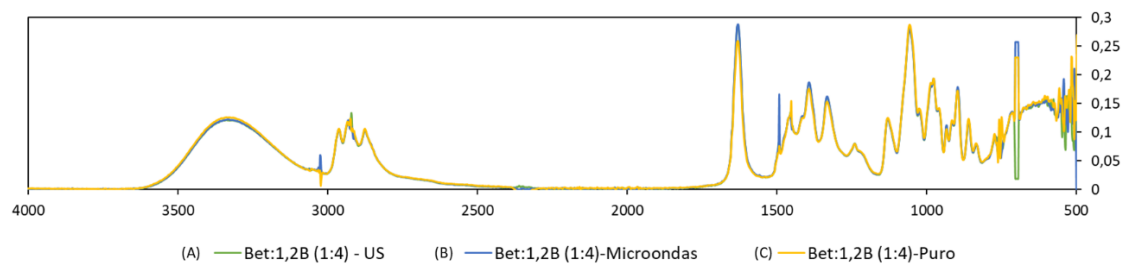
En el estudio del efecto del tiempo y la temperatura en la extracción asistida por microondas utilizando Bet:1,2B (1:4) y 70% EtOH (**Figura 4.20**) se encuentran resultados diferentes en función del disolvente utilizado. Mientras que utilizando 70% EtOH se observa un máximo de extracción a 6 min, tanto a 60 °C como a 100 °C, cuando se utiliza Bet:1,2B (1:4) hay dos comportamientos diferentes en función de la temperatura. A 60 °C, la eficiencia de extracción aumenta con el tiempo (de 9,1 a 17,0 mg CF / g RSN, en la extracción de 3 y 9 min,

respectivamente), pero a 100 °C disminuye la eficiencia al aumentar el tiempo (de 89,0 a 34,3 mg CF / g RS). Esto puede atribuirse a que 100 °C es una temperatura demasiado elevada para la extracción de compuestos fenólicos con el DE, lo que produce la degradación de la muestra. Las fotografías mostradas en la **Figura 4.21** muestran la apariencia del extracto de RSN con Bet:1,2B (1:4) a 60 y 100 °C. Como se puede observar, a 100 °C el extracto sufre degradación y pasa a tener color marrón. Aun así, la cuantificación de compuestos fenólicos en los extractos con Bet:1,2B (1:4) fue más elevada a 100 °C. Esto podría deberse a que a 60 °C el aporte de microondas es pequeño, ya que la temperatura se alcanza rápidamente.



**Figura 4.21.** Extracto de RSN con Bet:1,2B (1:4) utilizando extracción asistida por microondas. (A) Extracto a 60 °C a 3, 6 y 9 min (de izquierda a derecha), (B) Extracto a 100 °C a 3, 6 y 9 min (de izquierda a derecha).

En resumen, aunque la extracción asistida por microondas sea una técnica prometedora, su uso con DE requiere de estudios complementarios. Se necesitan explorar otras temperaturas intermedias y tiempos de extracción más prolongados, además de evaluar la estabilidad de los extractos a altas temperaturas. En relación con esto último, se ha llevado a cabo un estudio de la estabilidad del DE Bet:1,2B (1:4) puro mediante un análisis por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), para obtener información estructural y composicional del DE antes y después de ser sometido a la acción de microondas y ultrasonidos. Como se puede observar en la **Figura 4.22**, los espectros de infrarrojo de las 3 muestras muestran un perfil similar, lo que sugiere que el DE se mantiene estable tras ser sometido a ultrasonidos y microondas. Esto indica que, en las extracciones con microondas a 100 °C, lo que se degrada en el extracto es alguno de los compuestos presente en el RSN, y no los compuestos que conforman el DE.



**Figura 4.22.** Espectro de infrarrojos del DE Bet:1,2B (1:4): (A) tras someterlo a sonda de ultrasonidos durante 20 W y 6 min, (B) tras someterlo a microondas a 100 °C y 6 min, (C) puro.

En resumen, los DE evaluados en este apartado, formados con tres HBA (cloruro de colina, betaína y prolina), junto con diferentes polialcoholes como HBD (1,2-butanodiol; 1,3-butanodiol, 1,2-propanodiol y glicerol), se presentan como una buena alternativa para la valorización del RSN mediante la extracción de compuestos fenólicos de interés. Los DE estudiados mejoran la eficiencia de extracción de los disolventes tradicionales utilizados como referencia, empleando la extracción con agitador orbital a 60 °C durante 100 min. En concreto, el DE Bet:1,2B (1:4) ha mostrado los valores más altos en cuanto a la cantidad de compuestos fenólicos recuperados (140,2 mg CF / g RSN), además de exhibir una alta selectividad hacia la hesperidina (97% de los compuestos fenólicos cuantificados).

Debido al alto rendimiento del disolvente Bet:1,2B (1:4), se ha utilizado para estudiar la extracción asistida por ultrasonidos y microondas. En la extracción asistida por ultrasonidos, los resultados obtenidos con este DE mejoran los alcanzados con 70% EtOH, utilizado como disolvente de referencia; sin embargo, no llegaron a igualar los logrados en la extracción con agitador orbital. Además, se encontraron diferentes problemas a la hora de trabajar con esta técnica, como es la gelificación del extracto cuando se superan 100 °C de temperatura.

En general, los resultados obtenidos en la extracción asistida por microondas con Bet:1,2B (1:4) no mejoran la extracción utilizando 70% EtOH, excluyendo a 100 °C y 3 min. Como se ha podido observar, la temperatura es un factor decisivo en la operación con microondas; por un lado, a 60 °C la eficiencia de extracción fue muy baja, posiblemente porque el tiempo de extracción fuera insuficiente, ya que a 60 °C el aporte de microondas es reducido; sin embargo, por otro lado, a 100 °C se alcanzaron mayores eficiencias de extracción, pero el extracto obtenido fue de color marrón, lo que indica la degradación de algún compuesto presente en el extracto.

En conclusión, los DE representan una alternativa sostenible y prometedora en la extracción de compuestos fenólicos del RSN. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para comprender

su comportamiento empleando técnicas de extracción asistida, que permitan maximizar su eficiencia para obtener antioxidantes a partir de matrices naturales.

### **4.2.3. Extracción sólido-líquido empleado biodisolventes**

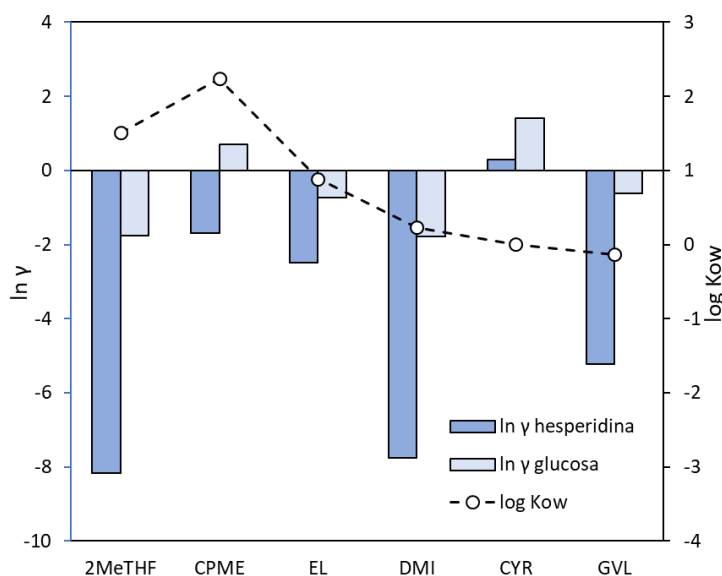
En este apartado se presenta la valorización del residuo sólido de naranja (RSN) a través de la extracción de compuestos fenólicos de alto valor añadido y azúcares, empleando, en este caso, distintos biodisolventes (2MeTHF, CPME, EL, DMI, CYR, GVL).

Primero, se han realizado diferentes cálculos computacionales utilizando el método COSMO-RS, con el objetivo de predecir la interacción de la hesperidina y la glucosa con los biodisolventes. A continuación, se ha estudiado la capacidad de extracción de los distintos biodisolventes, utilizando agitación orbital como técnica de referencia, así como la sonda de ultrasonidos y el microondas como técnicas de extracción asistida. La caracterización de los extractos se ha realizado mediante técnicas colorimétricas como TFC, TPC y AC, junto con distintos análisis cromatográficos. Se ha empleado HPLC-DAD para la cuantificación de los principales compuestos fenólicos y HPLC-RI para la cuantificación de los principales azúcares. Esto permite evaluar la eficiencia de extracción y la afinidad de los disolventes por los distintos compuestos objetivo.

Por último, tras evaluar la distinta afinidad de los biodisolventes por los azúcares y/o los compuestos fenólicos, se propone una valorización completa del RSN a través de una extracción en cascada. El primer paso consiste en obtener un extracto rico en compuestos fenólicos con bajo contenido en azúcares. Posteriormente, en una segunda etapa, se busca obtener un extracto rico en azúcares, que sea fácilmente valorizable a través de la fermentación.

#### **4.2.3.1. Barrido de biodisolventes**

Primero, se realizaron cálculos computacionales con COSMO-RS para predecir la interacción de la hesperidina y la glucosa con los distintos biodisolventes objeto de estudio (2MeTHF, CPME, EL, DMI, CYR, GVL). Se ha elegido la hesperidina al ser el compuesto fenólico mayoritario en el RSN, y la glucosa como azúcar simple presente en la naranja. Los coeficientes de actividad ( $\ln\gamma$ ) de los sistemas hesperidina-glucosa/biodisolvente a dilución infinita, junto con los coeficientes de reparto octanol-agua ( $K_{ow}$ ) a dilución infinita de cada biodisolvente se muestran en la **Figura 4.23**.



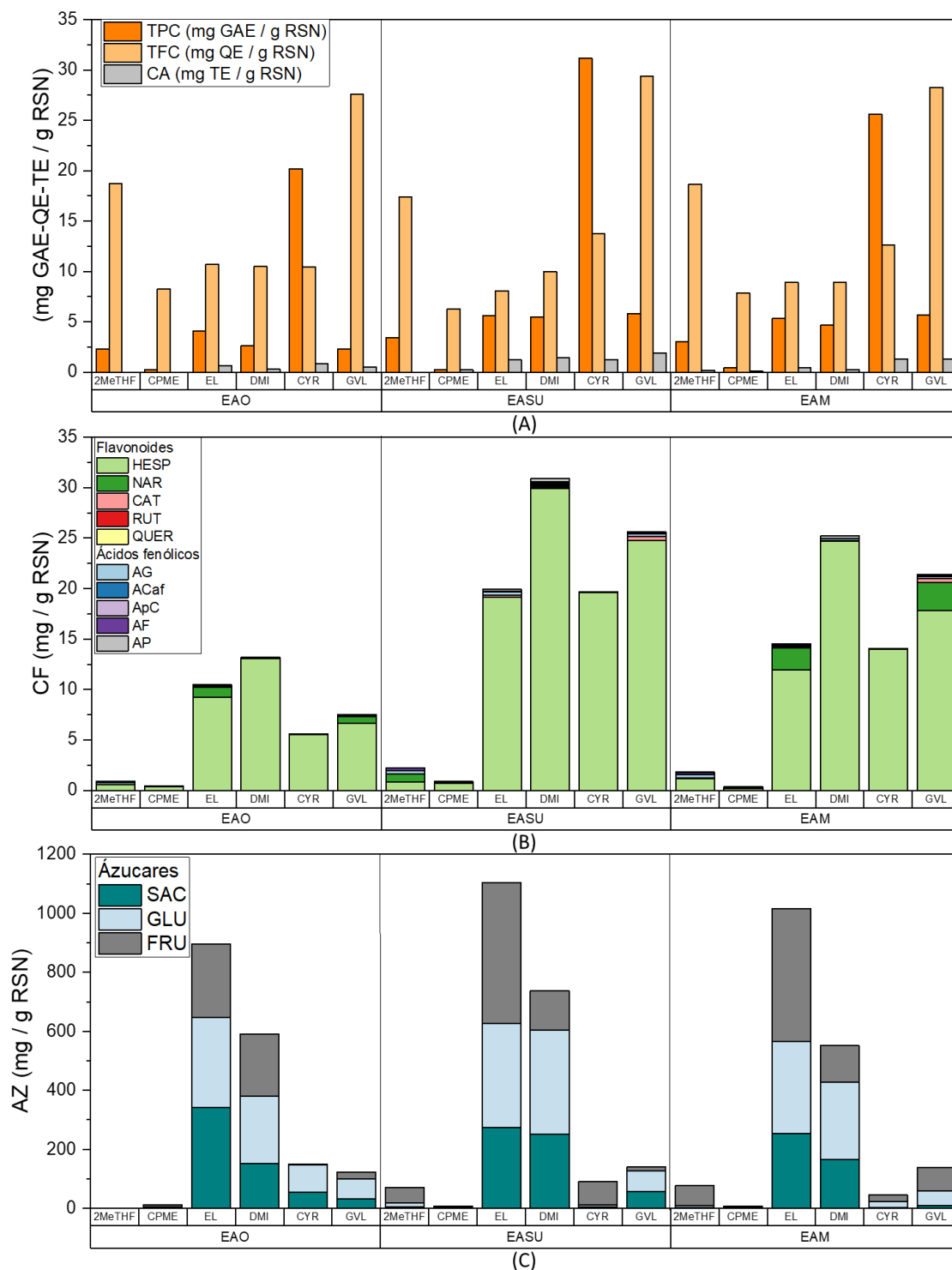
**Figura 4.23.** Coeficientes de actividad a dilución infinita ( $\gamma$ ) de la hesperidina y la glucosa, y coeficiente de reparto octanol-agua a dilución infinita ( $Kow$ ) de los biodisolventes estudiados.

El coeficiente de reparto ( $Kow$ ) se utiliza comúnmente para definir cómo un compuesto objeto de estudio se distribuye en dos fases inmiscibles en equilibrio, generalmente utilizando la mezcla octanol-agua [310]. Con el coeficiente de reparto octanol-agua ( $Kow$ ) se determina el carácter hidrófobo o hidrófilo del compuesto analizado [311]. Como puede verse en la **Figura 4.23**, de los biodisolventes estudiados, el 2MeTHF y el CPME tienen un comportamiento más hidrófobo, ya que sus coeficientes octanol-agua ( $\log Kow$ ) están por encima 1 [88]. El resto de los disolventes estudiados son altamente hidrófilos ya que presentan un  $\log Kow$  menor que 1. Específicamente, el biodisolvente GVL tiene el  $\log Kow$  menor, lo que indica una mayor hidrofiliidad [313,314].

Por otra parte, se ha analizado la idoneidad de estos biodisolventes para la extracción de los compuestos de interés utilizando el coeficiente de actividad a dilución infinita como parámetro termodinámico de referencia. Los logaritmos de los coeficientes de actividad ( $\ln \gamma$ ) son negativos para todos los biodisolventes analizados, tanto para la hesperidina como para la glucosa, excepto para CYR con ambos compuestos objeto de estudio, y para CPME en el caso de la glucosa. Los logaritmos negativos de los coeficientes de actividad sugieren una interacción favorable entre el compuesto y los biodisolventes [315]. Además, la interacción entre los disolventes y la hesperidina parece estar más favorecida en comparación con la glucosa, ya que el coeficiente de actividad de la interacción hesperidina-disolvente es más negativo [316].

Después de estudiar la interacción de los sistemas hesperidina-glucosa/biodisolventes mediante cálculos computacionales con COSMO-RS, se realizaron ensayos experimentales con el objetivo de evaluar la capacidad de extracción de los biodisolventes estudiados (2MeTHF, CPME, EL, DMI,

CYR, GVL). Para ello, se han realizado extracciones utilizando agitación orbital, a 60 °C y 30 min, como técnica de referencia, así como extracción con sonda de ultrasonidos a 10 W durante 6 min y con microondas a 100 °C y 6 min como técnicas de extracción asistida. En la **Figura 4.24** y en la **Tabla A. 18** y **Tabla A. 19**, ambas disponibles en el Anexo, se muestran los resultados obtenidos en la caracterización de los extractos mediante técnicas colorimétricas TPC, TFC y AC y mediante cromatografía, identificando los compuestos fenólicos mayoritarios por HPLC-DAD y los azúcares mayoritarios por HPLC-RI.



**Figura 4.24.** Extracción de RSN utilizando biodisolventes (2Me7HF, CPME, EL, DMI, CYR, GVL) mediante extracción con agitador orbital (EAO), extracción asistida por sonda de ultrasonidos (EASU) y extracción asistida por microondas (EAM). (A) Contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y capacidad antioxidante (CA). (B) Cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD. (C) Cuantificación de azúcares mediante HPLC-RI. Condiciones experimentales: relación D:M= 10. EAO: t extracción= 30 min; T extracción= 60 °C, Agitación: 900 rpm. EASU: t extracción= 6min; P =10 W. EAM: t extracción= 6 min; T= 100 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

En relación con los resultados obtenidos mediante las técnicas colorimétricas TPC, TFC y AC (**Figura 4.24 (A)**), se observa que para todos los disolventes se obtienen resultados mayores para TFC que para TPC, menos con el disolvente CYR. Al trabajar con el biodisolvente CYR se observó una alta interferencia de éste con los reactivos del método Folin-Ciocalteu, y aunque las medidas se realizaron con un blanco de disolvente, se evidencia un considerable error, lo que cuestiona la fiabilidad de los resultados colorimétricos obtenidos para este disolvente. Resultados similares han sido obtenidos por Silva *et al.* [208] en la extracción de compuestos fenólicos de residuo de la industria del kiwi, donde debido a los anillos aromáticos presentes en la estructura del CYR, que producen alta capacidad antioxidante, queda impedida su cuantificación por ninguno de los métodos colorimétricos.

Por otro lado, los resultados de TPC y TFC obtenidos con el resto de los disolventes son similares a los resultados obtenidos en la extracción con 80% EtOH (**apartado 4.2.1.**), donde la alta extracción de hesperidina resultó en valores de TFC mayores que de TPC, aunque las medidas por el método Folin-Ciocalteu engloban a todos los compuestos fenólicos presentes en el extracto y las medidas de TFC cuantifican únicamente los flavonoides.

Además, se ha cuantificado la capacidad antioxidante de los extractos con el método DPPH. En general, como era de esperar, se puede observar una correlación entre la cantidad de compuestos cuantificados por el método Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante [317]. Los resultados de capacidad antioxidante más altos se han obtenido con el disolvente GVL (1,9 mg TE / g RSN en la extracción con ultrasonidos), lo que corresponde con la mayor cantidad de TFC cuantificado (29,4 mg QE / g RSN), y que puede ser atribuido a una mayor actividad antirradicales del extracto obtenido con GVL [209].

Cuando comparamos los resultados obtenidos por técnicas colorimétricas **Figura 4.24 (A)** y por HPLC-DAD **Figura 4.24 (B)**, se pudo observar que los perfiles no son iguales. Al ser las técnicas cromatográficas más fiables, ya que no se ven afectadas por posibles interferencias que alteran los métodos colorimétricos, se van a utilizar para evaluar la eficiencia de extracción de los distintos biodisolventes.

Los resultados obtenidos por HPLC-DAD, donde se cuantifican los principales compuestos fenólicos presente en los extractos, aparecen recogidos en la **Figura 4.24 (B)** y **Tabla A. 19** (disponible en el Anexo). Como puede observarse, los disolventes hidrófobos, 2MeTHF y CPME, tienen una capacidad de extracción significativamente menor en comparación con el resto de biodisolventes estudiados. Esto puede relacionarse con la limitada capacidad de este tipo de

disolventes para introducirse en la pared celular de RSN. Este comportamiento de los disolventes hidrófobos ha sido anteriormente descrito por Safdar *et al.* [281], quienes obtuvieron menor eficiencia de extracción de compuestos fenólicos del RSN con acetato de etilo (disolvente hidrófobo) en comparación con etanol y metanol (disolventes hidrófilos). Este efecto también fue observado en nuestros ensayos preliminares empleando disolventes convencionales, cuyos resultados se muestran en el **apartado 4.2.1**, donde la extracción utilizando acetato de etilo fue significativamente menor que con agua o etanol. Por otro lado, COSMO-RS predijo una gran afinidad entre la hesperidina y el disolvente 2MeTHF (**Figura 4.23**); sin embargo, en el ensayo experimental se obtuvo un bajo rendimiento de extracción, poniendo de manifiesto la limitación de la extracción en sistemas sólido-líquido de los disolventes hidrófobos.

En relación con los biodisolventes hidrófilos, los mejores rendimientos de extracción se obtuvieron con DMI, seguido de GVL, EL y CYR. Estos resultados coinciden con la predicción obtenida con COSMO-RS en función de los coeficientes de actividad obtenidos, ya que el coeficiente de actividad hesperidina/DMI fue el más negativo. Estos resultados revelan que COSMO-RS es un buen método para predecir la interacción de los compuestos de interés y los biodisolventes en la extracción sólido-líquido, cuando estos sean hidrófilos.

En cuanto al estudio de técnicas de intensificación de la extracción, utilizando sonda de ultrasonidos y microondas, se puede observar que las extracciones mantienen el mismo perfil, pero produciéndose un mayor rendimiento al utilizar técnicas asistidas. Tanto en la extracción asistida por ultrasonidos como por microondas, el DMI es el disolvente más eficiente para la extracción de compuestos fenólicos. Además, las técnicas de extracción asistida mejoran la eficiencia, a la vez que reducen considerablemente los tiempos de extracción, pasando de 30 min utilizando el agitador orbital a 6 min empleando microondas o ultrasonidos. Con DMI como disolvente se consigue mejorar la eficiencia de extracción, pasando de 13,3 mg CF / g RSN utilizando agitación orbital a 30,9 y 25,2 mg CF / g RSN con la sonda de ultrasonidos y el microondas, respectivamente. En la extracción asistida por ultrasonidos la mejora se debe a los efectos acústicos producidos por las burbujas de cavitación, lo que causa la disrupción de las paredes celulares del RSN y facilita la liberación de los compuestos de interés al extracto [228]. Sin embargo, en la extracción asistida por microondas, la interacción con el disolvente se produce por calentamiento. La eficacia del calentamiento por microondas está ligada a la capacidad del material para absorber la energía electromagnética y disipar el calor, por lo que

dependerá de la capacidad de absorber la energía microondas del disolvente utilizado [229]. Por lo tanto, el efecto de la extracción asistida por microondas varía según el disolvente empleado.

La cuantificación mediante análisis HPLC-RI de la extracción de los principales azúcares presentes en el RSN (sacarosa, glucosa y fructosa) aparece representada en la **Figura 4.24 (C)**. Una vez más, los disolventes hidrófobos presentan una baja eficiencia de extracción. Comparando los resultados experimentales con el cálculo COSMO-RS, el coeficiente de actividad sugiere una fuerte interacción del 2MeTHF con la glucosa, pero en los resultados experimentales se obtuvo una baja eficiencia de extracción de los compuestos azucarados. Esto manifiesta que, al igual que en la extracción de compuestos fenólicos, la extracción está limitada por la dificultad de penetrar la pared celular que presentan los disolventes hidrófobos.

Por otra parte, en la extracción con disolventes hidrófilos, el biodisolvente EL ofrece la mayor extracción de compuestos azucarados, seguido de DMI, GVL y CYR. Los resultados experimentales obtenidos no concuerdan exactamente con la predicción de COSMO-RS, donde el coeficiente de actividad más bajo fue obtenido para el sistema glucosa/DMI, mientras que experimentalmente el mayor contenido en azúcares se obtiene con EL. En relación con la extracción de azúcares utilizando técnicas de extracción asistidas, se puede observar que los resultados obtenidos con la extracción con sonda de ultrasonidos y microondas son similares a los logrados con agitación orbital. Aunque no se produzca un aumento significativo en la cantidad azúcares extraídos (de 896,3 mg Az / g RSN con agitación orbital, frente a 1004,3 y 1014,5 mg Az / g RSN usando la sonda de ultrasonido y el microondas, respectivamente, usando DMI como biodisolvente), si se produce una disminución del tiempo de extracción (de 30 a 6 min).

Teniendo en cuenta la composición media del residuo sólido de naranja, según la información reportada en bibliografía, los compuestos azucarados solubles representan entre el 17 y el 40% de la masa [318,319]. De estos azúcares solubles la mayor parte se compone de glucosa, sacarosa y fructosa, mostrando una gran variabilidad en su composición en función del punto de maduración de la fruta [320]. Por otro lado, el contenido de compuestos fenólicos totales no supera el 4,9%, de los cuales alrededor del 2% corresponde a flavonoides, [321,322]. Por lo tanto, considerando la extracción tanto de compuestos fenólicos como de compuestos azucarados, se observa que el biodisolvente GVL presenta una gran afinidad hacia los compuestos fenólicos, mientras que la extracción de azúcares es menor teniendo en cuenta el contenido de estos en el residuo sólido de naranja. Por el contrario, el EL ofrece una alta eficiencia de extracción de azúcares mientras que la extracción de compuestos fenólicos no es

particularmente elevada. Debido a la capacidad de extracción y afinidad por los distintos compuestos que ofrecen los biodisolventes GVL y EL, se propone una valoración completa del residuo sólido de naranja a través de una extracción en cascada. Este enfoque propone, en primer lugar, la obtención de un extracto rico en compuestos fenólicos, con limitado contenido en azúcar mediante la extracción con GVL. Posteriormente, se realizará una extracción con EL con el objetivo de obtener un extracto rico en azúcares y con bajo contenido de compuestos fenólicos, ya que estos últimos pueden actuar como inhibidores de la fermentación.

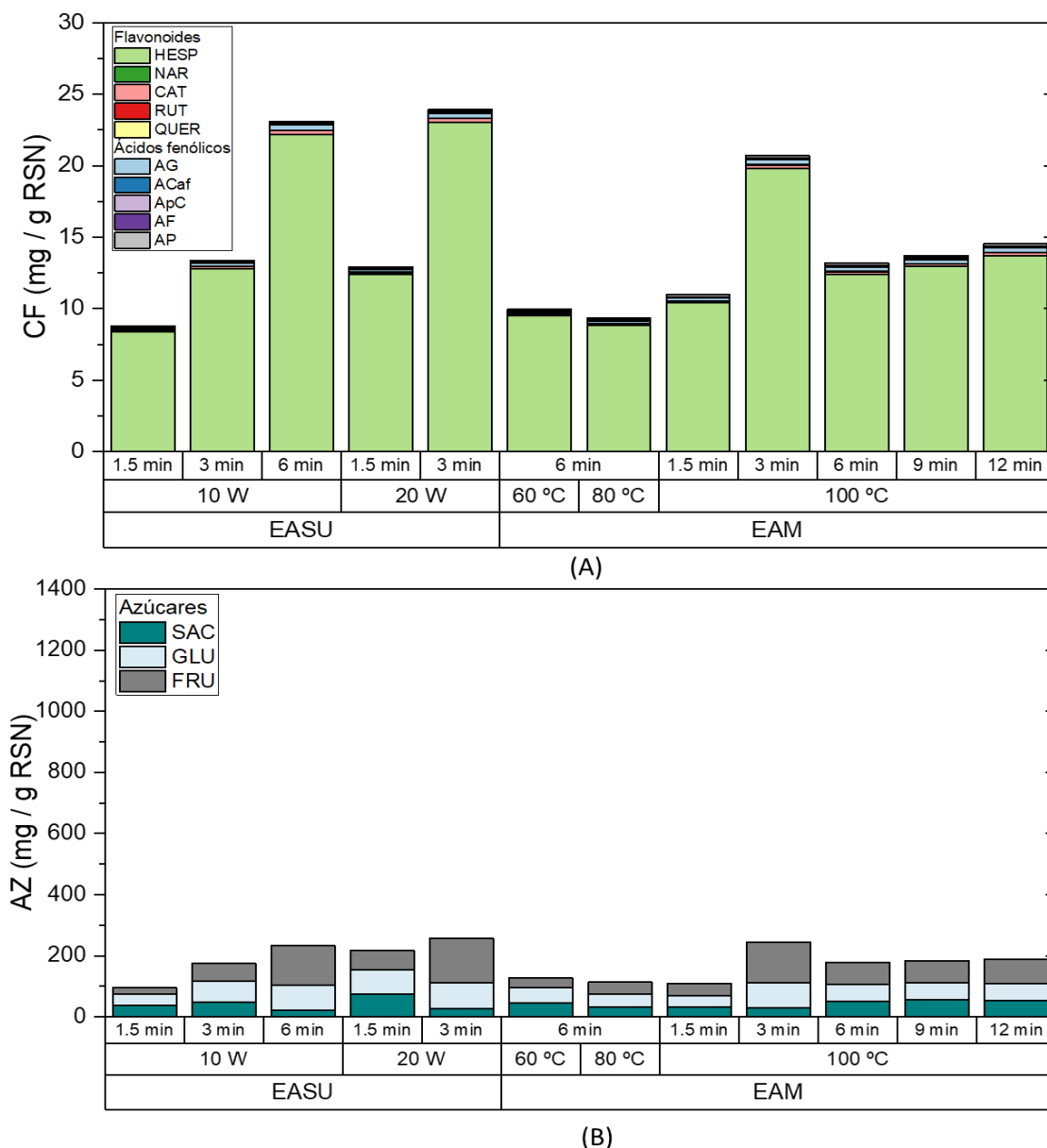
#### **4.2.3.2. Extracción en cascada**

Con el objetivo de favorecer una valorización eficiente del residuo sólido de naranja, se propone una extracción en cascada para aprovechar distintas fracciones del residuo. En concreto, en base a los resultados obtenidos en el barrido de extracción con biodisolventes, en este apartado se propone la valorización en cascada a través de la extracción utilizando biodisolventes y técnicas de extracción asistida.

En la primera etapa, se propone la extracción de compuestos fenólicos utilizando GVL, debido a su elevada afinidad por estos compuestos y su capacidad para mantener un bajo rendimiento de extracción de azúcares. En la segunda etapa, se propone la extracción de los azúcares, utilizando para ello EL, con el objetivo de obtener un extracto rico en azúcares y con bajo contenido en compuestos fenólicos. Este extracto, al ser rico en azúcares y tener una baja concentración de inhibidores (compuestos fenólicos), podría ser utilizado en procesos de fermentación para producir biocombustibles [323].

#### **Optimización de la primera etapa: extracción de compuestos fenólicos**

En primer lugar, se optimizaron los parámetros de operación de la sonda de ultrasonidos y del microondas en la extracción de compuestos fenólicos utilizando GVL como disolvente, con el objetivo de obtener un extracto lo más concentrado posible de compuestos fenólicos, manteniendo la extracción de azúcares baja. Para ello, se ha estudiado el efecto de la potencia de ultrasonidos (10 y 20 W) y el tiempo (1,5-6 min) en la extracción asistida por ultrasonidos, y el efecto de la temperatura (60, 80, 100 °C) y el tiempo (1,5-12 min) en la extracción asistida por microondas. Los resultados de la optimización se muestran en la **Figura 4.25** y **Tabla A. 20**, disponible en el Anexo.



**Figura 4.25.** Optimización con GVL como disolvente de la extracción asistida por sonda de ultrasonidos y microondas. (A) Cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD y (B) cuantificación de azúcares mediante HPLC-RI. Condiciones experimentales: relación D:M= 10. EASU: t extracción= 1,5; 3 y 6 min; P =10 y 20 W. EAM: t extracción= 1,5; 3; 6; 9 y 12 min; T= 60, 80 y 100 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

Con respecto a la extracción de compuestos fenólicos con la sonda de ultrasonidos, como puede observarse en la **Figura 4.25 (A)**, al aumentar el tiempo de extracción aumenta el rendimiento, tanto a 10 como 20 W, aumentando de 8,8 a 23,10 mg CF / g RSN en la extracción de 10 W a 1,5 y 6 min, respectivamente, y de 12,9 a 23,9 mg CF / g RSN en la extracción a 20 W a 1,5 y 3 min. En la extracción con la sonda de ultrasonidos no puede fijarse la temperatura, por lo que en la **Tabla 4.4** se muestra la temperatura final de la extracción medida con un termómetro. Se observa que al aumentar el tiempo y la potencia en la extracción, aumenta la temperatura y, con ello, la eficiencia de extracción.

**Tabla 4.4.** Temperatura final en la optimización de la extracción con sonda de ultrasonidos empleando GVL.

Disolvente	Potencia	Tiempo (min)	Temperatura final (°C)
GVL	10 W	1,5	45
		3	75
		6	105
		12	Quemado
	20 W	1,5	81
		3	110

La mejora en la eficiencia de extracción al aumentar la potencia y el tiempo de extracción pueden estar asociadas a una combinación de efectos. El aumento de la temperatura reduce la constante dieléctrica de los disolventes, modificando sus características químicas y por lo tanto la capacidad de extraer los compuestos fenólicos [324]. Del mismo modo, el aumento de la temperatura produce un descenso en la viscosidad del disolvente, lo que facilita la difusión del disolvente a través de las paredes celulares [296]. La cavitación acústica producida por las ondas de ultrasonidos también puede verse significativamente potenciada por el aumento de la temperatura. Al aumentar la presión de vapor del líquido, aumenta la formación de burbujas de cavitación, y se produce cavitación ultrasónica a la intensidad más baja de las ondas de ultrasonidos [325].

Por otro lado, al aumentar el tiempo de extracción por encima de 6 min se quemó el extracto debido al alto aumento de la temperatura. Además, el aumento de la temperatura puede producir degradación de los compuestos fenólicos presentes en la muestra al tratarse de compuestos termolábiles [326].

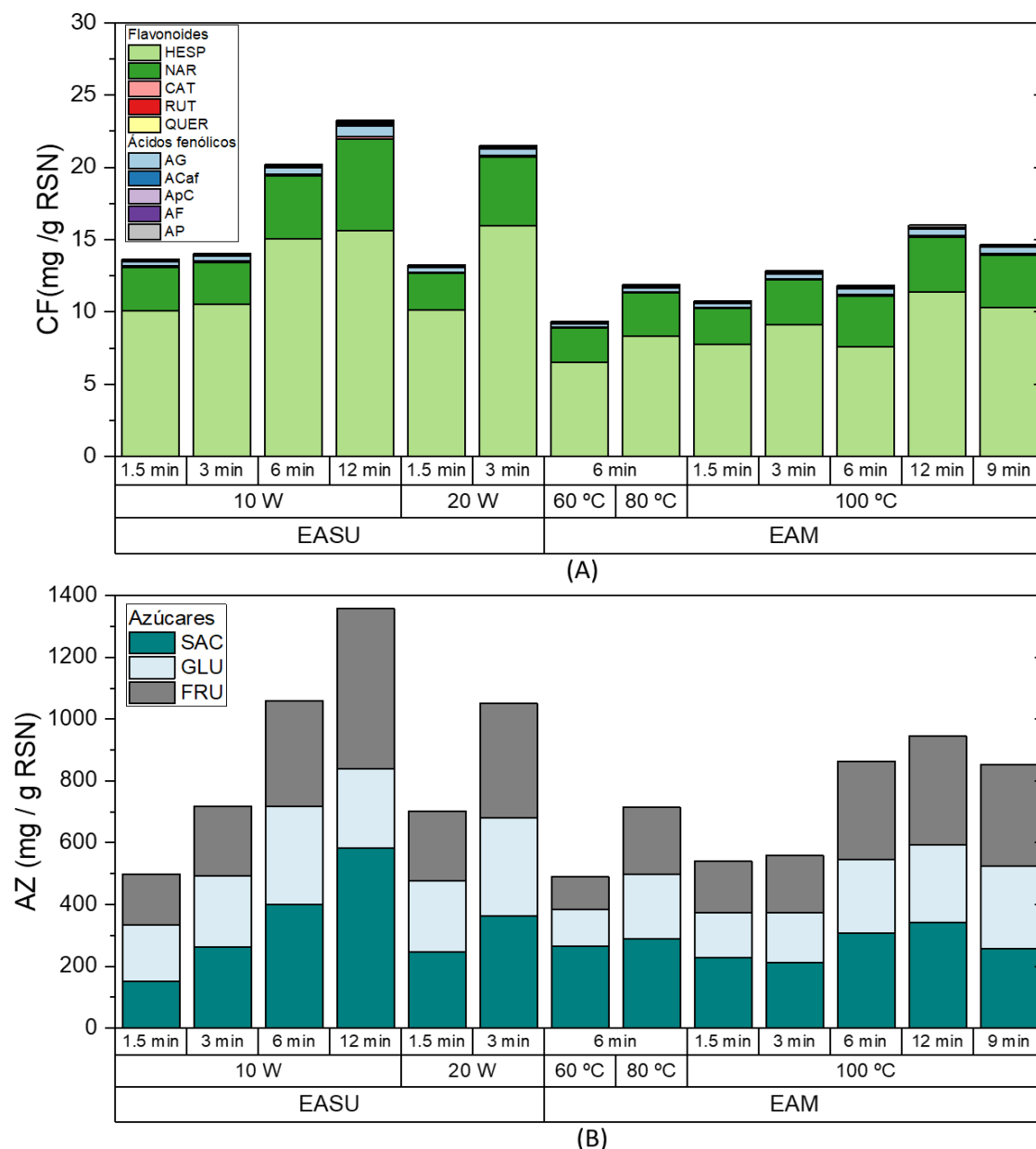
En relación con la extracción asistida por microondas, primero se estudió el efecto de la temperatura a 60, 80 y 100 °C, fijando el tiempo de extracción en 6 min. Como se puede observar en la **Figura 4.25 (A)**, al igual que en la extracción con la sonda de ultrasonidos, al aumentar la temperatura aumenta la eficiencia de extracción. En particular, al aumentar la temperatura de 60 a 100 °C, se produjo un incremento de la eficiencia de extracción de 9,9 a 13,8 mg CF / g RSN. El aumento de la temperatura favorece la extracción asistida por microondas como se ha comentado en el **apartado 4.2.1.3**.

Por último, en relación con la extracción de azúcares (**Figura 4.25 (B)**), hay una correlación entre la cantidad de compuestos fenólicos extraídos y la cantidad de azúcares. La máxima extracción de azúcares se ha obtenido durante la extracción asistida por sonda de ultrasonidos a 20 W y 3 min (257 mg AZ /g RSN), seguido de la extracción asistida por microondas a 100 °C y 3 min (201,9 mg AZ /g RSN).

Teniendo en cuenta estos resultados, se propone la extracción asistida por sonda de ultrasonidos a 10 W y 6 min como condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos de alto valor añadido utilizando GVL como disolvente.

#### **Optimización de la segunda etapa: extracción de azúcares**

En la segunda etapa de la extracción en cascada, se pretende optimizar la recuperación de azúcares utilizando lactato de etilo (EL) como biodisolvente. Para ello, se ha estudiado el efecto de la potencia de ultrasonidos (10 y 20 W) y el tiempo (1,5-12 min) en la extracción asistida por ultrasonidos, así como el efecto de la temperatura (60, 80, 100 °C) y el tiempo (1,5-12 min) en la extracción asistida por microondas. Los resultados de la optimización están representados en la **Figura 4.26** y **Tabla A. 21**, disponible en el Anexo.



**Figura 4.26.** Optimización con EL como disolvente en la extracción asistida por sonda de ultrasonidos y microondas. (A) Cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD y (B) cuantificación de azúcares mediante HPLC-RI. Condiciones experimentales: relación D:M= 10. EAO. EASU: t extracción= 1,5; 3 y 6 min; P =10 y 20 W. EAM: t extracción= 1,5; 3; 6; 9 y 12 min; T= 60, 80 y 100 °C; t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

En la optimización con EL se pretende obtener el máximo contenido de azúcares posible. Con respecto a la extracción asistida por la sonda de ultrasonidos, se obtiene un mayor rendimiento al aumentar el tiempo y la potencia de extracción. Como se observa en la **Tabla 4.5**, el aumento del tiempo y la potencia de extracción produce un aumento en la temperatura final del extracto. Al igual que se ha comprobado durante la optimización con GVL, la temperatura es un factor importante en la extracción, ya que mejora la capacidad de extraer compuestos de la matriz sólida, alcanzando un máximo de extracción utilizando la sonda de ultrasonidos a 10 W y 12 min

(1357,2 mg AZ /g RSN). Sin embargo, como la temperatura final del extracto alcanzó 126 °C, se escoge la extracción durante 6 min como condiciones óptimas en la extracción con sonda de ultrasonido, con el objetivo de evitar la degradación del extracto.

**Tabla 4.5.** Temperatura final en la optimización de la extracción con sonda de ultrasonidos con EL.

Disolvente	Potencia	Tiempo (min)	Temperatura final (°C)
EL	10 W	1,5	48
		3	71
		6	98
		12	126
	20 W	1,5	80
		3	115

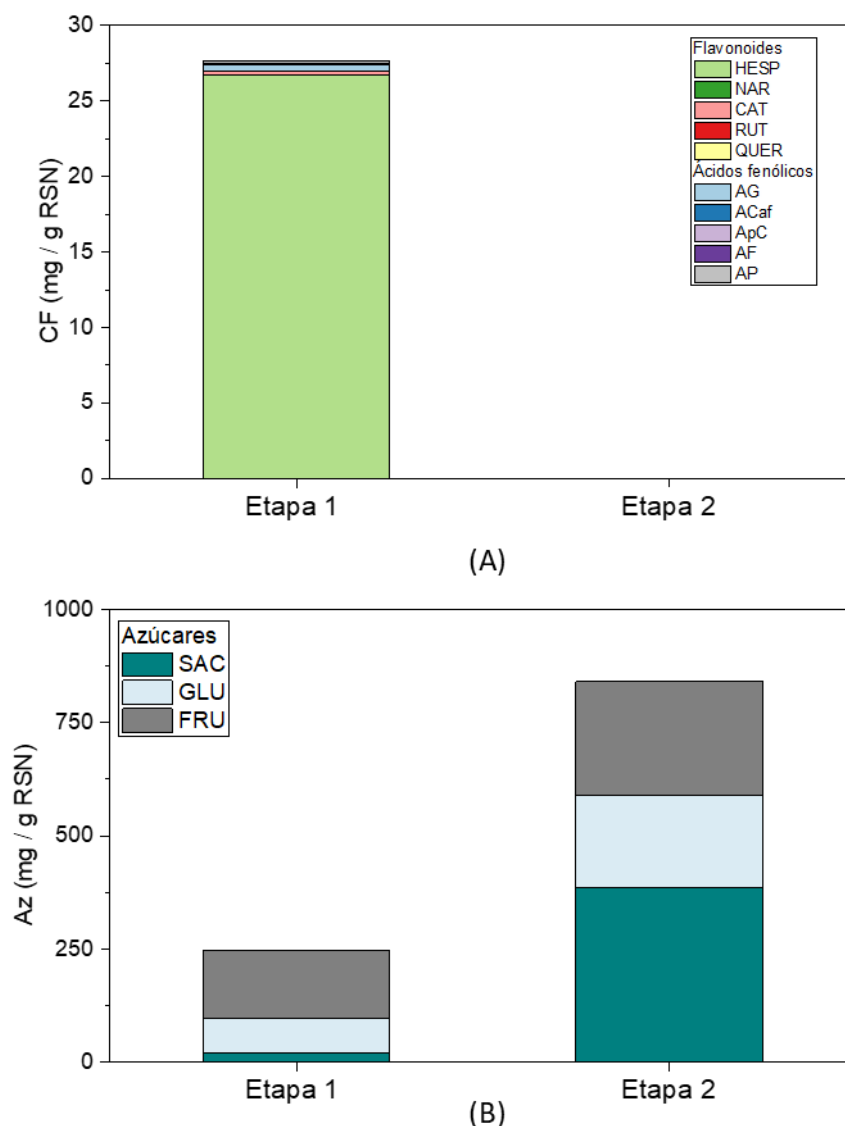
Por otro lado, en la extracción asistida por microondas, se puede observar un aumento en la eficiencia de extracción al aumentar la temperatura y el tiempo. Fijando el tiempo de extracción en 6 min, se observa un aumento en la extracción de 490,1 mg AZ /g RSN a 60 °C hasta 714,1 y 864,3 mg AZ /g RSN a 80 °C y 100 °C, respectivamente. Como se obtiene la mayor eficiencia de extracción a 100 °C, se hace un estudio del efecto del tiempo de 1,5 a 12 min. Con el aumento del tiempo de extracción a 12 min se obtuvieron 946,2 mg AZ /g RSN. Sin embargo, la extracción asistida por microondas no mejora los resultados obtenidos en la extracción de azúcares utilizando la sonda de ultrasonidos. Por lo tanto, se propone la extracción asistida por sonda de ultrasonidos a 10 W y 6 min como condiciones óptimas para la extracción de azúcares con EL.

#### **Prueba de concepto: extracción en cascada**

Tras optimizar las condiciones de extracción de los compuestos fenólicos y de los azúcares, se ha realizado una extracción en cascada como prueba de concepto. Primero, se ha realizado la extracción utilizando GVL como disolvente con el objetivo de obtener un extracto rico en compuestos fenólicos (primera etapa). Para ello, se pusieron en contacto 0,5 g de RSN con 5 mL de GVL, realizando la extracción por triplicado, y utilizando las condiciones de operación previamente optimizadas: extracción asistida por sonda de ultrasonidos a 10 W y 6 min. Como puede observarse en la **Figura 4.27** y **Tabla A. 22** (disponible en el Anexo), en la primera etapa se obtiene un extracto con contenido de compuestos fenólicos de 27,7 mg CF / g RSN, de los cuales el 96,4% es HESP, mientras que el contenido en azúcares fue de 246,1 mg AZ / g RSN.

Para llevar a cabo la segunda etapa, se retiró el disolvente y se procedió a secar el residuo resultante en la estufa. A continuación, se pusieron en contacto 0,5 g del residuo y 5 mL de EL, realizando la extracción por duplicado. Con el objetivo de obtener un extracto rico en azúcares,

se utilizaron las condiciones de operación previamente optimizadas: extracción asistida por sonda de ultrasonidos y empleando como disolvente lactato de etilo (EL) a 10 W y 6 min. Como se observa en **Figura 4.27**, en la segunda etapa, el contenido en compuestos fenólicos quedó por debajo del límite de detección del HPLC, por lo que puede considerarse trazas, mientras que se obtuvieron 841,3 mg AZ / g RSN, alrededor de 3,5 veces más que lo obtenido la primera etapa.



**Figura 4.27.** Valorización del RSN a través de una extracción en cascada. Etapa 1: Extracción asistida por sonda de ultrasonidos con GVL como disolvente. Etapa 2: extracción asistida por ultrasonidos empleando como disolvente EL. (A) Cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD y (B) cuantificación de azúcares mediante HPLC-RI. Condiciones experimentales Etapa 1 y 2: relación D:M= 10. EASU: t extracción= 6 min; P =10 W; t centrifugación (4200 rpm)= 10 min.

En la primera etapa de extracción, utilizando el biodisolvente GVL, se obtiene un extracto rico en compuestos fenólicos de alto valor añadido. Esto se completa con una segunda etapa de extracción utilizando EL, con el objetivo de obtener un extracto rico en azúcares fermentables y

bajo en compuestos fenólicos, conocidos por ser inhibidores de la fermentación. Este enfoque permite una valorización completa del RSN, aprovechando sus componentes de manera eficiente y sostenible.

En resumen, se ha demostrado la viabilidad de la valorización integral del RSN a través de una extracción en cascada. Esto implica el uso de biodisolventes con distinta afinidad por los compuestos de interés (GVL y EL). Además, el empleo de extracción asistida por sonda de ultrasonidos resulta en una disminución significativa del tiempo de extracción y el consumo energético asociado.



## 5. Conclusiones Generales



Los resultados obtenidos a lo largo de la presente Tesis Doctoral promueven la aplicación de disolventes sostenibles y técnicas de extracción asistidas para aumentar la sostenibilidad y la eficiencia de los procesos de extracción en biorrefinerías dentro del marco de la Química Verde. En concreto, este proyecto se centra en dos procesos específicos. En primer lugar, se estudia la extracción de inhibidores de la fermentación de corrientes acuosas ricas en azúcares, con el objetivo de aumentar el rendimiento de la posterior fermentación. En este sentido, los disolventes eutécticos y los biodisolventes hidrófobos han demostrado ser agentes prometedores para emplearse en el diseño de métodos de extracción sostenible para la eliminación selectiva de inhibidores de la fermentación. Por otro lado, se estudia también la aplicación de disolventes convencionales, disolventes eutécticos hidrófilos y biodisolventes, junto con técnicas de extracción asistida (ultrasonidos y microondas), en la recuperación sostenible de biocompuestos de alto valor añadido presentes en residuos agroalimentarios, concretamente en el residuo sólido de naranja. Este trabajo es fundamental para avanzar en técnicas de valorización y gestión de residuos de la biomasa.

En general, se ha demostrado que los disolventes eutécticos hidrófobos y los biodisolventes hidrófobos son una buena alternativa a los disolventes tradicionales en la extracción selectiva de inhibidores de la fermentación presentes en corrientes acuosas. También, estos disolventes se presentan como una alternativa sostenible para la extracción de compuestos fenólicos antioxidantes del residuo sólido de naranja. Además, las técnicas de extracción asistida reducen significativamente los tiempos de extracción sólido-líquido manteniendo la eficiencia en la recuperación de compuestos de interés.

A continuación, se señalan las principales conclusiones extraídas de esta Tesis Doctoral:

#### Extracción selectiva de inhibidores y azúcares:

1. Los métodos de extracción líquido-líquido han sido estudiados usando tres DE hidrófobos formados a partir de la mezcla binaria de tres ácidos carboxílicos (C8C10; C8-C12; C10-C12) y biodisolventes (2MeTHF; CPME; LIM), para extraer compuestos inhibidores de la fermentación. Se ha estudiado el efecto de la concentración inicial y la temperatura en la extracción de una mezcla multicomponente compuesta por fenol, *o*-cresol, guayacol, siringol y vainillina. Se ha comprobado que la concentración inicial de la mezcla no tiene un impacto significativo en la eficiencia de extracción y, en general, no se observaron mejoras notables en la eficiencia de extracción al aumentar la temperatura.

2. A continuación, a esta mezcla de compuestos fenólicos se le añadió también glucosa, con el objetivo de estudiar la selectividad de los disolventes estudiados. Se obtuvieron resultados prometedores, especialmente con el biodisolvente CPME, con el que se consiguió una eficiencia de extracción superior al 93% para los compuestos fenólicos, e inferior al 4% en el caso de la glucosa.
3. Después de seleccionar el CPME como disolvente para la extracción selectiva de inhibidores, se ha optimizado la extracción en función de parámetros que afectan al proceso (tiempo y relación D:M), para una mezcla sintética más compleja formada por dos furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural), diez compuestos fenólicos (fenol, guayacol, siríngol, 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vainíllinico, ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico) y tres azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa). En relación con el tiempo de extracción, se ha observado que la eficiencia de extracción aumenta al prolongar el tiempo hasta alcanzarse un máximo de extracción a los 30 min, manteniéndose constante a partir de este punto. Con respecto a la relación D:M, la eficiencia de extracción aumenta al incrementar el volumen de disolvente, hasta alcanzar un valor óptimo cuando la relación D:M igual a 1.
4. Al analizar las estructuras de los compuestos involucrados en los procesos de extracción, se observó que el carácter hidrofóbico conferido por los grupos funcionales y la complejidad de la estructura molecular influyen en las tendencias observadas. Las moléculas simples muestran mayores eficiencias de extracción, ya que presentan un menor impedimento estérico. Además, la presencia de grupos funcionales hidrófobos facilita la interacción con el disolvente, lo que favorece el proceso.
5. Finalmente, se ha utilizado el método COSMO-RS para comprender las interacciones entre los compuestos de interés y los disolventes objeto de estudio. Se encontró que los disolventes que promueven los enlaces de hidrógeno, como CPME o 2MeTHF, favorecen la extracción. Además, los azúcares presentaron interacciones más débiles, lo que explica los altos valores de selectividad obtenidos.

#### Extracción de antioxidantes a partir de residuo sólido de naranja:

1. Primero, se estudió la mejora de la recuperación de compuestos fenólicos de los residuos de cáscara de naranja mediante extracción asistida por ultrasonidos y microondas, en comparación con la extracción tradicional usando un agitador orbital. Respecto al disolvente de extracción (H<sub>2</sub>O, 80% EtOH y EA), se observó que los disolventes hidrofóbicos como EA no son efectivos para la extracción sólido-líquido del

- residuo sólido de naranja, ya que la capacidad de penetración en la matriz es menor. En cuanto a los disolventes polares estudiados, se encontró que la extracción con H<sub>2</sub>O es menos selectiva, mientras que la extracción con 80% EtOH demostró ser la más eficiente, ya que la solubilidad de los compuestos fenólicos es mayor en etanol, y la adición de agua promueve la desorción de los compuestos objetivo de la matriz.
2. En la extracción con agitador orbital se concluyó que el aumento de la temperatura de 30 a 60 °C mejoró la extracción de compuestos fenólicos, mientras que tiempos de extracción superiores a 30 min redujeron los rendimientos de extracción, probablemente debido a la degradación de los compuestos. Cuando la extracción se lleva a cabo durante 30 min a 60 °C utilizando 80% EtOH, se lograron valores de extracción de 35,2 mg CF / g RSN.
  3. En cuanto a la extracción asistida por ultrasonidos, se encontró que el uso de un baño de ultrasonidos no mejora el rendimiento de extracción, mientras que el uso de una sonda de ultrasonidos sí mejora la eficiencia del proceso. La sonda de ultrasonidos permite una transmisión directa de mayor energía a la matriz, reduciendo el tiempo de extracción de 30 a 1,5 min, mejorando la eficiencia de extracción (40,7 mg CF / g RSN, en la extracción con sonda de ultrasonidos durante 1,5 min y 10 W de potencia, usando 70% EtOH como disolvente).
  4. En relación con el uso de la extracción asistida por microondas, se concluyó que es la técnica más eficaz, ya que el tiempo de extracción se puede reducir de 30 a 6 min, mientras que aumenta significativamente la recuperación de compuestos fenólicos, en la extracción a 100 °C. Los mejores resultados se han obtenido en la extracción con microondas durante 6 min y 100 °C, consiguiendo 58,6 mg CF / g RSN, usando 70% EtOH como disolvente.
  5. En esta Tesis Doctoral también se ha evaluado la extracción de compuestos fenólicos del residuo sólido de naranja utilizando disolvente eutécticos hidrófilos formados por distintos constituyentes: tres HBA (cloruro de colina, betaína y prolina), y distintos polialcoholes como HBD (1,2-butanodiol; 1,3-butanodiol, 1,2-propanodiol y glicerol). Los DE estudiados mejoran la eficiencia de extracción de los disolventes tradicionales utilizados como referencia. En concreto, los mejores resultados de extracción se obtuvieron con el DE formado a partir de betaína y 1,2-butanodiol, consiguiendo 140,2 mg CF /g RSN.
  6. En la optimización de la extracción del DE Bet:1,2B (1:4), utilizando extracción asistida por sonda de ultrasonidos, se encontraron mejores resultados de extracción utilizando

- el DE que la disolución de etanol al 70% empleada como disolvente referencia. Sin embargo, se encontraron dificultades al utilizar esta técnica, ya que al aumentar el tiempo o la potencia de extracción el DE las muestras puede sufrir degradación o gelificación.
7. En la extracción asistida por microondas, los resultados obtenidos con el DE Bet:1,2B (1:4) no mejoraron los resultados obtenidos con la disolución 70% EtOH, utilizada como referencia. En la extracción a 60 °C, la eficiencia de extracción fue muy baja, posiblemente porque la energía microondas sea reducida a esa temperatura. Por otro lado, a 100 °C se alcanzaron mayores eficiencias de extracción, pero se produjo degradación del extracto.
  8. Por último, se estudió la extracción de compuestos fenólicos y azúcares del residuo sólido de naranja utilizando biodisolventes (2MeTHF, CPME, EL, DMI, CYR y GVL), empleando el agitador orbital y la extracción asistida por ultrasonidos y microondas. Con los disolventes hidrófobos (2MeTHF y CPME) se obtuvieron resultados de extracción significativamente inferiores a los obtenidos con el resto de biodisolventes. Los mejores resultados de extracción de compuestos fenólicos se obtuvieron con el biodisolvente DMI. Tanto la extracción asistida por ultrasonidos como por microondas, para los biodisolventes estudiados, se obtuvo una mejora en la eficiencia de extracción a la vez que una reducción significativa en el tiempo (de 30 a 6 min).
  9. En el caso de la extracción de compuestos fenólicos y azúcares, se comprueba que el biodisolvente GVL presenta una gran afinidad hacia los compuestos fenólicos, mientras que la extracción de azúcares es limitada. Por el contrario, el biodisolvente EL ofrece una alta extracción de azúcares. Por este motivo, en esta Tesis Doctoral se propone una extracción en cascada con el objetivo de valorizar dos fracciones diferentes del residuo sólido de naranja, extrayendo en una primera etapa compuestos fenólicos y en una segunda etapa azúcares.
  10. En la primera etapa de extracción, utilizando el biodisolvente GVL, se obtiene un extracto rico en compuestos fenólicos de alto valor añadido. En la segunda etapa de extracción, utilizando EL, se obtiene un extracto rico en azúcares sin compuestos fenólicos cuantificables.

En términos generales esta Tesis Doctoral proporciona información útil en el marco de la Química Verde para desarrollar y optimizar procesos sostenibles de extracción en las biorrefinerías. En concreto, los disolventes eutécticos y biodisolventes hidrófobos estudiados son altamente eficientes y selectivos en la extracción de inhibidores de la fermentación en

corrientes ricas en azúcares. Por otro lado, los disolventes hidrófilos son eficientes en la extracción de compuestos fenólicos del residuo sólido de naranja. Además, las técnicas de extracción asistida por ultrasonidos y microondas reducen notablemente los tiempos de extracción, manteniendo, o incluso mejorando, la eficiencia de extracción. Todo esto contribuye de manera significativa a promover la bioeconomía circular y a avanzar en el cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible.



## Referencias



- [1] F. biorefinery concept: U. biomass instead of oil for producing energy and chemicals also Cherubini, The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals, *Energy Convers. Manag.* 51 (2010) 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>.
- [2] D. Solomon, S., M. Qin, Z. Manning, M. Chen, K.B. Marquis, M.T. Averyt, Miller HL, S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor, H.L. Miller, Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, IPCC, 2007 Summ. Policymakers. Geneva (2007) 996. <https://doi.org/10.1038/446727a>.
- [3] M. Gavrilescu, Biorefinery Systems: An Overview, *Bioenergy Res. Adv. Appl.* (2014) 219–241. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59561-4.00014-0>.
- [4] IEA, *World Energy Outlook*, 2023.
- [5] IEA, *The future of petrochemicals*, 2018. <https://doi.org/10.1787/9789264307414-en>.
- [6] G. Lopez, D. Keiner, M. Fasihi, T. Koiranen, C. Breyer, From fossil to green chemicals: sustainable pathways and new carbon feedstocks for the global chemical industry, *Energy Environ. Sci.* 16 (2023) 2879–2909. <https://doi.org/10.1039/d3ee00478c>.
- [7] The Royal Society, Sustainable biofuels: prospects and challenges, *Sustain. Biofuels.* (2008) 1–79. [http://royalsociety.org/uploadedFiles/Royal\\_Society\\_Content/policy/publications/2008/7980.pdf](http://royalsociety.org/uploadedFiles/Royal_Society_Content/policy/publications/2008/7980.pdf).
- [8] M. Hingsamer, G. Jungmeier, *Biorefineries*, Elsevier Inc., 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813056-8.00005-4>.
- [9] B. Annavelink, L.G. Chaves, R. van Ree, I.V. Gursel, IEA Bioenergy Task 42 Biorefining in a circular economy: Global biorefinery status report 2022, 2022.
- [10] U.A.M. Carnegie, *Biorefineries: adding value to the sustainable utilisation of biomass*, 1983. [https://doi.org/10.1007/978-1-349-06888-3\\_42](https://doi.org/10.1007/978-1-349-06888-3_42).
- [11] M.S. Celiktas, F.M. Alptekin, Biorefinery concept : Current status and future prospects, *Int. Conf. Eng. Technol.* 7–9 (2019) 27–32.
- [12] R. Platt, A. Bauen, P. Reuerman, C. Geier, R. Van Ree, I.V. Gursel, L. Garcia, M. Behrens, P. von Bothmer, J. Howes, Y. Panchaksharam, K. Vikla, V. Sartorius, B. Annevelink, *EU Biorefinery Outlook to 2030*, 2021. <https://doi.org/10.2777/103465>.
- [13] S. Fernando, S. Adhikari, C. Chandrapal, N. Murali, Biorefineries: Current status, challenges, and future direction, *Energy and Fuels.* 20 (2006) 1727–1737. <https://doi.org/10.1021/ef060097w>.
- [14] N. Scarlat, J.F. Dallemand, F. Monforti-Ferrario, V. Nita, The role of biomass and bioenergy in a future bioeconomy: Policies and facts, *Environ. Dev.* 15 (2015) 3–34. <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2015.03.006>.
- [15] S.K. Bardhan, S. Gupta, M.E. Gorman, M.A. Haider, Biorenewable chemicals: Feedstocks, technologies and the conflict with food production, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 51 (2015) 506–520. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.013>.
- [16] S. Srinivasan, The food v. fuel debate: A nuanced view of incentive structures, *Renew. Energy.* 34 (2009) 950–954. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.08.015>.
- [17] A.K. Chandel, V.K. Garlapati, S.P. Jeevan Kumar, M. Hans, A.K. Singh, S. Kumar, The role of renewable chemicals and biofuels in building a bioeconomy, *Biofuels, Bioprod. Biorefining.* 14 (2020) 830–844. <https://doi.org/10.1002/bbb.2104>.

- [18] A. Arevalo-Gallegos, Z. Ahmad, M. Asgher, R. Parra-Saldivar, H.M.N. Iqbal, Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach—A review, *Int. J. Biol. Macromol.* 99 (2017) 308–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.097>.
- [19] S.G. Rudra, J. Nishad, N. Jakhar, C. Kaur, Food Industry Waste: Mine of Nutraceuticals, *Int. J. Sci. Environment Technol.* 4 (2015) 205–229.
- [20] J. Cai, Y. He, X. Yu, S.W. Banks, Y. Yang, X. Zhang, Y. Yu, R. Liu, A. V. Bridgwater, Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 76 (2017) 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.072>.
- [21] F. Xu, Y.C. Shi, D. Wang, Enhanced production of glucose and xylose with partial dissolution of corn stover in ionic liquid, 1-Ethyl-3-methylimidazolium acetate, *Bioresour. Technol.* 114 (2012) 720–724. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.023>.
- [22] M. Nishida, Y. Uraki, Y. Sano, Lignin gel with unique swelling property, *Bioresour. Technol.* 88 (2003) 81–83. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00264-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00264-X).
- [23] N.E. El Mansouri, Q. Yuan, F. Huang, Characterization of alkaline lignins for use in phenol-formaldehyde and epoxy resins, *BioResources.* 6 (2011) 2647–2662. <https://doi.org/10.15376/biores.6.3.2647-2662>.
- [24] R.S. Abolore, S. Jaiswal, A.K. Jaiswal, Green and sustainable pretreatment methods for cellulose extraction from lignocellulosic biomass and its applications: A review, *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* 7 (2024) 100396. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100396>.
- [25] A. Herguedas, C. Taranco, E. Rodríguez, prado Paniagua, Biomasa, Biocombustibles Y Sostenibilidad, *Transbioma.* 13 (2012) 105–109.
- [26] N. Dahmen, I. Lewandowski, S. Zibek, A. Weidtmann, Integrated lignocellulosic value chains in a growing bioeconomy: Status quo and perspectives, *GCB Bioenergy.* 11 (2019) 107–117. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12586>.
- [27] J. Rajesh Banu, Preethi, S. Kavitha, V.K. Tyagi, M. Gunasekaran, O.P. Karthikeyan, G. Kumar, Lignocellulosic biomass based biorefinery: A successful platform towards circular bioeconomy, *Fuel.* 302 (2021) 121086. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121086>.
- [28] F. Xu, Y. Li, X. Ge, L. Yang, Y. Li, Anaerobic digestion of food waste – Challenges and opportunities, *Bioresour. Technol.* 247 (2018) 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.020>.
- [29] J.J. Senit, D. Velasco, A. Gomez Manrique, M. Sanchez-Barba, J.M. Toledo, V.E. Santos, F. Garcia-Ochoa, P. Yustos, M. Ladero, Orange peel waste upstream integrated processing to terpenes, phenolics, pectin and monosaccharides: Optimization approaches, *Ind. Crops Prod.* 134 (2019) 370–381. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.060>.
- [30] S.K. Bhatia, H.S. Joo, Y.H. Yang, Biowaste-to-bioenergy using biological methods – A mini-review, *Energy Convers. Manag.* 177 (2018) 640–660. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.09.090>.
- [31] A. Mohsin, M.H. Hussain, W.Q. Zaman, M.Z. Mohsin, J. Zhang, Z. Liu, X. Tian, X. Salim-ur-Rehman, I.M. Khan, S. Niazi, Y. Zhuang, M. Guo, Advances in sustainable approaches utilizing orange peel waste to produce highly value-added bioproducts, *Crit. Rev. Biotechnol.* 0 (2021) 1–20. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.2002805>.
- [32] E. de J. Francesco Cherubini, Gerfried Jungmeier, Maria Wellisch, Thomas Willke, Ioannis Skiadas, René Van Ree, Toward a common classification approach for biorefinery systems, *Biofuels, Bioprod. Biorefining.* 6 (2009) 534–546. <https://doi.org/10.1002/bbb>.

- [33] S. Takkellapati, T. Li, M.A. Gonzalez, An overview of biorefinery-derived platform chemicals from a cellulose and hemicellulose biorefinery, *Clean Technol. Environ. Policy*. 20 (2018) 1615–1630. <https://doi.org/10.1007/s10098-018-1568-5>.
- [34] J. Clark, F. Deswarte, The Biorefinery Concept: An Integrated Approach, *Introd. to Chem. from Biomass* Second Ed. 9781118714 (2015) 1–29. <https://doi.org/10.1002/9781118714478.ch1>.
- [35] E. Martinez-Hernandez, X. Cui, C.D. Scown, M.A. Amezcua-Allieri, J. Aburto, B.A. Simmons, Techno-economic and greenhouse gas analyses of lignin valorization to eugenol and phenolic products in integrated ethanol biorefineries, *Biofuels, Bioprod. Biorefining*. 13 (2019) 978–993. <https://doi.org/10.1002/bbb.1989>.
- [36] L.E.L.B. La energía de la biomasa, Fernández Baca, M. (1994). La energía de la biomasa. *Ingeniería Industrial*, (012), 21-29. <https://doi.org/10.26439/ing.ind1994.n012.2791>, (n.d.).
- [37] V. Kumar, S.K. Yadav, J. Kumar, V. Ahluwalia, A critical review on current strategies and trends employed for removal of inhibitors and toxic materials generated during biomass pretreatment, *Bioresour. Technol.* 299 (2020) 122633. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122633>.
- [38] E. Ximenes, Y. Kim, N. Mosier, B. Dien, M. Ladisch, Deactivation of cellulases by phenols, *Enzyme Microb. Technol.* 48 (2011) 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.09.006>.
- [39] L. Qin, W.C. Li, L. Liu, J.Q. Zhu, X. Li, B.Z. Li, Y.J. Yuan, Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase, *Biotechnol. Biofuels*. 9 (2016) 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0485-2>.
- [40] B. Sukhbaatar, Q. Li, C. Wan, F. Yu, E.B. Hassan, P. Steele, Inhibitors removal from bio-oil aqueous fraction for increased ethanol production, *Bioresour. Technol.* 161 (2014) 379–384. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.051>.
- [41] N.M. Bennett, S.S. Helle, S.J.B. Duff, Extraction and hydrolysis of levoglucosan from pyrolysis oil, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 6059–6063. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.067>.
- [42] J. Lian, S. Chen, S. Zhou, Z. Wang, J. O’Fallon, C.Z. Li, M. Garcia-Perez, Separation, hydrolysis and fermentation of pyrolytic sugars to produce ethanol and lipids, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 9688–9699. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.071>.
- [43] M.R. Rover, A. Aui, M.M. Wright, R.G. Smith, R.C. Brown, Production and purification of crystallized levoglucosan from pyrolysis of lignocellulosic biomass, *Green Chem.* 21 (2019) 5980–5989. <https://doi.org/10.1039/c9gc02461a>.
- [44] L. Luque, R. Westerhof, G. Van Rossum, S. Oudenhoven, S. Kersten, F. Berruti, L. Rehmman, Pyrolysis based bio-refinery for the production of bioethanol from demineralized lignocellulosic biomass, *Bioresour. Technol.* 161 (2014) 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.009>.
- [45] J.P. Stanford, P.H. Hall, M.R. Rover, R.G. Smith, R.C. Brown, Separation of sugars and phenolics from the heavy fraction of bio-oil using polymeric resin adsorbents, *Sep. Purif. Technol.* 194 (2018) 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.11.040>.
- [46] S. Wang, Y. Wang, Q. Cai, X. Wang, H. Jin, Z. Luo, Multi-step separation of monophenols and pyrolytic lignins from the water-insoluble phase of bio-oil, *Sep. Purif. Technol.* 122 (2014) 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.11.017>.
- [47] E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition, *Bioresour. Technol.* 74 (2000) 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3).

- [48] V. Kumar, S.K. Yadav, J. Kumar, V. Ahluwalia, A critical review on current strategies and trends employed for removal of inhibitors and toxic materials generated during biomass pretreatment, *Bioresour. Technol.* 299 (2020) 122633. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122633>.
- [49] S. Kumar, V. Ahluwalia, P. Kundu, R.S. Sangwan, S.K. Kansal, T.M. Runge, S. Elumalai, Improved levulinic acid production from agri-residue biomass in biphasic solvent system through synergistic catalytic effect of acid and products, *Bioresour. Technol.* 251 (2018) 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.033>.
- [50] Q. Wang, D. Tian, J. Hu, F. Shen, G. Yang, Y. Zhang, S. Deng, J. Zhang, Y. Zeng, Y. Hu, Fates of hemicellulose, lignin and cellulose in concentrated phosphoric acid with hydrogen peroxide (PHP) pretreatment, *RSC Adv.* 8 (2018) 12714–12723. <https://doi.org/10.1039/c8ra00764k>.
- [51] A.M. Abdel-Hamid, J.O. Solbiati, I.K.O. Cann, *Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications*, Elsevier, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00001-6>.
- [52] M. Cantarella, L. Cantarella, A.S. Alberto Gallifuoco, F. Alfani, Effect of Inhibitors Released during Steam-Explosion Treatment of Poplar Wood on Subsequent Enzymatic Hydrolysis and SSF, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 200–206. <https://doi.org/10.1021/bp0257978>.
- [53] T.C. Hsu, G.L. Guo, W.H. Chen, W.S. Hwang, Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 4907–4913. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.009>.
- [54] M.K. Malav, S.P. Sushil Kumar Kharia, S.K. K.R. Sheetal, S. Kannojiya, Furfural and 5-HMF: Potent fermentation inhibitors and their removal techniques, *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 6 (2017) 2060–2066. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.603.235>.
- [55] H. Luo, P. Zheng, M. Bilal, F. Xie, Q. Zeng, C. Zhu, R. Yang, Z. Wang, Efficient bio-butanol production from lignocellulosic waste by elucidating the mechanisms of *Clostridium acetobutylicum* response to phenolic inhibitors, *Sci. Total Environ.* 710 (2020) 136399. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136399>.
- [56] X. Chen, R. Zhai, Y. Li, X. Yuan, Z.H. Liu, M. Jin, Understanding the structural characteristics of water-soluble phenolic compounds from four pretreatments of corn stover and their inhibitory effects on enzymatic hydrolysis and fermentation, *Biotechnol. Biofuels.* 13 (2020) 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01686-z>.
- [57] H.B. Klinke, A.B. Thomsen, B.K. Ahring, Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66 (2004) 10–26. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1642-2>.
- [58] S.J. Lee, J.H. Lee, X. Yang, S.B. Kim, J.H. Lee, H.Y. Yoo, C. Park, S.W. Kim, Phenolic compounds: Strong inhibitors derived from lignocellulosic hydrolysate for 2,3-butanediol production by *Enterobacter aerogenes*, *Biotechnol. J.* 10 (2015) 1920–1928. <https://doi.org/10.1002/biot.201500090>.
- [59] J. Lian, M. Garcia-Perez, R. Coates, H. Wu, S. Chen, Yeast fermentation of carboxylic acids obtained from pyrolytic aqueous phases for lipid production, *Bioresour. Technol.* 118 (2012) 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.010>.
- [60] N.O. Nilvebrant, A. Reimann, S. Larsson, L.J. Jönsson, Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resins, *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol.* 91–93 (2001) 35–49. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:35>.
- [61] J.E. Lee, Y.N. Guragain, K.P. Bastola, P. V. Vadlani, Innovative methods to generate clean sugar stream from biomass feedstocks for efficient fermentation, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 40 (2017) 633–641. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1727-1>.

- [62] V. Ahuja, S. Kshirsagar, P. Ghosh, B. Sarkar, A. Sutar, S. More, D. Dasgupta, Process development for detoxification of corncob hydrolysate using activated charcoal for xylitol production, *J. Environ. Chem. Eng.* 10 (2022) 107097. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.107097>.
- [63] J.M. Romero-García, C. Fehér, C. Cara, E. Ruiz-Ramos, E. Castro, Improved xylitol production from olive stones hydrolysates by biological detoxification, *J. Clean. Prod.* 336 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.130408>.
- [64] H. Wang, D. Livingston, R. Srinivasan, Q. Li, P. Steele, F. Yu, Detoxification and fermentation of pyrolytic sugar for ethanol production, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168 (2012) 1568–1583. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9879-1>.
- [65] L. Fele Žilnik, A. Jazbinšek, Recovery of renewable phenolic fraction from pyrolysis oil, *Sep. Purif. Technol.* 86 (2012) 157–170. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.10.040>.
- [66] D.S. Fardhyanti, N.A.C. Imani, A. Damayanti, S.N. Mardhotillah, M. Afifudin, A. Mulyaningtyas, A.E. Akhir, W. Nuramalia, P. Maulana, The separation of phenolic compounds from bio-oil produced from pyrolysis of corncobs, *AIP Conf. Proc.* 2243 (2020). <https://doi.org/10.1063/5.0001078>.
- [67] C.D. Stalikas, Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 3268–3295. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>.
- [68] Y. Fan, Y. Li, X. Dong, G. Hu, S. Hua, J. Miao, D. Zhou, Extraction of phenols from water with functionalized ionic liquids, *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014) 20024–20031. <https://doi.org/10.1021/ie503432n>.
- [69] Y. Chen, Y. Meng, J. Yang, H. Li, X. Liu, Phenol distribution behavior in aqueous biphasic systems composed of ionic liquids-carbohydrate-water, *J. Chem. Eng. Data.* 57 (2012) 1910–1914. <https://doi.org/10.1021/je201290q>.
- [70] A. Brinda Lakshmi, A. Balasubramanian, S. Venkatesan, Extraction of phenol and chlorophenols using ionic liquid [Bmim]+[BF4]- dissolved in tributyl phosphate, *Clean - Soil, Air, Water.* 41 (2013) 349–355. <https://doi.org/10.1002/clen.201100632>.
- [71] X. Li, L.C. Luque-Moreno, S.R.G. Oudenhoven, L. Rehmann, S.R.A. Kersten, B. Schuur, Aromatics extraction from pyrolytic sugars using ionic liquid to enhance sugar fermentability, *Bioresour. Technol.* 216 (2016) 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.035>.
- [72] O.G.L. extraction of phenolic compounds from water using ionic liquids: L. review and new experimental data using [C2mim]FSI Sas, I. Domínguez, B. González, Á. Domínguez, Liquid-liquid extraction of phenolic compounds from water using ionic liquids: Literature review and new experimental data using [C2mim]FSI, *J. Environ. Manage.* 228 (2018) 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.042>.
- [73] Citrus fruit Fresh and processed Statistical bulletin 2020, 2020. <https://doi.org/10.5860/choice.36-2167>.
- [74] M. González-Miquel, I. Díaz, Valorization of citrus waste through sustainable extraction processes, *Food Ind. Wastes.* (2020) 113–133. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817121-9.00006-1>.
- [75] D. Panwar, P.S. Panesar, H.K. Chopra, Recent Trends on the Valorization Strategies for the Management of Citrus By-products, *Food Rev. Int.* 37 (2021) 91–120. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1695834>.
- [76] C.S.K. Lin, L.A. Pfaltzgraff, L. Herrero-Davila, E.B. Mubofu, S. Abderrahim, J.H. Clark, A.A. Koutinas, N. Kopsahelis, K. Stamatelatos, F. Dickson, S. Thankappan, Z. Mohamed, R. Brocklesby, R. Luque, Food waste as a valuable resource for the production of chemicals,

- materials and fuels. Current situation and global perspective, *Energy Environ. Sci.* 6 (2013) 426–464. <https://doi.org/10.1039/c2ee23440h>.
- [77] N. Mahato, M. Sinha, K. Sharma, R. Koteswararao, M.H. Cho, Modern extraction and purification techniques for obtaining high purity food-grade bioactive compounds and value-added co-products from citrus wastes, 2019. <https://doi.org/10.3390/foods8110523>.
- [78] D.A. Zema, P.S. Calabrò, A. Folino, V. Tamburino, G. Zappia, S.M. Zimbone, Valorisation of citrus processing waste: A review, *Waste Manag.* 80 (2018) 252–273. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.024>.
- [79] J. Lui, W.H. Chen, D.C.W. Tsang, S. You, A critical review on the principles, applications, and challenges of waste-to-hydrogen technologies, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 134 (2020) 110365. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110365>.
- [80] K. Warmiński, M.J. Stolarski, Ł. Gil, M. Krzyżaniak, Willow bark and wood as a source of bioactive compounds and bioenergy feedstock, *Ind. Crops Prod.* 171 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113976>.
- [81] H.M. Poggi-Varaldo, K.M. Munoz-Paez, C. Escamilla-Alvarado, P.N. Robledo-Narváez, M.T. Ponce-Noyola, G. Calva-Calva, E. Ríos-Leal, J. Galíndez-Mayer, C. Estrada-Vázquez, A. Ortega-Clemente, N.F. Rinderknecht-Seijas, Biohydrogen, biomethane and bioelectricity as crucial components of biorefinery of organic wastes: A review, *Waste Manag. Res.* 32 (2014) 353–365. <https://doi.org/10.1177/0734242X14529178>.
- [82] P.G. del Río, N. Flórez-Fernández, M. Álvarez-Viñas, M.D. Torres, A. Romani, H. Domínguez, G. Garrote, Evaluation of sustainable technologies for the processing of *Sargassum muticum*: cascade biorefinery schemes, *Green Chem.* 23 (2021) 7001–7015. <https://doi.org/10.1039/d1gc01900g>.
- [83] M. Panić, M. Andlar, M. Tišma, T. Rezić, D. Šibalić, M. Cvjetko Bubalo, I. Radojčić Redovniković, Natural deep eutectic solvent as a unique solvent for valorisation of orange peel waste by the integrated biorefinery approach, *Waste Manag.* 120 (2021) 340–350. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.11.052>.
- [84] M. Boukroufa, C. Boutekedjiret, L. Petigny, N. Rakotomanomana, F. Chemat, Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin, *Ultrason. Sonochem.* 24 (2015) 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.11.015>.
- [85] Y.C. Wang, Y.C. Chuang, H.W. Hsu, The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan, *Food Chem.* 106 (2008) 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.086>.
- [86] M.M. Özcan, K. Ghafoor, F. Al Juhaimi, N. Uslu, E.E. Babiker, I.A. Mohamed Ahmed, I.A. Almusallam, Influence of drying techniques on bioactive properties, phenolic compounds and fatty acid compositions of dried lemon and orange peel powders, *J. Food Sci. Technol.* 58 (2021) 147–158. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04524-0>.
- [87] N. M'hiri, I. Ioannou, N. Mihoubi Boudhrioua, M. Ghoul, Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel, *Food Bioprod. Process.* 96 (2015) 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.07.010>.
- [88] G. Gattuso, D. Barreca, C. Gargiulli, U. Leuzzi, C. Caristi, Flavonoid composition of citrus juices, *Molecules.* 12 (2007) 1641–1673. <https://doi.org/10.3390/12081641>.
- [89] K. Sharma, N. Mahato, Y.R. Lee, Extraction, characterization and biological activity of citrus flavonoids, *Rev. Chem. Eng.* 35 (2019) 265–284. <https://doi.org/10.1515/revce-2017-0027>.

- [90] D. Di Majo, M. Giammanco, M. La Guardia, E. Tripoli, S. Giammanco, E. Finotti, Flavanones in Citrus fruit: Structure-antioxidant activity relationships, *Food Res. Int.* 38 (2005) 1161–1166. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.05.001>.
- [91] C.M. Ajila, S.K. Brar, M. Verma, R.D. Tyagi, S. Godbout, J.R. Valéro, Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends, *Crit. Rev. Biotechnol.* 31 (2011) 227–249. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513677>.
- [92] O.S. Omoba, R.O. Obafaye, S.O. Salawu, A.A. Boligon, M.L. Athayde, HPLC-DAD phenolic characterization and antioxidant activities of ripe and unripe sweet orange peels, *Antioxidants*. 4 (2015) 498–512. <https://doi.org/10.3390/antiox4030498>.
- [93] P. Hegde, P. Agrawal, P.K. Gupta, Isolation and optimization of polyphenols from the peels of orange fruit, *J. Chem. Pharm. Sci.* 8 (2015) 463–468.
- [94] I.M. Kadhom, N.S. Ibrahim, N. Abdullah, Estimation Of Phenolic Compounds And Evaluation Of Their Antioxidant Activity Of Some Parts Of The Orange Plant ( *Citrus Sinensis L.* ), *Eur. J. Mol. Clin. Med.* 07 (2020) 4811–4822.
- [95] S.M.S. Sawalha, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE-MS/MS, *Food Chem.* 116 (2009) 567–574. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.003>.
- [96] J.A. Manthey, K. Grohmann, Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 811–814. <https://doi.org/10.1021/jf950572g>.
- [97] A. Garg, S. Garg, L.J.D. Zaneveld, A.K. Singla, Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin, *Phyther. Res.* 15 (2001) 655–669. <https://doi.org/10.1002/ptr.1074>.
- [98] K. Petrotos, I. Giavasis, K. Gerasopoulos, C. Mitsagga, C. Papaioannou, P. Gkoutisidis, Optimization of the vacuum microwave assisted extraction of the natural polyphenols and flavonoids from the raw solid waste of the pomegranate juice producing industry at industrial scale, *Molecules*. 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26041033>.
- [99] G.H. Xu, J.C. Chen, D.H. Liu, Y.H. Zhang, P. Jiang, X.Q. Ye, Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water, *J. Food Sci.* 73 (2008). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00546.x>.
- [100] P. Rodsamran, R. Sothornvit, Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions, *Food Biosci.* 28 (2019) 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.01.017>.
- [101] M. Saifullah, R. McCullum, Q. Van Vuong, Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from lemon myrtle: Comparison of modern and conventional extraction techniques based on bioactivity and total polyphenols in dry extracts, *Processes*. 9 (2021). <https://doi.org/10.3390/pr9122212>.
- [102] G. Sharmila, V.S. Nikitha, S. Ilaiyarasi, K. Dhivya, V. Rajasekar, N.M. Kumar, K. Muthukumaran, C. Muthukumaran, Ultrasound assisted extraction of total phenolics from *Cassia auriculata* leaves and evaluation of its antioxidant activities, *Ind. Crops Prod.* 84 (2016) 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.010>.
- [103] B.C. Jesus, B. Sáenz de Miera, R. Santiago, A. Martins, R. Pedrosa, M. González-Miquel, I.M. Marrucho, Valorisation of *Sargassum muticum* through the extraction of phenolic compounds using eutectic solvents and intensification techniques , *RSC Sustain.* (2023). <https://doi.org/10.1039/d3su00051f>.
- [104] A. Ncube, S. Mtetwa, M. Bukhari, G. Fiorentino, R. Passaro, Circular Economy and Green

- Chemistry: The Need for Radical Innovative Approaches in the Design for New Products, *Energies*. 16 (2023) 1–21. <https://doi.org/10.3390/en16041752>.
- [105] P. Anastas, N. Eghbali, Green chemistry: Principles and practice, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 301–312. <https://doi.org/10.1039/b918763b>.
- [106] A. Kurowska-Susdorf, M. Zwierzdzyński, A.M. Bevanda, S. Talić, A. Ivanković, J. Płotka-Wasyłka, Green analytical chemistry: Social dimension and teaching, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 111 (2019) 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.022>.
- [107] D.H. Adam, Ende, Y.N. Supriyadi, Z.M.E. Siregar, Green manufacturing, green chemistry and environmental sustainability: A review, *Int. J. Sci. Technol. Res.* 9 (2020) 2209–2211.
- [108] J.B. Zimmerman, P.T. Anastas, H.C. Erythropel, W. Leitner, Designing for a green chemistry future, *Science* (80-. ). 367 (2020) 397–400. <http://science.sciencemag.org/>.
- [109] F.G. Calvo-Flores, Green Processes in Foodomics. Green Solvents for Sustainable Processes, *Compr. Foodomics*. (2020) 690–709. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22813-8>.
- [110] F. Chemat, M.A. Vian, G. Cravotto, Green extraction of natural products: Concept and principles, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>.
- [111] T.L. Chen, H. Kim, S.Y. Pan, P.C. Tseng, Y.P. Lin, P.C. Chiang, Implementation of green chemistry principles in circular economy system towards sustainable development goals: Challenges and perspectives, *Sci. Total Environ.* 716 (2020) 136998. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136998>.
- [112] W. Mohammed, A. Errayes, Green Chemistry: Principles, Applications, and Disadvantages, *Chem. Methodol.* 4 (2020) 408–423. <https://doi.org/10.33945/sami/chemm.2020.4.4>.
- [113] L. Gomez, B. Tiwari, M. Garcia-Vaquero, Emerging extraction techniques: Microwave-assisted extraction, Elsevier Inc., 2020. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817943-7.00008-1>.
- [114] I.T. Horváth, E. Cséfalvay, L.T. Mika, M. Debreczeni, Sustainability Metrics for Biomass-Based Carbon Chemicals, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5 (2017) 2734–2740. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b03074>.
- [115] C.J. Clarke, W.C. Tu, O. Levers, A. Bröhl, J.P. Hallett, Green and Sustainable Solvents in Chemical Processes, *Chem. Rev.* 118 (2018) 747–800. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00571>.
- [116] J. Cao, E. Su, Hydrophobic deep eutectic solvents: the new generation of green solvents for diversified and colorful applications in green chemistry, *J. Clean. Prod.* 314 (2021) 127965. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127965>.
- [117] E.L. Smith, A.P. Abbott, K.S. Ryder, Deep Eutectic Solvents (DESSs) and Their Applications, *Chem. Rev.* 114 (2014) 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>.
- [118] D.J.G.P. Van Osch, C.H.J.T. Dietz, J. Van Spronsen, M.C. Kroon, F. Gallucci, M. Van Sint Annaland, R. Tuinier, A Search for Natural Hydrophobic Deep Eutectic Solvents Based on Natural Components, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7 (2019) 2933–2942. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b03520>.
- [119] Á. Santana-Mayor, R. Rodríguez-Ramos, A. V. Herrera-Herrera, B. Socas-Rodríguez, M.Á. Rodríguez-Delgado, Deep eutectic solvents. The new generation of green solvents in analytical chemistry, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 134 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116108>.
- [120] M. Francisco, A. Van Den Bruinhorst, M.C. Kroon, Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 52 (2013) 3074–3085. <https://doi.org/10.1002/anie.201207548>.

- [121] Y.P. Mbous, M. Hayyan, A. Hayyan, W.F. Wong, M.A. Hashim, C.Y. Looi, Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges, *Biotechnol. Adv.* 35 (2017) 105–134. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.006>.
- [122] D.J.G.P. Van Osch, L.J.B.M. Kollau, A. Van Den Bruinhorst, S. Asikainen, M.A.A. Rocha, M.C. Kroon, Ionic liquids and deep eutectic solvents for lignocellulosic biomass fractionation, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19 (2017) 2636–2665. <https://doi.org/10.1039/c6cp07499e>.
- [123] C. Florindo, L.C. Branco, I.M. Marrucho, Quest for Green-Solvent Design: From Hydrophilic to Hydrophobic (Deep) Eutectic Solvents, *ChemSusChem.* 12 (2019) 1549–1559. <https://doi.org/10.1002/cssc.201900147>.
- [124] T. Jiao, X. Qin, H. Zhang, W. Zhang, Y. Zhang, P. Liang, Separation of phenol and pyridine from coal tar via liquid–liquid extraction using deep eutectic solvents, *Chem. Eng. Res. Des.* 145 (2019) 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.03.006>.
- [125] Z. Maugeri, W. Leitner, P. Domínguez De María, Practical separation of alcohol-ester mixtures using Deep-Eutectic-Solvents, *Tetrahedron Lett.* 53 (2012) 6968–6971. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.10.044>.
- [126] A.K. Dwamena, Recent advances in hydrophobic deep eutectic solvents for extraction, *Separations.* 6 (2019). <https://doi.org/10.3390/separations6010009>.
- [127] A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, V. Tambyrajah, Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures, *Chem. Commun.* (2003) 70–71. <https://doi.org/10.1039/b210714g>.
- [128] Y.H. Choi, J. van Spronsen, Y. Dai, M. Verberne, F. Hollmann, I.W.C.E. Arends, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?, *Plant Physiol.* 156 (2011) 1701–1705. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>.
- [129] M. González-Miquel, I. Díaz, Green solvent screening using modeling and simulation, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 29 (2021) 100469. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100469>.
- [130] M. Ruesgas-Ramón, M.C. Figueroa-Espinoza, E. Durand, Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 3591–3601. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01054>.
- [131] L.S. Torres-Valenzuela, A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, Green Solvents for the Extraction of High Added-Value Compounds from Agri-food Waste, *Food Eng. Rev.* 12 (2020) 83–100. <https://doi.org/10.1007/s12393-019-09206-y>.
- [132] M. Razborsek, M. Ivanovic, P. Krajnc, M. Kolar, Choline Chloride Based Natural Deep Eutectic Solvents as Extraction Media for Extracting Phenolic, *Molecules.* 25 (2020) 1–14.
- [133] P.B. Sánchez, B. González, J. Salgado, J. José Parajó, Á. Domínguez, Physical properties of seven deep eutectic solvents based on L-proline or betaine, *J. Chem. Thermodyn.* 131 (2019) 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2018.12.017>.
- [134] K. Radošević, N. Ćurko, V. Gaurina Srček, M. Cvjetko Bubalo, M. Tomašević, K. Kovačević Ganić, I. Radojčić Redovniković, Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity, *Lwt.* 73 (2016) 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.037>.
- [135] A. Paiva, R. Craveiro, I. Aroso, M. Martins, R.L. Reis, A.R.C. Duarte, Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2 (2014) 1063–1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>.

- [136] P. Makoś, E. Słupek, J. Gębicki, Extractive detoxification of feedstocks for the production of biofuels using new hydrophobic deep eutectic solvents – Experimental and theoretical studies, *J. Mol. Liq.* 308 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113101>.
- [137] B.B. Hansen, S. Spittle, B. Chen, D. Poe, Y. Zhang, J.M. Klein, A. Horton, L. Adhikari, T. Zelovich, B.W. Doherty, B. Gurkan, E.J. Maginn, A. Ragauskas, M. Dadmun, T.A. Zawodzinski, G.A. Baker, M.E. Tuckerman, R.F. Savinell, J.R. Sangoro, Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications, *Chem. Rev.* (2021). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>.
- [138] Y.H. Choi, R. Verpoorte, Green solvents for the extraction of bioactive compounds from natural products using ionic liquids and deep eutectic solvents, *Curr. Opin. Food Sci.* 26 (2019) 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.04.003>.
- [139] M.H. Zainal-Abidin, M. Hayyan, A. Hayyan, N.S. Jayakumar, New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review, *Anal. Chim. Acta.* 979 (2017) 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.012>.
- [140] N. Dabetić, V. Todorović, M. Panić, I.R. Redovniković, S. Šobajić, Impact of deep eutectic solvents on extraction of polyphenols from grape seeds and skin, *Appl. Sci.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/app10144830>.
- [141] R. Cañadas, B.S. de de Miera, P. Méndez, E.J. González, M. González-Miquel, Enhanced Recovery of Natural Antioxidants from Grape Waste Using Natural Eutectic Solvents-Based Microwave-Assisted Extraction, *Molecules.* 28 (2023) 1153. <https://doi.org/10.3390/molecules28031153>.
- [142] M. Panić, V. Gunjević, G. Cravotto, I. Radojčić Redovniković, 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 Chem.* 300 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125185>.
- [143] S. El Kantar, H.N. Rajha, N. Boussetta, E. Vorobiev, R.G. Maroun, N. Louka, Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage electrical discharges, deep eutectic solvents and aqueous glycerol, *Food Chem.* 295 (2019) 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.111>.
- [144] T. Khezeli, A. Daneshfar, R. Sahraei, A green ultrasonic-assisted liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the HPLC-UV determination of ferulic, caffeic and cinnamic acid from olive, almond, sesame and cinnamon oil, *Talanta.* 150 (2016) 577–585. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.077>.
- [145] M.E. Alañón, M. Ivanović, A.M. Gómez-Caravaca, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, Choline chloride derivative-based deep eutectic liquids as novel green alternative solvents for extraction of phenolic compounds from olive leaf, *Arab. J. Chem.* 13 (2020) 1685–1701. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.01.003>.
- [146] A. García, E. Rodríguez-Juan, G. Rodríguez-Gutiérrez, J.J. Rios, J. Fernández-Bolaños, Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs), *Food Chem.* 197 (2016) 554–561. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.131>.
- [147] B. Ozturk, C. Parkinson, M. Gonzalez-Miquel, Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents, *Sep. Purif. Technol.* 206 (2018) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.05.052>.
- [148] M. Xu, L. Ran, N. Chen, X. Fan, D. Ren, L. Yi, Polarity-dependent extraction of flavonoids from citrus peel waste using a tailor-made deep eutectic solvent, *Food Chem.* 297 (2019) 124970. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124970>.

- [149] R. Rashid, S. Mohd Wani, S. Manzoor, F.A. Masoodi, M. Masarat Dar, Green extraction of bioactive compounds from apple pomace by ultrasound assisted natural deep eutectic solvent extraction: Optimisation, comparison and bioactivity, *Food Chem.* 398 (2022) 133871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133871>.
- [150] J. Chen, X. Jiang, G. Yang, Y. Bi, W. Liu, Green and Efficient Extraction of Resveratrol from Peanut Roots Using Deep Eutectic Solvents, *J. Chem.* 2018 (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/4091930>.
- [151] E. of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents Chiara, S. Della Posta, L. Dugo, A. Gentili, L. Mondello, L. De Gara, Choline-chloride and betaine-based deep eutectic solvents for green extraction of nutraceutical compounds from spent coffee ground, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 189 (2020) 113421. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113421>.
- [152] F. Mohd Fuad, M. Mohd Nadzir, The formulation and physicochemical properties of betaine-based natural deep eutectic solvent, *J. Mol. Liq.* 360 (2022) 119392. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119392>.
- [153] A. Ali Redha, Review on Extraction of Phenolic Compounds from Natural Sources Using Green Deep Eutectic Solvents, *J. Agric. Food Chem.* 69 (2021) 878–912. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06641>.
- [154] J. Zhao, Z. Meng, Z. Zhao, L. Zhao, Ultrasound-assisted deep eutectic solvent as green and efficient media combined with functionalized magnetic multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction to determine pesticide residues in food products, *Food Chem.* 310 (2020) 125863. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125863>.
- [155] M.W. Nam, J. Zhao, M.S. Lee, J.H. Jeong, J. Lee, Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: Application to flavonoid extraction from *Flos sophorae*, *Green Chem.* 17 (2015) 1718–1727. <https://doi.org/10.1039/c4gc01556h>.
- [156] J. Lee, D. Jung, K. Park, Hydrophobic deep eutectic solvents for the extraction of organic and inorganic analytes from aqueous environments, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 118 (2019) 853–868. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.07.008>.
- [157] D.J.G.P. Van Osch, C.H.J.T. Dietz, S.E.E. Warrag, M.C. Kroon, The Curious Case of Hydrophobic Deep Eutectic Solvents: A Story on the Discovery, Design, and Applications, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 8 (2020) 10591–10612. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c00559>.
- [158] R. Cañadas, M. González-Miquel, E.J. González, I. Díaz, M. Rodríguez, Hydrophobic eutectic solvents for extraction of natural phenolic antioxidants from winery wastewater, *Sep. Purif. Technol.* 254 (2021) 117590. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117590>.
- [159] D.J.G.P. Van Osch, L.F. Zubeir, A. Van Den Bruinhorst, M.A.A. Rocha, M.C. Kroon, Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants, *Green Chem.* 17 (2015) 4518–4521. <https://doi.org/10.1039/c5gc01451d>.
- [160] P. Makoś, E. Słupek, J. Gębicki, Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques—A review, *Microchem. J.* 152 (2020) 104384. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104384>.
- [161] P. López-Porfiri, P. Gorgojo, M. Gonzalez-Miquel, Green Solvent Selection Guide for Biobased Organic Acid Recovery, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 8 (2020) 8958–8969. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c01456>.
- [162] E.J. González, M. González-Miquel, I. Díaz, M. Rodríguez, C. Fontela, R. Cañadas, J. Sánchez, Enhancing aqueous systems fermentability using hydrophobic eutectic solvents as extractants

- of inhibitory compounds, *Sep. Purif. Technol.* 250 (2020) 117184. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117184>.
- [163] R. Cañadas, M. González-Miquel, E.J. González, A. Núñez De Prado, I. Díaz, M. Rodríguez, Sustainable Recovery of High Added-Value Vanilla Compounds from Wastewater Using Green Solvents, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 9 (2021) 4850–4862. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c00168>.
- [164] B.D. Ribeiro, C. Florindo, L.C. Iff, M.A.Z. Coelho, I.M. Marrucho, Menthol-based eutectic mixtures: Hydrophobic low viscosity solvents, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 3 (2015) 2469–2477. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00532>.
- [165] O.G. Sas, M. Castro, Á. Domínguez, B. González, Removing phenolic pollutants using Deep Eutectic Solvents, *Sep. Purif. Technol.* 227 (2019) 115703. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.115703>.
- [166] D.S. Naidu, S.P. Hlangothi, M.J. John, Bio-based products from xylan: A review, *Carbohydr. Polym.* 179 (2018) 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.064>.
- [167] Y. Gu, F. Jérôme, Bio-based solvents: An emerging generation of fluids for the design of eco-efficient processes in catalysis and organic chemistry, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 9550–9570. <https://doi.org/10.1039/c3cs60241a>.
- [168] F.G. Calvo-Flores, M.J. Monteagudo-Arrebola, J.A. Dobado, J. Isac-García, Green and Bio-Based Solvents, *Top. Curr. Chem.* 376 (2018) 1–40. <https://doi.org/10.1007/s41061-018-0191-6>.
- [169] S. Ahmad, M.S. Nazir, Z. Ali, M.N. Akhtar, H.A. Hussein, M.A. Abdullah, Plant-derived alkyl phenol as green solvents: Properties and applications, Elsevier Inc., 2021. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821886-0.00011-7>.
- [170] Z. Li, K.H. Smith, G.W. Stevens, The use of environmentally sustainable bio-derived solvents in solvent extraction applications - A review, *Chinese J. Chem. Eng.* 24 (2016) 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2015.07.021>.
- [171] M.J. Hernáiz, A.R. Alcántara, J.I. García, J. V. Sinisterra, Applied biotransformations in green solvents, *Chem. - A Eur. J.* 16 (2010) 9422–9437. <https://doi.org/10.1002/chem.201000798>.
- [172] J. Vovers, K.H. Smith, G.W. Stevens, Bio-Based Molecular Solvents, Elsevier Inc., 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805297-6.00004-8>.
- [173] H.H. Khoo, W.L. Ee, V. Isoni, Bio-chemicals from lignocellulose feedstock: Sustainability, LCA and the green conundrum, *Green Chem.* 18 (2016) 1912–1922. <https://doi.org/10.1039/c5gc02065d>.
- [174] A.B. Dros, O. Larue, A. Reimond, F. De Campo, M. Pera-Titus, Hexamethylenediamine (HMDA) from fossil- vs. bio-based routes: an economic and life cycle assessment comparative study, *Green Chem.* 17 (2015) 4760–4772. <https://doi.org/10.1039/c5gc01549a>.
- [175] I.T. Horváth, Solvents from nature, *Green Chem.* 10 (2008) 1024–1028. <https://doi.org/10.1039/b812804a>.
- [176] R. Cañadas, M. González-Miquel, E.J. González, I. Díaz, M. Rodríguez, Evaluation of bio-based solvents for phenolic acids extraction from aqueous matrices, *J. Mol. Liq.* 338 (2021) 116930. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116930>.
- [177] C.P. Jiménez-Gómez, C. García-Sancho, J.A. Cecilia, P. Maireles-Torres, 2-MeTHF, *Green Sustain. Process Chem. Environ. Eng. Sci.* (2021) 75–98. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821886-0.00007-5>.
- [178] V. Pace, P. Hoyos, L. Castoldi, P. Domínguez De María, A.R. Alcántara, 2-Methyltetrahydrofuran

- (2-MeTHF): A biomass-derived solvent with broad application in organic chemistry, *ChemSusChem*. 5 (2012) 1369–1379. <https://doi.org/10.1002/cssc.201100780>.
- [179] F.N. Türk, S. Çehreli, N. Baylan, Reactive Extraction of Monocarboxylic Acids (Formic, Acetic, and Propionic) Using Tributyl Phosphate in Green Solvents (Cyclopentyl Methyl Ether and 2-Methyltetrahydrofuran), *J. Chem. Eng. Data*. 66 (2021) 130–137. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.0c00486>.
- [180] A.-G. Sicaire, M.A. Vian, A. Filly, Y. Li, A. Bily, F. Chemat, 2-Methyltetrahydrofuran: Main Properties, Production Processes, and Application in Extraction of Natural Products, (2014) 253–268. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-43628-8\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-662-43628-8_12).
- [181] R. Smets, P. Goos, J. Claes, M. Van Der Borgh, Optimisation of the lipid extraction of fresh black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) with 2-methyltetrahydrofuran by response surface methodology, *Sep. Purif. Technol.* 258 (2021) 118040. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118040>.
- [182] W.M.A. Wan Mahmood, C. Theodoropoulos, M. Gonzalez-Miquel, Enhanced microalgal lipid extraction using bio-based solvents for sustainable biofuel production, *Green Chem.* 19 (2017) 5723–5733. <https://doi.org/10.1039/c7gc02735d>.
- [183] A.T. Laitinen, K.J.T. Penttilä, J.M. Kaunisto, Physical solvent extraction of levulinic acid from dilute aqueous solution with 2-methyltetrahydrofuran, *Sep. Sci. Technol.* 51 (2016) 465–473. <https://doi.org/10.1080/01496395.2015.1105264>.
- [184] K. Watanabe, N. Yamagiwa, Y. Torisawa, Cyclopentyl methyl ether as a new and alternative process solvent, *Org. Process Res. Dev.* 11 (2007) 251–258. <https://doi.org/10.1021/op0680136>.
- [185] K. Watanabe, The toxicological assessment of cyclopentyl methyl ether (CPME) as a green solvent, *Molecules*. 18 (2013) 3183–3194. <https://doi.org/10.3390/molecules18033183>.
- [186] G. de Gonzalo, A.R. Alcántara, P. Domínguez de María, Cyclopentyl Methyl Ether (CPME): A Versatile Eco-Friendly Solvent for Applications in Biotechnology and Biorefineries, *ChemSusChem*. 12 (2019) 2083–2097. <https://doi.org/10.1002/cssc.201900079>.
- [187] S.S. de Jesus, G.F. Ferreira, M.R. Wolf Maciel, R. Maciel Filho, Biodiesel purification by column chromatography and liquid-liquid extraction using green solvents, *Fuel*. 235 (2019) 1123–1130. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.08.107>.
- [188] B. Ozturk, J. Winterburn, M. Gonzalez-Miquel, Orange peel waste valorisation through limonene extraction using bio-based solvents, *Biochem. Eng. J.* 151 (2019) 107298. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107298>.
- [189] F.C. S. Chemat, V. Tomao, Limonene as Green Solvent for extraction of natural products, *Green Solvents I Prop. Appl. Chem.* (2012) 1–427. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1712-1>.
- [190] F. Chemat, M.A. Vian, H.K. Ravi, B. Khadhraoui, S. Hilali, S. Perino, A.S.F. Tixier, Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects, *Molecules*. 24 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24163007>.
- [191] M.T. Golmakani, J.A. Mendiola, K. Rezaei, E. Ibáñez, Pressurized limonene as an alternative bio-solvent for the extraction of lipids from marine microorganisms, *J. Supercrit. Fluids*. 92 (2014) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.05.001>.
- [192] M. Virot, V. Tomao, C. Ginies, F. Visinoni, F. Chemat, Green procedure with a green solvent for fats and oils' determination. Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation, *J. Chromatogr. A*. 1196–1197 (2008) 147–152.

- <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.035>.
- [193] Z. Chemat-Djenni, M.A. Ferhat, V. Tomao, F. Chemat, Carotenoid extraction from tomato using a green solvent resulting from orange processing waste, *J. Essent. Oil-Bearing Plants*. 13 (2010) 139–147. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643803>.
- [194] A. V. Dolzhenko, Ethyl lactate, Elsevier Inc., 2021. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821886-0.00013-0>.
- [195] C.S.M. Pereira, V.M.T.M. Silva, A.E. Rodrigues, Ethyl lactate as a solvent: Properties, applications and production processes – a review, *Green Chem.* 13 (2011) 2658–2671. <https://doi.org/10.1039/c1gc15523g>.
- [196] Y.L. Kua, S. Gan, A. Morris, H.K. Ng, Ethyl lactate as a potential green solvent to extract hydrophilic (polar) and lipophilic (non-polar) phytonutrients simultaneously from fruit and vegetable by-products, *Sustain. Chem. Pharm.* 4 (2016) 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2016.07.003>.
- [197] A. Castillo, M. Celeiro, L. Rubio, A. Bañobre, M. Otero-Otero, C. Garcia-Jares, M. Lores, Optimization of bioactives extraction from grape marc via a medium scale ambient temperature system and stability study, *Front. Nutr.* 9 (2022) 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1008457>.
- [198] F. Aricò, P. Tundo, Isosorbide and dimethyl carbonate: A green match, *Beilstein J. Org. Chem.* 12 (2016) 2256–2266. <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.218>.
- [199] P. Tundo, F. Aricò, G. Gauthier, L. Rossi, A.E. Rosamilia, H.S. Bevinakatti, R.L. Sievert, C.P. Newman, Green synthesis of dimethyl isosorbide, *ChemSusChem*. 3 (2010) 566–570. <https://doi.org/10.1002/cssc.201000011>.
- [200] F. Russo, F. Galiano, F. Pedace, F. Aricò, A. Figoli, Dimethyl Isosorbide As a Green Solvent for Sustainable Ultrafiltration and Microfiltration Membrane Preparation, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 8 (2020) 659–668. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06496>.
- [201] A. V. Dolzhenko, Cyrene, Elsevier Inc., 2021. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821886-0.00006-3>.
- [202] J. Sherwood, M. De bruyn, A. Constantinou, L. Moity, C.R. McElroy, T.J. Farmer, T. Duncan, W. Raverty, A.J. Hunt, J.H. Clark, Dihydrolevoglucosenone (Cyrene) as a bio-based alternative for dipolar aprotic solvents, *Chem. Commun.* 50 (2014) 9650–9652. <https://doi.org/10.1039/c4cc04133j>.
- [203] S.G. Wettstein, D.M. Alonso, Y. Chong, J.A. Dumesic, Production of levulinic acid and gamma-valerolactone (GVL) from cellulose using GVL as a solvent in biphasic systems, *Energy Environ. Sci.* 5 (2012) 8199–8203. <https://doi.org/10.1039/c2ee22111j>.
- [204] X.R. Shen, D.Z. Xia, Y.X. Xiang, J.G. Gao,  $\gamma$ -valerolactone (GVL) as a bio-based green solvent and ligand for iron-mediated AGET ATRP, *E-Polymers*. 19 (2019) 323–329. <https://doi.org/10.1515/epoly-2019-0033>.
- [205] F. Kerker, M. Markiewicz, S. Stolte, E. Müller, W. Kunz, The green platform molecule gamma-valerolactone - ecotoxicity, biodegradability, solvent properties, and potential applications, *Green Chem.* 23 (2021) 2962–2976. <https://doi.org/10.1039/d0gc04353b>.
- [206] F. Gao, R. Bai, F. Ferlin, L. Vaccaro, M. Li, Y. Gu, Replacement strategies for non-green dipolar aprotic solvents, *Green Chem.* 22 (2020) 6240–6257. <https://doi.org/10.1039/d0gc02149k>.
- [207] D. Dalla Torre, M. Annatelli, F. Aricò, Acid catalyzed synthesis of dimethyl isosorbide via dimethyl carbonate chemistry, *Catal. Today.* (2022) 1–10.

- <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2022.08.034>.
- [208] S.S. Silva, M. Justi, J.B. Chagnoleau, N. Papaiconomou, X. Fernandez, S.A.O. Santos, H. Passos, A.M. Ferreira, J.A.P. Coutinho, Using biobased solvents for the extraction of phenolic compounds from kiwifruit industry waste, *Sep. Purif. Technol.* 304 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.122344>.
- [209] R. Cañadas, I. Díaz, A. Sánchez-Monedero, E.J. González, M. González-Miquel, Green extraction of natural antioxidants from white grape waste using bio-renewable solvents and ultrasonic process intensification, *Chem. Eng. Process. - Process Intensif.* 196 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.cep.2023.109644>.
- [210] A. Klamt, Conductor-like screening model for real solvents: A new approach to the quantitative calculation of solvation phenomena, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 2224–2235. <https://doi.org/10.1021/j100007a062>.
- [211] A. Klamt, V. Jonas, T. Bürger, J.C.W. Lohrenz, Refinement and parametrization of COSMO-RS, *J. Phys. Chem. A.* 102 (1998) 5074–5085. <https://doi.org/10.1021/jp980017s>.
- [212] S.T. Lin, S.I. Sandler, A priori phase equilibrium prediction from a segment contribution solvation model, *Ind. Eng. Chem. Res.* 41 (2002) 899–913. <https://doi.org/10.1021/ie001047w>.
- [213] J. Grensemann, Hans; Gmehling, Performance of a conductor-like screening model for real solvents model in comparison to classical group contribution methods, *Ind. Eng. Chem. Res.* 44 (2005) 7042. <https://doi.org/10.1021/ie050347g>.
- [214] A. Klamt, G. Schüürmann, COSMO: A new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* (1993) 799–805. <https://doi.org/10.1039/P29930000799>.
- [215] B. Ozturk, M. Gonzalez-Miquel, Alkanediol-based deep eutectic solvents for isolation of terpenoids from citrus essential oil: Experimental evaluation and COSMO-RS studies, *Sep. Purif. Technol.* 227 (2019) 115707. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.115707>.
- [216] E.J. González, I. Díaz, M. Gonzalez-Miquel, M. Rodríguez, A. Sueiras, On the behavior of imidazolium versus pyrrolidinium ionic liquids as extractants of phenolic compounds from water: Experimental and computational analysis, *Sep. Purif. Technol.* 201 (2018) 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.03.006>.
- [217] Z. Berk, Chapter 11. Extraction, in: *Food Process Eng. Technol.*, 2018: pp. 289–310. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812018-7.00011-7>.
- [218] Juliana Prado; Mauricio Rostagno, *Natural Product Extraction Principles and Applications*, 2022. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/9781839165894>.
- [219] K. Kumar, S. Srivastav, V.S. Sharanagat, Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review, *Ultrason. Sonochem.* 70 (2021) 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>.
- [220] T. Alvi, Z. Asif, M.K. Iqbal Khan, Clean label extraction of bioactive compounds from food waste through microwave-assisted extraction technique-A review, *Food Biosci.* 46 (2022) 101580. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101580>.
- [221] D.R. Dash, S.S. Pathak, R.C. Pradhan, Improvement in novel ultrasound-assisted extraction technology of high value-added components from fruit and vegetable peels, *J. Food Process Eng.* 44 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13658>.
- [222] A.C. Soria, M. Villamiel, Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review, *Trends Food Sci. Technol.* 21 (2010) 323–331.

- <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>.
- [223] C. Wen, J. Zhang, H. Zhang, C.S. Dzah, M. Zandile, Y. Duan, H. Ma, X. Luo, Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review, *Ultrason. Sonochem.* 48 (2018) 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018>.
- [224] I. Lavilla, C. Bendicho, Fundamentals of Ultrasound-Assisted Extraction, in: *Water Extr. Bioact. Compd. From Plants to Drug Dev.*, Elsevier, 2017: pp. 291–316. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00011-5>.
- [225] F. Priego-Capote, M.D. Luque De Castro, Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 644–653. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.06.006>.
- [226] T. J. Mason, F. Chemat, M. Vinatoru, The Extraction of Natural Products using Ultrasound or Microwaves, *Curr. Org. Chem.* 15 (2010) 237–247. <https://doi.org/10.2174/138527211793979871>.
- [227] T.J. Mason, L. Paniwnyk, J.P. Lorimer, The uses of ultrasound in food technology, *Ultrason. Sonochem.* 3 (1996). [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(96\)00034-X](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(96)00034-X).
- [228] Y.Q. Ma, J.C. Chen, D.H. Liu, X.Q. Ye, Effect of ultrasonic treatment on the total phenolic and antioxidant activity of extracts from citrus peel, *J. Food Sci.* 73 (2008). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00908.x>.
- [229] M. Vinatoru, T.J. Mason, I. Calinescu, Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 97 (2017) 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>.
- [230] A. Selahvarzi, Y. Ramezan, M.R. Sanjabi, B. Namdar, M. Akbarmivehie, H. Mirsaeedghazi, F. Azarikia, Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from pomegranate and orange peels and their antioxidant activity in a functional drink: Antioxidant effect of optimized pomegranate and orange peel extracts in the functional drink, *Food Biosci.* 49 (2022) 101918. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101918>.
- [231] I.M. Savic, I.M. Savic Gajic, M.G. Milovanovic, S. Zerajic, D.G. Gajic, Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction and Encapsulation of Antioxidants from Orange Peels in Alginate-Chitosan Microparticles, *Antioxidants.* 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/antiox11020297>.
- [232] R.P.-S. Diego A. Esquivel-Hernández, Ingrid P. Ibarra-Garza, José Rodríguez-Rodríguez, Sara P. Cuéllar-Bermúdez, Magdalena de J. Rostro-Alanis, Gibrán S. Alemán-Nava, J. Saúl García-Pérez, Green extraction technologies for high-value metabolites from algae: a review, *Biofuels, Bioprod. Biorefining.* 6 (2012) 246–256. <https://doi.org/10.1002/bbb>.
- [233] V. Mandal, Y. Mohan, S. Hemalatha, Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research, *Pharmacogn. Rev.* 1 (2007).
- [234] M. Letellier, H. Budzinski, Microwave assisted extraction of organic compounds, *Analisis.* 27 (1999) 259–271.
- [235] S. Xing, Y. He, H. Zhu, X. Wang, Analytical-scale microwave-assisted extraction, 2016 IEEE Int. Conf. Syst. Man, Cybern. SMC 2016 - Conf. Proc. 902 (2017) 2928–2935. <https://doi.org/10.1109/SMC.2016.7844685>.
- [236] M. Letellier, H. Budzinski, L. Charrier, S. Capes, A.M. Dorthe, Optimization by factorial design of focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediment, *Fresenius. J. Anal. Chem.* 364 (1999) 228–237. <https://doi.org/10.1007/s002160051329>.
- [237] P.L. and S.C. Valeria Cavalloro, Emanuela Martino, Microwave-Assisted Solid Extraction from

- Natural Matrices, Intech. (2016) 225–240. <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>.
- [238] H. Xue, H. Xu, X. Wang, L. Shen, H. Liu, C. Liu, Q. Qin, X. Zheng, Q. Li, Effects of Microwave Power on Extraction Kinetic of Anthocyanin from Blueberry Powder considering Absorption of Microwave Energy, *J. Food Qual.* 2018 (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/9680184>.
- [239] C. Florindo, L. Romero, I. Rintoul, L.C. Branco, I.M. Marrucho, From Phase Change Materials to Green Solvents: Hydrophobic Low Viscous Fatty Acid-Based Deep Eutectic Solvents, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6 (2018) 3888–3895. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b04235>.
- [240] K. Li, Y. Jin, D. Jung, K. Park, H. Kim, J. Lee, In situ formation of thymol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Application to antibiotics analysis in surface water based on liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography, *J. Chromatogr. Situ Form. Thymol-Based Hydrophobic Deep Eutectic Solvents Appl. to Antibiot. Anal. Surf. Water Based Liq. Microextraction Follow. by Liq. Chromatogr.* 1614 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460730>.
- [241] D. Skarpalezos, A. Detsi, Deep eutectic solvents as extraction media for valuable flavonoids from natural sources, *Appl. Sci.* 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/app9194169>.
- [242] E.A. Krisanti, K. Saputra, M.M. Arif, K. Mulia, Formulation and characterization of betaine-based deep eutectic solvent for extraction phenolic compound from spent coffee grounds, *AIP Conf. Proc.* 2175 (2019). <https://doi.org/10.1063/1.5134604>.
- [243] L.A. Rodrigues, M. Cardeira, I.C. Leonardo, F.B. Gaspar, I. Radojčić Redovniković, A.R.C. Duarte, A. Paiva, A.A. Matias, Deep eutectic systems from betaine and polyols – Physicochemical and toxicological properties, *J. Mol. Liq.* 335 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116201>.
- [244] M.R. Rover, R.C. Brown, Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method, *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 104 (2013) 366–371. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2013.06.011>.
- [245] M.R. Rover, P.A. Johnston, T. Jin, R.G. Smith, R.C. Brown, L. Jarboe, Production of clean pyrolytic sugars for fermentation, *ChemSusChem.* 7 (2014) 1662–1668. <https://doi.org/10.1002/cssc.201301259>.
- [246] M. Schroyen, H. Vervaeren, H. Vandepitte, S.W.H. Van Hulle, K. Raes, Effect of enzymatic pretreatment of various lignocellulosic substrates on production of phenolic compounds and biomethane potential, *Bioresour. Technol.* 192 (2015) 696–702. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.051>.
- [247] P. Baral, A. Pundir, V. Kumar, A.K. Kurmi, D. Agrawal, Expedient production of concentrated glucose-rich hydrolysate from sugarcane bagasse and its fermentation to lactic acid with high productivity, *Food Bioprod. Process.* 124 (2020) 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.08.005>.
- [248] J. Joshi, T. Bhattarai, L. Sreerama, Efficient Methods of Pretreatment for the Release of Reducing Sugars from Lignocellulosic Biomass Native to Nepal and Characterization of Pretreated Lignocellulosic Biomass Pretreatment of lignocellulosic biomass View project Enhancement in bioethanol pro, *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.* 9 (2018) 9–23. <http://www.bipublication.com>.
- [249] E.C. van der Pol, E. Vaessen, R.A. Weusthuis, G. Eggink, Identifying inhibitory effects of lignocellulosic by-products on growth of lactic acid producing micro-organisms using a rapid small-scale screening method, *Bioresour. Technol.* 209 (2016) 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.037>.

- [250] E.C. van der Pol, R.R. Bakker, P. Baets, G. Eggink, By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio)chemicals and fuels, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 9579–9593. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6158-9>.
- [251] S.R. Dionísio, D.C.J. Santoro, C.I.D.G. Bonan, L.B. Soares, L.E. Biazzi, S.C. Rabelo, J.L. Ienczak, Second-generation ethanol process for integral use of hemicellulosic and cellulosic hydrolysates from diluted sulfuric acid pretreatment of sugarcane bagasse, *Fuel*. 304 (2021) 121290. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121290>.
- [252] H.B. Klinke, B.K. Ahring, A.S. Schmidt, A.B. Thomsen, Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw, *Bioresour. Technol.* 82 (2002) 15–26. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00152-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00152-3).
- [253] E. van der Pol, R. Bakker, A. van Zeeland, D. Sanchez Garcia, A. Punt, G. Eggink, Analysis of by-product formation and sugar monomerization in sugarcane bagasse pretreated at pilot plant scale: Differences between autohydrolysis, alkaline and acid pretreatment, *Bioresour. Technol.* 181 (2015) 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.033>.
- [254] A. Pękal, K. Pyrzyńska, Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay, *Food Anal. Methods*. 7 (2014) 1776–1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>.
- [255] F. Furche, R. Ahlrichs, C. Hättig, W. Klopper, M. Sierka, F. Weigend, *Turbomole*, Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci. 4 (2014) 91–100. <https://doi.org/10.1002/wcms.1162>.
- [256] A. Allouche, Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares, *J. Comput. Chem.* 32 (2012) 174–182. <https://doi.org/10.1002/jcc>.
- [257] A. D. Becke, Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior, *J. Chem. Phys.* 38 (1988) 276–282. <https://doi.org/https://doi.org/10.1103/PhysRevA.38.3098>.
- [258] A. Klamt, The COSMO and COSMO-RS solvation models, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 8 (2018) 1–11. <https://doi.org/10.1002/wcms.1338>.
- [259] O.G. Sas, I. Domínguez, Á. Domínguez, B. González, Using bis(trifluoromethylsulfonyl)imide based ionic liquids to extract phenolic compounds, *J. Chem. Thermodyn.* 131 (2019) 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2018.11.002>.
- [260] N. Sidek, N.S. Ninie, S. Mohamad, Efficient removal of phenolic compounds from model oil using benzyl imidazolium-based ionic liquids, *J. Mol. Liq.* 240 (2017) 794–802. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.05.111>.
- [261] M. Larriba, S. Omar, P. Navarro, J. García, F. Rodríguez, M. Gonzalez-Miquel, Recovery of tyrosol from aqueous streams using hydrophobic ionic liquids: A first step towards developing sustainable processes for olive mill wastewater (OMW) management, *RSC Adv.* 6 (2016) 18751–18762. <https://doi.org/10.1039/c5ra26510j>.
- [262] L. Ricciardi, W. Verboom, J.P. Lange, J. Huskens, Selective Extraction of Xylose from Acidic Hydrolysate—from Fundamentals to Process, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 9 (2021) 6632–6638. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c00167>.
- [263] K.A. Kurnia, J.A.P. Coutinho, Overview of the excess enthalpies of the binary mixtures composed of molecular solvents and ionic liquids and their modeling using COSMO-RS, *Ind. Eng. Chem. Res.* 52 (2013) 13862–13874. <https://doi.org/10.1021/ie4017682>.
- [264] J.W. Westwater, H.G. Drickamer, The Mathematics of Diffusion, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 1267–1268. <https://doi.org/10.1021/ja01562a072>.

- [265] I. Volf, I. Ignat, M. Neamtu, V.I. Popa, Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols, *Chem. Pap.* 68 (2014) 121–129. <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0417-6>.
- [266] W.M.A. Wan Mahmood, A. Lorwirachsuttee, C. Theodoropoulos, M. Gonzalez-Miquel, Polyol-Based Deep Eutectic Solvents for Extraction of Natural Polyphenolic Antioxidants from *Chlorella vulgaris*, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7 (2019) 5018–5026. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b05642>.
- [267] S. Chanioti, C. Tzia, Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 48 (2018) 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.07.001>.
- [268] T. Llano, M. Alexandri, A. Koutinas, C. Gardeli, H. Papapostolou, A. Coz, N. Quijorna, A. Andres, M. Komaitis, Liquid–Liquid Extraction of Phenolic Compounds from Spent Sulphite Liquor, Waste and Biomass Valorization. 6 (2015) 1149–1159. <https://doi.org/10.1007/s12649-015-9425-9>.
- [269] O.G. Sas, I. Domínguez, B. González, Á. Domínguez, Liquid-liquid extraction of phenolic compounds from water using ionic liquids: Literature review and new experimental data using [C2mim]FSI, *J. Environ. Manage.* 228 (2018) 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.042>.
- [270] Z. Wang, S. Bhattacharyya, D.G. Vlachos, Extraction of Furfural and Furfural/5-Hydroxymethylfurfural from Mixed Lignocellulosic Biomass-Derived Feedstocks, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 9 (2021) 7489–7498. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c00982>.
- [271] R. Cañadas, I. Díaz, M. Rodríguez, E.J. González, M. González-Miquel, An integrated approach for sustainable valorization of winery wastewater using bio-based solvents for recovery of natural antioxidants, *J. Clean. Prod.* 334 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.130181>.
- [272] M.J. Jara-Palacios, S. Gonçalves, F.J. Heredia, D. Hernanz, A. Romano, Extraction of antioxidants from winemaking byproducts: Effect of the solvent on phenolic composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities, and electrochemical behaviour, *Antioxidants.* 9 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox9080675>.
- [273] B.B. Li, B. Smith, M.M. Hossain, Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method, *Sep. Purif. Technol.* 48 (2006) 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.005>.
- [274] M. Dent, D.B. Kovačević, T. Bosiljkov, V. Dragović-Uzelac, Polyphenolic composition and antioxidant capacity of indigenous wild dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.), *Croat. Chem. Acta.* 90 (2017) 451–459. <https://doi.org/10.5562/cca3231>.
- [275] J. Wiboonsirikul, S. Adachi, Extraction of functional substances from agricultural products or by-products by subcritical water treatment, *Food Sci. Technol. Res.* 14 (2008) 319–328. <https://doi.org/10.3136/fstr.14.319>.
- [276] D. Lachos-Perez, A.M. Baseggio, P.C. Mayanga-Torres, M.R. Maróstica, M.A. Rostagno, J. Martínez, T. Forster-Carneiro, Subcritical water extraction of flavanones from defatted orange peel, *J. Supercrit. Fluids.* 138 (2018) 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.015>.
- [277] M. Rehan, N.A.M. Abdel-Wahed, A. Farouk, M.M. El-Zawahry, Extraction of Valuable Compounds from Orange Peel Waste for Advanced Functionalization of Cellulosic Surfaces, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6 (2018) 5911–5928. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b04302>.
- [278] D. Stanisic, L.H.B. Liu, R. V. Dos Santos, A.F. Costa, N. Durán, L. Tasic, New sustainable process for hesperidin isolation and anti-ageing effects of hesperidin nanocrystals, *Molecules.* 25 (2020)

- 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules25194534>.
- [279] F.M. Barrales, P. Silveira, P. de P.M. Barbosa, A.R. Ruviaro, B.N. Paulino, G.M. Pastore, G.A. Macedo, J. Martinez, Recovery of phenolic compounds from citrus by-products using pressurized liquids — An application to orange peel, *Food Bioprod. Process.* 112 (2018) 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.08.006>.
- [280] S. Georgé, P. Brat, P. Alter, M.J. Amiot, Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1370–1373. <https://doi.org/10.1021/jf048396b>.
- [281] M.N. Safdar, T. Kausar, S. Jabbar, A. Mumtaz, K. Ahad, A.A. Saddozai, Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques, *J. Food Drug Anal.* 25 (2017) 488–500. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.010>.
- [282] A.E. Hegazy, M.I. Ibrahim, Antioxidant activities of orange peel extracts, *World Appl. Sci. J.* 18 (2012) 684–688. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2012.18.05.64179>.
- [283] J.R. Vergara-Salinas, J. Pérez-Jiménez, J.L. Torres, E. Agosin, J.R. Pérez-Correa, Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (*Thymus vulgaris*), *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 10920–10929. <https://doi.org/10.1021/jf3027759>.
- [284] E.M. Silva, H. Rogez, Y. Larondelle, Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology, *Sep. Purif. Technol.* 55 (2007) 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.01.008>.
- [285] F. Benmeziane, R. Djamai, Y. Cadot, R. Seridi, Optimization of extraction parameters of phenolic compounds from Algerian fresh table grapes, (*Vitis Vinifera*), *Int. Food Res. J.* 21 (2014) 1061–1065.
- [286] D.B. Uma, C.W. Ho, W.M. Wan Aida, Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from henna (*Lawsonia inermis*) leaves, *Sains Malaysiana.* 39 (2010) 119–128.
- [287] I. Hismath, W.M. Wan Aida, C.W. Ho, Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem (*Azadirachta indica*) leaves, *Int. Food Res. J.* 18 (2011) 931–939.
- [288] H. Feng, W. Yang, T. Hielscher, Power ultrasound, *Food Sci. Technol. Int.* 14 (2008) 433–436. <https://doi.org/10.1177/1082013208098814>.
- [289] Y. Ma, X. Ye, Y. Hao, G. Xu, G. Xu, D. Liu, Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel, *Ultrason. Sonochem.* 15 (2008) 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.03.006>.
- [290] M. Sivakumar, A.B. Pandit, Ultrasound enhanced degradation of Rhodamine B: Optimization with power density, *Ultrason. Sonochem.* 8 (2001) 233–240. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00082-7](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00082-7).
- [291] N. M'hiri, I. Ioannou, N. Mihoubi Boudhrioua, M. Ghoul, Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel, *Food Bioprod. Process.* 96 (2015) 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.07.010>.
- [292] T. Inoue, S. Tsubaki, K. Ogawa, K. Onishi, J. ichi Azuma, Isolation of hesperidin from peels of thinned Citrus unshiu fruits by microwave-assisted extraction, *Food Chem.* 123 (2010) 542–547. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.051>.
- [293] K. Grohmann, J.A. Manthey, R.G. Cameron, Acid-catalyzed hydrolysis of hesperidin at elevated temperatures, *Carbohydr. Res.* 328 (2000) 141–146. [192](https://doi.org/10.1016/S0008-</a></p></div><div data-bbox=)

- 6215(00)00081-1.
- [294] Y. Dai, J. van Spronsen, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology, *Anal. Chim. Acta.* 766 (2013) 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>.
- [295] V. Vieira, M.A. Prieto, L. Barros, J.A.P. Coutinho, I.C.F.R. Ferreira, O. Ferreira, Enhanced extraction of phenolic compounds using choline chloride based deep eutectic solvents from *Juglans regia* L., *Ind. Crops Prod.* 115 (2018) 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.029>.
- [296] J.E. Cacace, G. Mazza, Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries, *J. Food Eng.* 59 (2003) 379–389. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00497-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00497-1).
- [297] B. Ozturk, C. Parkinson, M. Gonzalez-Miquel, Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents, *Sep. Purif. Technol.* 206 (2018) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.05.052>.
- [298] W. Lu, S. Liu, Choline chloride-based deep eutectic solvents (Ch-DESs) as promising green solvents for phenolic compounds extraction from bioresources: state-of-the-art, prospects, and challenges, *Biomass Convers. Biorefinery.* 12 (2022) 2949–2962. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00753-7>.
- [299] G. Qin, F. Zhang, M. Ren, X. Chen, C. Liu, G. Li, Q. Gao, L. Qiao, Y. Jiang, L. Zhu, Y. Guo, G. Wang, Eco-friendly and efficient extraction of polyphenols from *Ligustrum robustum* by deep eutectic solvent assisted ultrasound, *Food Chem.* 429 (2023) 136828. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136828>.
- [300] C. Gómez-Urios, A. Viñas-Ospino, P. Puchades-Colera, J. Blesa, D. López-Malo, A. Frígola, M.J. Esteve, Choline chloride-based natural deep eutectic solvents for the extraction and stability of phenolic compounds, ascorbic acid, and antioxidant capacity from *Citrus sinensis* peel, *Lwt.* 177 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114595>.
- [301] W. Bi, M. Tian, K.H. Row, Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization, *J. Chromatogr. A.* 1285 (2013) 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.041>.
- [302] X.H. Yao, D.Y. Zhang, M.H. Duan, Q. Cui, W.J. Xu, M. Luo, C.Y. Li, Y.G. Zu, Y.J. Fu, Preparation and determination of phenolic compounds from *Pyrola incarnata* Fisch. with a green polyols based-deep eutectic solvent, *Sep. Purif. Technol.* 149 (2015) 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.03.037>.
- [303] A. Yadav, S. Trivedi, R. Rai, S. Pandey, Densities and dynamic viscosities of (choline chloride+glycerol) deep eutectic solvent and its aqueous mixtures in the temperature range (283.15-363.15)K, *Fluid Phase Equilib.* 367 (2014) 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2014.01.028>.
- [304] N. Altunay, A. Elik, R. Gürkan, Preparation and application of alcohol based deep eutectic solvents for extraction of curcumin in food samples prior to its spectrophotometric determination, *Food Chem.* 310 (2020) 125933. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125933>.
- [305] S. Yeoh, J. Shi, T.A.G. Langrish, Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels, *Desalination.* 218 (2008) 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.02.018>.
- [306] C. Hao, L. Chen, H. Dong, W. Xing, F. Xue, Y. Cheng, Extraction of flavonoids from *scutellariae*

- radix using ultrasound-assisted deep eutectic solvents and evaluation of their anti-inflammatory activities, *ACS Omega*. 5 (2020) 23140–23147. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02898>.
- [307] N. Kishimoto, Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Olive By-Products, *Chem. Eng. Trans.* 91 (2022) 613–618. <https://doi.org/10.3303/CET2291103>.
- [308] A.J. Curtis, P.L. McGeer, G.B. Rathmann, C.P. Smyth, Microwave Absorption and Molecular Structure in Liquids. VII. Effects of Viscosity and Dipole-Dipole Forces, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 644–648. <https://doi.org/10.1021/ja01123a018>.
- [309] S. Bonacci, M.L. Di Gioia, P. Costanzo, L. Maiuolo, S. Tallarico, M. Nardi, Natural deep eutectic solvent as extraction media for the main phenolic compounds from olive oil processing wastes, *Antioxidants*. 9 (2020) 1–14. <https://doi.org/10.3390/antiox9060513>.
- [310] M.A. Nedyalkova, S. Madurga, M. Tobiszewski, V. Simeonov, Calculating the Partition Coefficients of Organic Solvents in Octanol/Water and Octanol/Air, *J. Chem. Inf. Model.* 59 (2019) 2257–2263. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00212>.
- [311] S. Roy, M. Jaidann, S. Ringuette, L.S. Lussier, H. Abou-Rachid, Predictions of thermodynamic properties of energetic materials using COSMO-RS, *Procedia Comput. Sci.* 1 (2010) 1203–1211. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2010.04.134>.
- [312] G. Oliveira, J.P. Wojeicchowski, F.O. Farias, L. Igarashi-Mafra, R. de Pelegrini Soares, M.R. Mafra, Enhancement of biomolecules solubility in aqueous media using designer solvents as additives: An experimental and COSMO-based models' approach, *J. Mol. Liq.* 318 (2020) 114266. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114266>.
- [313] M.J.M. Wells, Log DOW: Key to understanding and regulating wastewater-derived contaminants, *Environ. Chem.* 3 (2006) 439–449. <https://doi.org/10.1071/EN06045>.
- [314] R. Santiago, I. Díaz, M. González-Miquel, P. Navarro, J. Palomar, Assessment of bio-ionic liquids as promising solvents in industrial separation processes: Computational screening using COSMO-RS method, *Fluid Phase Equilib.* 560 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2022.113495>.
- [315] P. López-porfiri, P. Gorgojo, M. González-miquel, Solubility study and thermodynamic modelling of succinic acid and fumaric acid in bio-based solvents, 369 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120836>.
- [316] D. Rodríguez-Llorente, A. Cañada-Barcala, C. Muñoz, G. Pascual-Muñoz, P. Navarro, R. Santiago, V.I. Águeda, S. Álvarez-Torrellas, J. García, M. Larriba, Separation of phenols from aqueous streams using terpenoids and hydrophobic eutectic solvents, *Sep. Purif. Technol.* 251 (2020) 117379. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117379>.
- [317] H.H. Tournour, M.A. Segundo, L.M. Magalhães, L. Barreiros, J. Queiroz, L.M. Cunha, Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties, *Ind. Crops Prod.* 74 (2015) 397–406. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.055>.
- [318] D.A. Teigiserova, L. Hamelin, L. Tiruta-Barna, A. Ahmadi, M. Thomsen, Circular bioeconomy: Life cycle assessment of scaled-up cascading production from orange peel waste under current and future electricity mixes, *Sci. Total Environ.* 812 (2022) 152574. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152574>.
- [319] B. Rivas, A. Torrado, P. Torre, A. Converti, J.M. Domínguez, Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 2380–2387. <https://doi.org/10.1021/jf073388r>.
- [320] K. Grohmann, R.G. Cameron, B.S. Buslig, Fractionation and pretreatment of orange peel by

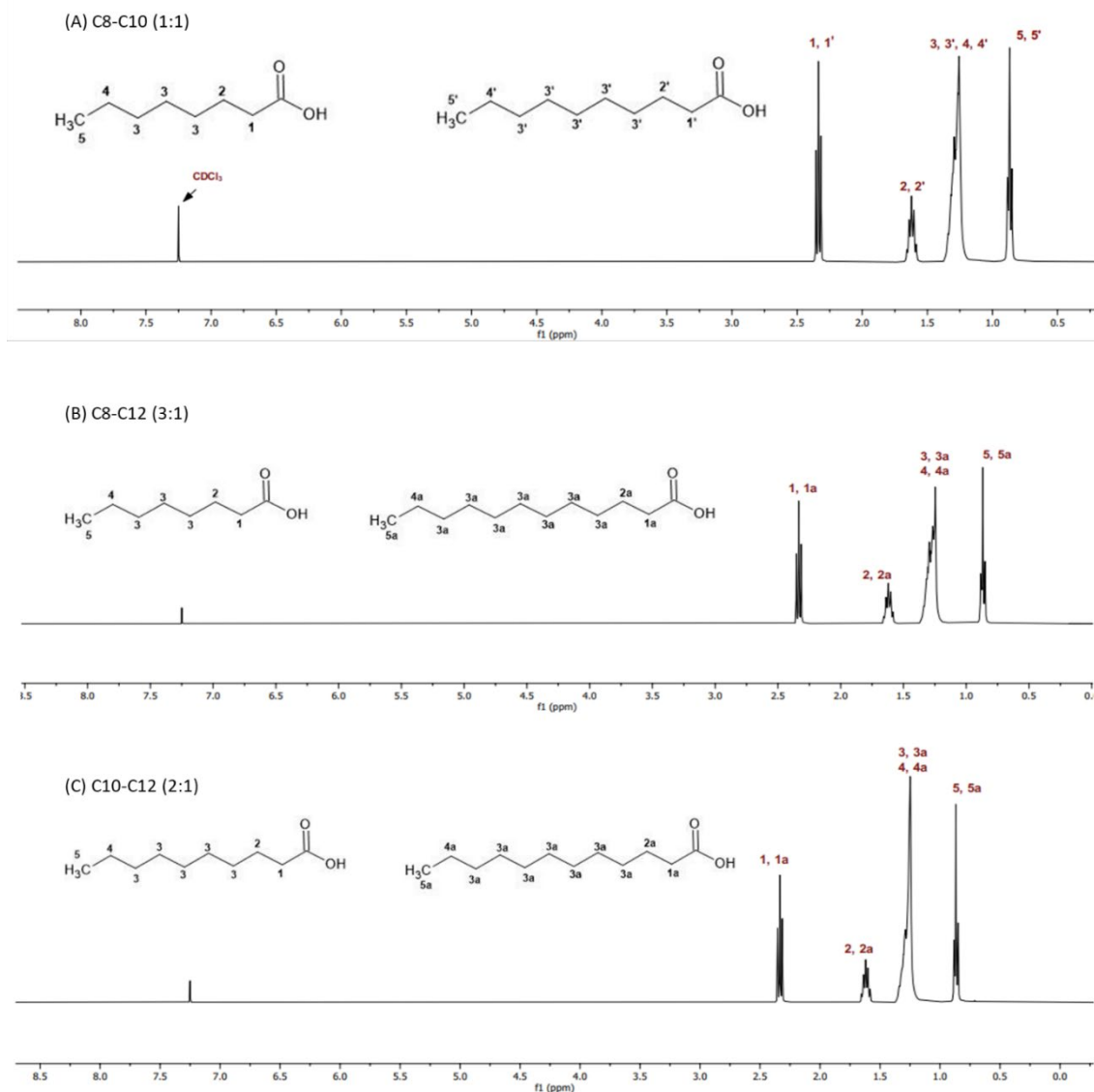
- dilute acid hydrolysis, *Bioresour. Technol.* 54 (1995) 129–141. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00121-2](https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00121-2).
- [321] M. Ortiz-Sanchez, A.B. Omarini, J.A. González-Aguirre, M. Baglioni, J.A. Zygodlo, J. Breccia, R. D'Souza, L. Lemesoff, M. Bodeain, C.A. Cardona-Alzate, I. Pejchinovski, M.H. Fernandez-Lahore, Valorization routes of citrus waste in the orange value chain through the biorefinery concept: The Argentina case study, *Chem. Eng. Process. - Process Intensif.* 189 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.cep.2023.109407>.
- [322] P. Putnik, D. Bursać Kovačević, A. Režek Jambrak, F.J. Barba, G. Cravotto, A. Binello, J.M. Lorenzo, A. Shpigelman, Innovative “green” and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from citruswastes - A review, *Molecules.* 22 (2017). <https://doi.org/10.3390/molecules22050680>.
- [323] E. Espinosa, E. Rincón, R. Morcillo-Martín, L. Rabasco-Vílchez, A. Rodríguez, Orange peel waste biorefinery in multi-component cascade approach: Polyphenolic compounds and nanocellulose for food packaging, *Ind. Crops Prod.* 187 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115413>.
- [324] B.R. Sumere, M.C. de Souza, M.P. dos Santos, R.M.N. Bezerra, D.T. da Cunha, J. Martinez, M.A. Rostagno, Combining pressurized liquids with ultrasound to improve the extraction of phenolic compounds from pomegranate peel (*Punica granatum L.*), *Ultrason. Sonochem.* 48 (2018) 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.05.028>.
- [325] C.P. Zhu, X.C. Zhai, L.Q. Li, X.X. Wu, B. Li, Response surface optimization of ultrasound-assisted polysaccharides extraction from pomegranate peel, *Food Chem.* 177 (2015) 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.022>.
- [326] M. Çam, Y. Hişil, Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels, *Food Chem.* 123 (2010) 878–885. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.011>.



# Anexos



# Información experimental complementaria



**Figura A.1.** Caracterización de los DE hidrófobos por  $^1\text{H}$ -RMN (A) C8-C10, (B) C8-C12 y (C) C10-C12 en  $\text{CDCl}_3$ .

**Tabla A.1.** Rectas de calibrado de los análisis espectrofotométricos.

Análisis	Rango	Recta	r <sup>2</sup>
Contenido de compuestos fenólicos totales	0-400 mg GAE/L	y=0,0042x + 0,0182	0,9997
		y= abs (765 nm) x=mg GAE/L	
Contenido de flavonoides totales	0-500 mg QE/L	y=0,0009x + 0,0017	0,9979
		y= abs (510 nm) x=mg QE/L	
Capacidad antioxidante	0-200 mg TE/L	y=0,4324x - 1,8412	0,9991
		y= abs (515 nm) x=mg TE/L	

**Tabla A.2.** Rectas de calibrado de los métodos de HPLC (área del pico vs. concentración de las respectivas muestras estándar).

Método HPLC	Compuesto	Rango	Recta	r <sup>2</sup>
Compuestos fenólicos	FE	0-40 mg/L	y=35029x-7853,4	0,9998
	oCRE		y=31424x-9005,2	0,9999
	SIR		y=13114x-1173,3	0,9999
	GUA		y=40312x-17800	0,9995
	VAN		y=88831x-19630	0,9998
Compuestos inhibidores (furanos y compuestos fenólicos)	FF	0-100 mg/L	y=311542x-57869	0,9999
	5HMF		y=45602x+17856	0,9999
	FE		y=22074x+4503	0,9867
	GUA		y=33421x+2728,7	0,9999
	SIR		y=6154,7+5342,4	0,9997
	4HBald		y=288933x+108909	1
	VAN		y=178498x+126479	1
	A4HB		y=131706x+54257	0,9999
	AV		y=101780x+46408	0,9999
Compuestos fenólicos residuo sólido de naranja	ApC	0-40 mg/L	y=322069x+121253	0,9999
	AF		y=155846x+96106	1
	AG		y=103615x-123254	1
	ApC		y=93990x-21488	0,9999
	CAT		y=30879x-2876,2	0,9999
	ACaf		y=221709x-83719	1
	RUT		y=50031x-11957	0,9999
	ApC		y=263761x-49972	0,9999
	AF		y=221778x-46631	0,9999
Azucares	NAR	0,1-25 g/L	y=64985x-25083	0,9995
	HESP		y=59169x-31685	0,9999
	QUER		y=147852x-210633	0,9996
	SAC		y=266,15x	0,9997
	GLU		y=501,3x	0,9994
	FRU	y=480,5x	0,9996	

**Tabla A.3.** Comparación de la eficiencia de extracción de los DE hidrófobos (C8-C10, C8-C12, C10-C12) para las disoluciones simples de 100 mg/L de fenol, *o*-cresol, guayacol, siringol y vainillina. Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 15 min; T= 25 °C. Separación de fases: reposo durante la noche.

	Eficiencia de extracción (%)				
	Fenol	<i>o</i> -cresol	Guayacol	Siringol	Vainillina
C8-C10	90,4 ± 1,1	95,8 ± 0,4	93,3 ± 4,4	89,3 ± 0,7	85,2 ± 0,3
C8-C12	90,8 ± 0,8	95,8 ± 1,4	93,2 ± 1,5	89,8 ± 0,1	85,0 ± 0,2
C10-C12	82,8 ± 0,7	94,7 ± 1,3	91,4 ± 3,8	85,4 ± 0,2	81,8 ± 0,1

**Tabla A.4.** Eficiencia de extracción de los disolventes ensayados (C8-C10, C8-C12, C10-C12, 2MeTHF, CPME y LIM) a diferentes concentraciones iniciales de la mezcla multicomponente (50-CF, 100-CF, 250- CF y 500- CF). Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 15 min; T= 25 °C. Separación de fases: reposo durante la noche.

		Eficiencia de extracción (%)				
		Fenol	<i>o</i> -cresol	Guayacol	Siringol	Vainillina
50-CF	C8-C10	15,1 ± 2,3	87,0 ± 2,5	88,4 ± 0,5	83,5 ± 2,7	64,3 ± 1,4
	C8-C12	22,1 ± 1,7	89,8 ± 4,7	88,3 ± 0,1	91,5 ± 7,8	73,3 ± 0,5
	C10-C12	68,3 ± 2,2	88,2 ± 1,0	88,5 ± 1,0	83,7 ± 1,3	64,4 ± 1,6
	2MeTHF	95,8 ± 4,0	93,5 ± 1,4	88,8 ± 0,5	94,2 ± 3,7	91,2 ± 4,2
	CPME	96,3 ± 4,6	93,6 ± 2,6	88,4 ± 0,5	93,2 ± 4,3	87,0 ± 1,8
	LIM	28,0 ± 0,8	70,3 ± 1,1	76,9 ± 2,5	44,4 ± 6,5	29,6 ± 0,8
100-CF	C8-C10	92,1 ± 1,8	94,5 ± 0,8	92,5 ± 1,2	89,5 ± 3,0	83,0 ± 0,1
	C8-C12	94,0 ± 1,9	94,5 ± 1,1	92,5 ± 4,5	89,3 ± 5,3	83,6 ± 0,4
	C10-C12	81,8 ± 2,2	93,2 ± 0,8	91,5 ± 6,2	84,0 ± 5,1	81,6 ± 0,8
	2MeTHF	97,5 ± 4,5	97,9 ± 3,4	96,3 ± 4,1	93,2 ± 4,6	95,1 ± 5,7
	CPME	96,5 ± 0,5	97,8 ± 5,1	96,1 ± 5,0	90,7 ± 2,6	92,7 ± 0,6
	LIM	53,4 ± 0,1	79,6 ± 3,9	62,5 ± 0,9	33,8 ± 0,7	55,4 ± 0,3
250-CF	C8-C10	90,0 ± 1,4	95,3 ± 0,8	93,4 ± 1,9	88,7 ± 2,3	85,4 ± 0,3
	C8-C12	91,2 ± 1,5	95,4 ± 1,9	93,5 ± 1,9	88,8 ± 4,3	85,7 ± 0,1
	C10-C12	80,8 ± 2,5	94,2 ± 1,5	92,1 ± 3,4	83,9 ± 0,6	81,2 ± 0,3
	2MeTHF	98,4 ± 1,4	99,0 ± 2,2	97,5 ± 4,7	93,3 ± 5,1	95,8 ± 1,6
	CPME	97,1 ± 2,9	98,5 ± 2,9	97,1 ± 4,5	92,0 ± 2,6	93,9 ± 0,2
	LIM	50,9 ± 0,2	82,6 ± 2,6	94,8 ± 0,1	60,0 ± 0,5	54,7 ± 0,1
500-CF	C8-C10	88,4 ± 3,3	94,1 ± 1,7	93,4 ± 1,5	90,0 ± 2,7	85,6 ± 0,1
	C8-C12	88,1 ± 2,6	93,9 ± 2,6	93,5 ± 1,3	90,2 ± 1,3	85,2 ± 0,3
	C10-C12	80,9 ± 0,9	92,2 ± 0,8	91,5 ± 1,6	86,1 ± 4,4	80,8 ± 0,4
	2MeTHF	98,3 ± 1,4	98,3 ± 1,7	97,3 ± 2,0	94,6 ± 1,6	95,5 ± 4,9
	CPME	97,2 ± 4,8	98,3 ± 1,2	96,8 ± 1,2	92,1 ± 3,3	92,9 ± 0,3
	LIM	50,7 ± 1,1	77,0 ± 3,0	93,1 ± 2,4	67,0 ± 0,3	52,0 ± 0,2

**Tabla A.5.** Eficiencia de extracción de los disolventes ensayados (C8-C10, C8-C12, C10-C12, 2MeTHF, CPME y LIM) a diferentes temperaturas (25, 40 y 60 °C) para la mezcla 500-CF. Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 15 min; C<sub>o</sub>= 500 mg/L. Separación de fases: reposo durante la noche.

		Eficiencia de extracción (%)				
		Fenol	<i>o</i> -cresol	Guayacol	Siringol	Vainillina
500-CF T= 25 °C	C8-C10	88,4 ± 3,3	94,1 ± 1,7	93,4 ± 1,5	90,0 ± 2,7	85,6 ± 0,1
	C8-C12	88,1 ± 2,6	93,9 ± 2,6	93,5 ± 1,3	90,2 ± 1,3	85,2 ± 0,3
	C10-C12	80,9 ± 0,9	92,2 ± 0,8	91,5 ± 1,6	86,1 ± 4,4	80,8 ± 0,4
	2MeTHF	98,3 ± 1,4	98,3 ± 1,7	97,3 ± 2,0	94,6 ± 1,6	95,5 ± 4,9
	CPME	97,2 ± 4,8	98,3 ± 1,2	96,8 ± 1,2	92,1 ± 3,3	92,9 ± 0,3
	LIM	50,7 ± 1,1	77,0 ± 3,0	93,1 ± 2,4	67,0 ± 0,3	52,0 ± 0,2
500-CF T= 40 °C	C8-C10	88,9 ± 1,3	95,2 ± 0,8	93,4 ± 2,7	91,0 ± 2,5	84,4 ± 0,2
	C8-C12	90,2 ± 0,5	95,2 ± 1,0	93,3 ± 0,8	91,4 ± 1,2	84,6 ± 0,7
	C10-C12	81,0 ± 2,9	93,7 ± 0,9	91,3 ± 2,3	84,8 ± 0,7	77,5 ± 0,5
	2MeTHF	98,3 ± 2,6	98,8 ± 5,4	97,4 ± 4,9	94,3 ± 3,5	95,5 ± 4,2
	CPME	95,1 ± 1,5	95,5 ± 2,8	94,3 ± 4,0	89,3 ± 3,1	89,0 ± 0,3
	LIM	57,5 ± 0,8	84,3 ± 0,9	93,2 ± 1,4	76,6 ± 1,6	54,4 ± 0,3
500-CF T= 60 °C	C8-C10	89,8 ± 1,1	95,1 ± 0,3	93,8 ± 0,9	93,1 ± 5,6	85,2 ± 0,4
	C8-C12	91,2 ± 1,4	95,2 ± 1,1	93,6 ± 2,5	93,2 ± 3,8	85,2 ± 0,2
	C10-C12	83,5 ± 2,1	94,1 ± 0,5	92,1 ± 1,4	89,5 ± 5,2	81,1 ± 0,0
	2MeTHF	98,0 ± 0,2	98,9 ± 2,1	97,1 ± 1,7	95,0 ± 1,9	94,4 ± 4,3
	CPME	96,6 ± 3,5	98,7 ± 8,3	96,9 ± 3,3	92,9 ± 3,3	86,2 ± 0,3
	LIM	60,3 ± 1,2	84,7 ± 0,8	91,7 ± 2,8	86,1 ± 0,6	55,5 ± 0,2

**Tabla A.6.** Eficiencia de la extracción de los disolventes ensayados (C8-C10, C8-C12, C10-C12, 2MeTHF, CPME y LIM) en la muestra CF-GLU. Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 15 min; T= 25 °C; C<sub>o</sub> compuestos fenólicos= 500 mg/L; C<sub>o</sub> glucosa= 50 g/L. Separación de fases: reposo durante la noche.

	Eficiencia de extracción (%)					
	Fenol	<i>o</i> -cresol	Guayacol	Siringol	Vainillina	Glucosa
C8-C10	88,1 ± 0,2	95,4 ± 0,5	93,7 ± 4,5	91,0 ± 3,4	85,9 ± 0,2	0,4 ± 0,1
C8-C12	89,0 ± 0,2	95,6 ± 0,9	93,7 ± 3,9	91,1 ± 3,6	85,9 ± 0,1	1,0 ± 0,2
C10-C12	81,1 ± 0,9	94,4 ± 1,4	92,5 ± 3,9	87,0 ± 0,3	81,7 ± 0,5	2,1 ± 0,3
2MeTHF	98,6 ± 1,3	99,2 ± 0,1	97,9 ± 4,1	94,9 ± 1,3	96,1 ± 0,3	20,2 ± 0,4
CPME	97,7 ± 2,5	99,1 ± 1,0	97,8 ± 3,9	93,2 ± 1,4	94,3 ± 0,8	3,2 ± 0,6
LIM	51,3 ± 0,5	83,7 ± 4,9	93,5 ± 1,6	73,3 ± 1,9	54,0 ± 0,1	4,4 ± 0,3

**Tabla A.7.** Eficiencia de extracción del CPME en la mezcla sintética IF-AZ a diferentes tiempos de agitación. Condiciones experimentales: relación muestra: disolvente=1; t agitación= 5, 10, 15, 30 y 45 min; T= 25 °C. Separación de fases: reposo durante la noche.

	Eficiencia de extracción (%)				
	5 min	10 min	15 min	30 min	45 min
FF	82,2 ± 0,1	82,8 ± 0,5	81,5 ± 0	83,2 ± 0,1	81,6 ± 0,1
5HMF	23,7 ± 1,0	24,5 ± 0,6	23,5 ± 0,7	27,8 ± 0,1	22,7 ± 0,1
FE	97,9 ± 0,1	97,9 ± 0,1	96,5 ± 0,1	99,8 ± 0,1	99,8 ± 0,1
GUA	97,3 ± 0,1	97,2 ± 0,1	96,1 ± 0,1	99,7 ± 0,1	99,6 ± 0,1
SIR	89,7 ± 1,0	89,7 ± 0,3	89 ± 0,7	99,8 ± 0,1	99,8 ± 0,1
4HBald	94,3 ± 0,1	94,4 ± 0,1	93,3 ± 0,1	95 ± 0,1	94,4 ± 0,1
VAN	95,3 ± 0,1	95,3 ± 0,1	94,2 ± 0,1	97,4 ± 0,1	97,2 ± 0,1
A4HB	92,5 ± 0	92,6 ± 0,3	91,2 ± 0,1	97 ± 0,1	96,7 ± 0,1
AV	91,9 ± 0,2	91,8 ± 0,2	90,5 ± 0,1	97,5 ± 0,1	97,2 ± 0,1
ApC	97,4 ± 0,1	97,4 ± 0,1	96,5 ± 0,1	97,2 ± 0,1	97 ± 0,1
AF	96,1 ± 0,1	95,9 ± 0,1	94,7 ± 0,1	98 ± 0,1	97,7 ± 0,1
GLU	5,3 ± 1,4	5,6 ± 3,8	4,5 ± 2,8	7,4 ± 0,3	6,5 ± 0,7
FRU	6,8 ± 3	6,1 ± 2,6	4,2 ± 1,1	8,4 ± 3,1	7,3 ± 2,4
SAC	4,8 ± 0,9	0,8 ± 1,6	3,7 ± 0,8	6,3 ± 0,5	5,6 ± 1,3

**Tabla A.8.** Eficiencia de extracción del CPME en la mezcla sintética IF-AZ con diferentes relaciones muestra: disolvente. Condiciones experimentales: relación D:M=0,1; 0,5; 1; 1,5; t agitación= 30 min; T= 25 °C. Separación de fases: reposo durante la noche.

	Eficiencia de extracción (%)			
	D:M (0,1)	D:M (0,5)	D:M (1)	D:M (1,5)
FF	32,1 ± 0,1	72,5 ± 0,1	83,2 ± 0	88 ± 0,1
5HMF	3,4 ± 1,5	16,6 ± 0,6	27,8 ± 0,2	35,9 ± 0,2
FE	85,8 ± 0,2	94,4 ± 0,1	97,6 ± 0	97,7 ± 0,1
GUA	81,6 ± 0,1	93,5 ± 0,2	96,9 ± 0,1	97,4 ± 0,1
SIR	48,4 ± 0,7	80,8 ± 0,1	89,8 ± 0,5	92,9 ± 0,4
4HBald	67,9 ± 0,1	88,1 ± 0,1	94,3 ± 0,1	95,3 ± 0,1
VAN	76,5 ± 0,1	91,3 ± 0,1	95,3 ± 0,1	96,6 ± 0,1
A4HB	66,0 ± 0,1	86,4 ± 0,1	92,5 ± 0,1	94,2 ± 0,1
AV	62,5 ± 0,4	85,2 ± 0,2	92,0 ± 0,1	93,3 ± 0,1
ApC	70,3 ± 0,1	93,4 ± 0,1	97,2 ± 0,1	97,3 ± 0,1
AF	78,1 ± 0,1	90,5 ± 0,1	95,7 ± 0,1	96 ± 0,1
GLU	10,8 ± 1,1	7,2 ± 44,8	7,4 ± 0,3	4,2 ± 1,1
FRU	11,3 ± 2,2	7,5 ± 1,4	8,4 ± 3,1	3,9 ± 0,7
SAC	11,2 ± 1,2	5,7 ± 2,2	6,3 ± 0,5	4,1 ± 0,3

**Tabla A.9.** Estudio de la recuperación del disolvente en tres ciclos para la mezcla sintética IF-AZ utilizando CPME como disolvente. Condiciones experimentales: relación D:M = 1; t agitación= 30 min; T= 25 °C. Separación de fases: reposo durante la noche.

	Eficiencia de extracción (%)		
	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3
FF	83,2 ± 0,1	79,1 ± 0,1	76,2 ± 0,1
5HMF	27,8 ± 0,2	23,7 ± 0,3	22,6 ± 0,2
FE	99,8 ± 0,1	97,3 ± 0,1	96,8 ± 0,1
GUA	99,7 ± 0,1	97,7 ± 0,1	97,3 ± 0,1
SIR	99,8 ± 0,1	88,3 ± 0,5	86,9 ± 0,6
4HBald	95 ± 0,1	94,4 ± 0,1	94 ± 0,1
VAN	97,4 ± 0,1	95,2 ± 0,1	94,7 ± 0,1
A4HB	97,0 ± 0,1	92,2 ± 0,1	91,7 ± 0,1
AV	97,5 ± 0,1	91,8 ± 0,1	91,2 ± 0,2
ApC	97,2 ± 0,1	97,3 ± 0,1	96,9 ± 0,1
AF	97,2 ± 0,1	97,3 ± 0,1	96,9 ± 0,1
GLU	10,3 ± 2,9	4,8 ± 6,7	11,9 ± 2,5
FRU	1,3 ± 5,1	4,0 ± 5,4	6,8 ± 4,6
SAC	6,2 ± 0,7	2,7 ± 4	13,3 ± 1,1

**Tabla A.10.** Extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando agitador orbital. Análisis de los extractos: contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 30, 60 y 90 min; T extracción= 60 °C, t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

	T (°C)	t (min)	TPC (mg GAE/ g RSN)	TFC (mg QE / g RSN)	HPLC (mg/g RSN ± RDS%)							
					HESP	NAR	CAT	RUT	AG	ACaf	ApC	AF
H <sub>2</sub> O	30	60	5,4 ± 0,1	5,7 ± 0,1	7,57 ± 0,2	0,05 ± 5,0	0,25 ± 17,6	0,03 ± 3,7	0,68 ± 0,84	0,02 ± 0,6	0,08 ± 3,6	0,1 ± 3,6
		30	7,8 ± 0,2	5,3 ± 0,1	7,81 ± 0,8	0,07 ± 3,3	0,27 ± 1,8	0,04 ± 2,3	0,83 ± 1,6	0,02 ± 5,1	0,1 ± 1,3	0,13 ± 1,3
	60	60	7,8 ± 0,1	5,5 ± 0,1	7,97 ± 0,3	0,05 ± 3,9	0,24 ± 1,6	0,03 ± 1,5	0,93 ± 0,21	0,01 ± 3,8	0,11 ± 3,0	0,11 ± 3,1
		90	8,1 ± 0,1	5,6 ± 0,2	7,31 ± 0,6	0,08 ± 3,1	0,25 ± 1,4	0,04 ± 3,3	0,92 ± 0,39	0,02 ± 0,8	0,11 ± 1,7	0,15 ± 1,7
80% EtOH	30	60	3,9 ± 0,1	8,8 ± 0,1	5,14 ± 0,2	-	0,02 ± 7,7	0,03 ± 1,1	0,08 ± 5,3	0,01 ± 1,9	0,02 ± 0,6	0,04 ± 0,6
		30	8,2 ± 0,1	12,8 ± 0,3	34,94 ± 0,1	-	0,06 ± 6,9	0,04 ± 3,5	0,02 ± 1,85	0,01 ± 4,7	0,03 ± 5,6	0,15 ± 5,6
	60	60	6,8 ± 0,5	12,5 ± 0,4	27,37 ± 0,1	-	0,03 ± 1,2	0,04 ± 3,3	0,29 ± 16,07	0,01 ± 3,9	0,05 ± 4,1	0,07 ± 4,1
		90	8,1 ± 0,1	12,4 ± 0,1	29,53 ± 0,1	-	0,05 ± 8,1	0,04 ± 1,	0,02 ± 8,36	0,01 ± 3,5	0,02 ± 2,2	0,07 ± 2,2
EA	30	60	0,4 ± 0,2	2,5 ± 0,1	0,13 ± 4,0	-	-	-	-	-	-	-
		30	0,8 ± 0,9	4,4 ± 0,9	0,3 ± 4,3	-	-	-	-	-	-	-
	60	60	1,1 ± 0,5	4,1 ± 0,4	0,28 ± 3,4	-	-	-	-	-	-	-
		90	1,2 ± 1,3	3,7 ± 0,9	0,44 ± 1,3	-	-	-	-	-	-	-

(-) compuesto no identificado. QUER no identificada en ningún extracto.

**Tabla A.11.** Extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando baño de ultrasonidos. Análisis de los extractos: contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 30min; T extracción= 60 °C, t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

	TPC (mg GAE/ g RSN)	TFC (mg QE / g RSN)	HPLC (mg/g RSN ± RDS%)							
			HESP	NAR	CAT	RUT	AG	ACaf	ApC	AF
H <sub>2</sub> O	4,2 ± 0,2	2,6 ± 0,4	9,71 ± 0,9	0,04 ± 0,1	0,20 ± 9,3	0,02 ± 3,9	0,54 ± 3,5	0,01 ± 2	0,06 ± 7,8	0,09 ± 2,4
80% EtOH	4,1 ± 0	6,1 ± 0,5	17,24 ± 0,1	-	0,01±3,4	0,02 ± 1,3	0,00 ± 16,8	0,01 ± 0,2	0,01 ± 6,1	0,04 ± 1
EA	1,1 ± 0,9	3,9 ± 0,2	0,41 ± 3	-	-	-	-	-	-	-

(-) compuesto no identificado. QUER no identificada en ningún extracto.

**Tabla A.12.** Extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando sonda de ultrasonidos. Análisis de los extractos: contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; P= 10 W; t extracción= 1,5; 3 y 6 min; T extracción≈ 60 °C, t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

t (min)	TPC (mg GAE/ g RSN)	TFC (mg QE / g RSN)	HPLC (mg/g RSN ± RDS%)								
			HESP	NAR	CAT	RUT	AG	ACaf	ApC	AF	
H <sub>2</sub> O	1,5	7,6 ± 0,0	5,2 ± 0,1	12,26 ± 1,5	0,03 ± 15,5	0,28 ± 2	0,03 ± 8,9	0,87 ± 0,1	0,01 ± 4	0,12 ± 3,8	0,11 ± 0,9
	3	8,1 ± 0,1	5,2 ± 0,1	8,83 ± 0,3	0,03 ± 12,2	0,26 ± 0,5	0,03 ± 7,8	0,65 ± 12,2	0,01 ± 2,8	0,08 ± 0,7	0,11 ± 0,6
	6	7,4 ± 0,1	5,8 ± 0,0	8,09 ± 3,1	0,05 ± 4,4	0,19 ± 1,7	0,03 ± 1,2	0,66 ± 0,4	0,01 ± 4,6	0,08 ± 1,1	0,10 ± 4,2
80% EtOH	1,5	8,8 ± 0,0	17,1 ± 0,2	40,04 ± 0,2	-	0,13 ± 9,6	0,04 ± 2,2	0,29 ± 1,9	0,01 ± 6,1	0,07 ± 1,1	0,16 ± 0,8
	3	8,4 ± 0,1	12,6 ± 0,1	34,36 ± 0,1	-	0,06 ± 1,8	0,03 ± 5,1	0,03 ± 36,9	0,01 ± 5,9	0,04 ± 2,5	0,11 ± 1,4
	6	9,1 ± 0,0	21,4 ± 0,1	31,99 ± 0,2	-	0,11 ± 2,6	0,03 ± 4,1	0,26 ± 0,1	0,01 ± 2,1	0,05 ± 10,8	0,13 ± 1,6
EA	1,5	0,8 ± 0,8	4,6 ± 0,4	0,25 ± 0,3	-	-	-	-	-	-	-
	3	1 ± 1,6	3,9 ± 2,7	0,40 ± 1,8	-	-	-	-	-	-	-
	6	0,9 ± 0,3	3,9 ± 1,7	0,42 ± 0,3	-	-	-	-	-	-	-

(-) compuesto no identificado. QUER no identificada en ningún extracto.

**Tabla A.13.** Extracción de compuestos fenólicos de RSN mediante extracción asistida por microondas. Análisis de los extractos: contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 1,5; 3 y 6 min; T extracción= 60 y 100 °C, t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

	T (°C)	t (min)	TPC (mg GAE/ g RSN)	TFC (mg QE / g RSN)	HPLC (mg/g RSN ± RDS%)							
					HESP	NAR	CAT	RUT	AG	ACaf	ApC	AF
H <sub>2</sub> O	60	1,5	5,6 ± 0,1	2,9 ± 0,2	9,8 ± 0,3	0,06 ± 10	0,35 ± 4,1	0,02 ± 2,1	0,84 ± 0,4	0,01 ± 3,7	0,10 ± 0,6	0,11 ± 1,4
	100	1,5	5,1 ± 0,3	3,1 ± 0,1	21,97 ± 0	0,03 ± 2,3	0,20 ± 2,5	0,02 ± 1,8	0,36 ± 5,1	0,00 ± 2,4	0,04 ± 3	0,10 ± 1,5
		3	4,9 ± 0,2	3,1 ± 0,1	16,30 ± 0	0,03 ± 3,1	0,15 ± 1,7	0,02 ± 1,4	0,34 ± 4,3	0,01 ± 2,1	0,04 ± 0,6	0,09 ± 0,8
		6	5,4 ± 0,2	3,0 ± 0,4	27,16 ± 0,3	0,03 ± 2,5	0,13 ± 10,8	0,02 ± 1,4	0,39 ± 2,3	0,01 ± 2,6	0,04 ± 2,3	0,11 ± 0,7
80% EtOH	60	1,5	3,4 ± 0,1	4,7 ± 0,2	22,09 ± 0	-	0,05 ± 1,7	0,03 ± 1,1	0,01 ± 9,8	0,01 ± 4,3	0,01 ± 2,3	0,07 ± 2,4
	100	1,5	5,7 ± 0,0	11,5 ± 0	42,69 ± 0,5	-	0,07 ± 18,2	-	0,01 ± 0,8	0,01 ± 3,3	0,02 ± 9,2	0,08 ± 5
		3	5,2 ± 0,1	10,8 ± 0	47,32 ± 0,2	-	0,02 ± 4,7	0,02 ± 2	0,10 ± 0,5	0,01 ± 0,6	0,02 ± 2,3	0,09 ± 2,3
		6	7,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	58,20 ± 0,1	-	0,01 ± 1,8	0,03 ± 1,2	0,03 ± 9,9	0,01 ± 4,6	0,03 ± 4,1	0,12 ± 8,2
EA	60	1,5	0,5 ± 0,2	3,0 ± 0,0	0,13 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	-
	100	1,5	1,4 ± 0,1	4,1 ± 0,1	0,45 ± 1,6	-	-	-	-	-	-	-
		3	1,8 ± 1,7	5,1 ± 0,2	0,70 ± 3,5	-	-	-	-	-	-	-
		6	1,9 ± 0	4,9 ± 0,1	0,60 ± 4,3	-	-	-	-	-	-	-

(-) compuesto no identificado. QUER no identificada en ningún extracto.

**Tabla A. 14.** Extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando disolventes eutécticos mediante extracción con agitador orbital: contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y capacidad antioxidante (CA). Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 100 min; T extracción= 60 °C, t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

	TPC (mg GAE / g RSN)	TFC (mg QE /g RSN)	AC (mg TE / g RSN)
H <sub>2</sub> O	7 ± 0,1	5,5 ± 0,5	0,7 ± 4,3
70% EtOH	6,9 ± 0,1	8,6 ± 0,1	0,9 ± 0,2
ChCl:1,2B (1:3)	27,7 ± 0,6	32,3 ± 0,3	0,5 ± 0,2
ChCl:1,2B (1:4)	8,8 ± 2,3	6,2 ± 0,4	0,6 ± 0,9
Pro:1,2B (1:3)	69,2 ± 0,1	34 ± 0,2	0,4 ± 0,6
Pro:1,2B (1:4)	32,5 ± 0,2	11,8 ± 0,3	0,6 ± 0,9
Bet:1,2B (1:3)	65,6 ± 0,1	32,1 ± 0,2	0,5 ± 0,1
Bet:1,2B (1:4)	23,4 ± 0,4	11,8 ± 0,1	0,7 ± 0,6
ChCl:1,3B (1:4)	11,7 ± 4,6	9,6 ± 0	0,6 ± 1,9
ChCl:1,2P (1:4)	27,9 ± 1,8	9,2 ± 0,3	0,7 ± 1,1
Pro:1,2P (1:4)	30 ± 0,6	2,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Bet:1,2P (1:4)	35,8 ± 0	9,9 ± 0,2	0,7 ± 0,5
ChCl:Gli (1:4)	34,2 ± 1,5	3,9 ± 2,3	0,6 ± 1,4
Pro:Gli (1:4)	41,9 ± 1,5	3,4 ± 2,3	0,4 ± 1,1
Bet:Gli (1:4)	87,9 ± 0,6	4,7 ± 0,4	0,6 ± 1,6

**Tabla A. 15.** Extracción de compuestos fenólicos de RSN utilizando disolventes eutécticos mediante extracción con agitador orbital: cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 100 min; T extracción= 60 °C, t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

	HPLC (mg/g RSN ± RDS%)									
	HESP	NAR	CAT	RUT	QUER	AG	ACaf	ApC	AF	AP
H <sub>2</sub> O	15,75 ± 0	-	0,2 ± 2,3	0,12 ± 0,5	0,24 ± 0	0,81 ± 0,1	0,07 ± 0,2	0,2 ± 0	0,1 ± 0,5	0,12 ± 1
70% EtOH	32,9 ± 0,2	-	0,21 ± 0,4	0,11 ± 0,5	0,24 ± 0	0,94 ± 0	0,07 ± 0,3	0,21 ± 0,1	0,08 ± 0,3	0,11 ± 0,5
ChCl:1,2B (1:3)	51,23 ± 0,2	-	0,21 ± 0,6	0,12 ± 1,1	0,26 ± 0	0,99 ± 1,1	0,07 ± 0,2	0,21 ± 0,1	0,07 ± 1,9	0,1 ± 0,4
ChCl:1,2B (1:4)	28,32 ± 0	-	0,19 ± 2,6	0,11 ± 0,2	0,24 ± 0,1	0,96 ± 0,3	0,07 ± 0,1	0,19 ± 0	0,08 ± 0,4	0,09 ± 0,4
Pro:1,2B (1:3)	53,46 ± 0,1	-	0,24 ± 2,4	0,1 ± 0,8	0,24 ± 0,1	0,93 ± 0,3	0,07 ± 0,1	0,19 ± 0,2	0,07 ± 0,7	0,09 ± 5,9
Pro:1,2B (1:4)	94,15 ± 0,1	-	0,19 ± 0,9	0,13 ± 0,5	0,24 ± 0	1,67 ± 0,5	0,07 ± 0	0,34 ± 0	0,11 ± 0,5	-
Bet:1,2B (1:3)	73,99 ± 0	-	0,27 ± 0,7	0,12 ± 0,9	0,24 ± 0,2	1,16 ± 0,2	0,07 ± 0,1	0,26 ± 0,1	0,07 ± 0,3	0,1 ± 0,6
Bet:1,2B (1:4)	136,52 ± 0	-	0,4 ± 0,7	0,16 ± 0,9	0,24 ± 0,2	2,16 ± 0,2	0,07 ± 0,1	0,47 ± 0,1	0,12 ± 0,3	-
ChCl:1,3B (1:4)	47,31 ± 0,1	0,01 ± 1,0	0,2 ± 1,5	0,12 ± 0,3	0,24 ± 0,1	0,8 ± 0,3	0,07 ± 0	0,14 ± 0	0,25 ± 0,1	-
ChCl:1,2P (1:4)	36,91 ± 1	0,01 ± 0	0,12 ± 1,4	0,11 ± 0,4	0,24 ± 0	0,63 ± 0,1	0,07 ± 0,1	0,11 ± 2,3	0,07 ± 7,1	-
Pro:1,2P (1:4)	42,48 ± 0	-	0,1 ± 0	0,09 ± 1,1	0,24 ± 0	0,51 ± 0,1	0,07 ± 0,6	0,08 ± 1	0,06 ± 0,3	-
Bet:1,2P (1:4)	47,49 ± 0	-	0,14 ± 1,2	0,1 ± 0,5	0,24 ± 0,2	0,57 ± 0,1	0,07 ± 0,2	0,1 ± 0,5	0,07 ± 0,2	-
ChCl:Gli (1:4)	32,1 ± 0	0,02 ± 1,6	0,18 ± 6,1	0,13 ± 0,6	0,24 ± 0,1	0,53 ± 0,4	0,07 ± 0	0,12 ± 0,1	0,16 ± 0,1	0,12 ± 0,4
Pro:Gli (1:4)	26,83 ± 0	0,04 ± 0	0,12 ± 2,7	0,1 ± 0,4	0,24 ± 0	0,37 ± 0,1	0,08 ± 0	0,09 ± 0,4	0,12 ± 0,4	0,09 ± 0,1
Bet:Gli (1:4)	46,73 ± 0,1	0,02 ± 2,9	0,22 ± 2,2	0,15 ± 1,2	0,24 ± 0	0,65 ± 1,1	0,08 ± 0	0,14 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,12 ± 0,1

(-) compuesto no identificado.

**Tabla A. 16.** Cuantificación por HPLC de la optimización de la extracción asistida por ultrasonidos utilizando 70% EtOH y Bet:1,2B (1:4) como disolventes. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; P= 10, 20, 50 W; t extracción= 3, 6, 9 min; T extracción  $\approx$  70 °C, t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

	P (W)	t (min)	HPLC (mg/g RSN $\pm$ RDS%)									
			HESP	NAR	CAT	RUT	QUER	GA	CafA	p-CuA	FA	AP
70% EtOH	10	3	56,8 $\pm$ 0	-	0,2 $\pm$ 1,5	0,1 $\pm$ 1,4	0,2 $\pm$ 0	0,8 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,5
		6	83,4 $\pm$ 0	-	0,3 $\pm$ 1,2	0,1 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,5
		9	62,7 $\pm$ 0	-	0,2 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,8	0,2 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0	0,2 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,8
	20	3	30,5 $\pm$ 0	-	0,2 $\pm$ 1,4	0,1 $\pm$ 1	0,2 $\pm$ 0	0,3 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,5	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,3
		6	41,7 $\pm$ 0	-	0,1 $\pm$ 1,9	0,1 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0	0,4 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,3
	50	3	30,1 $\pm$ 0	-	0,1 $\pm$ 1,6	0,1 $\pm$ 0,8	0,2 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 1,4	0 $\pm$ 0,9
Bet:1,2-B (1:4)	10	3	88,8 $\pm$ 0	-	0,2 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,9	0,3 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0	0,1 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1
		6	96,4 $\pm$ 0	-	0,2 $\pm$ 0,7	0,1 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0	0,6 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0	0,1 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 1,5
		9	116,4 $\pm$ 0	-	0,2 $\pm$ 1,6	0,1 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0	0,6 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 1,2
	20	3	99,1 $\pm$ 0	0,1 $\pm$ 1,5	0,1 $\pm$ 4,7	0,1 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 1,2	0,1 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,6
		6	130,7 $\pm$ 0	0,1 $\pm$ 5,4	0,1 $\pm$ 11	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0	0,2 $\pm$ 0,8	0,1 $\pm$ 3,2	0,1 $\pm$ 8,4	0,2 $\pm$ 0,5	0,1 $\pm$ 2,1
	50	3	123 $\pm$ 0	0 $\pm$ 6	0,2 $\pm$ 1,4	0,1 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0	0,6 $\pm$ 0,7	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,8

(-) compuesto no identificado.

**Tabla A. 17.** Cuantificación por HPLC de la optimización de la extracción asistida por microondas utilizando 70% EtOH y Bet:1,2B (1:4) como disolventes. Condiciones experimentales: relación D:M= 10; t extracción= 3, 6, 9 min; T= 60, 100 °C, t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

	T (°C)	t (min)	HPLC (mg/g RSN ± RDS%)									
			HESP	NAR	CAT	RUT	QUER	GA	CafA	p-CuA	FA	PRO
EtOH	60	3	23,7 ± 0	-	0,1 ± 0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0	0,3 ± 1	0,1 ± 0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,3	0,1 ± 0,5
		6	27 ± 0	-	0,1 ± 0	0,1 ± 0,3	0,2 ± 0	0,2 ± 0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0	0,1 ± 0,5	0,1 ± 0,5
		9	18,5 ± 0,5	-	0,1 ± 0,5	0,1 ± 0,5	0,2 ± 0	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0	0,1 ± 0,2	0,1 ± 1,2	0,1 ± 20,7
	100	3	40,4 ± 0,1	-	0,2 ± 0	0,1 ± 0,5	0,2 ± 0	0,4 ± 0	0,1 ± 0,3	0,2 ± 1,7	0,1 ± 0,6	0,1 ± 0,3
		6	55,6 ± 0	-	0,1 ± 1,7	0,1 ± 0,7	0,2 ± 0	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,4	0,1 ± 0,9
		9	32,2 ± 0	-	0,1 ± 0	0,1 ± 1	0,2 ± 0	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0	0,1 ± 1	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,4
Bet:1,2-B (1:4)	60	3	8,4 ± 0,2	-	0 ± 1,9	0,1 ± 1,6	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0	0,1 ± 0,2	0 ± 0,1	-
		6	13 ± 0,1	-	0 ± 2,8	0,1 ± 0,8	0,2 ± 0	0,2 ± 0,1	-	0,1 ± 1,1	0,1 ± 0,3	0,1 ± 73,7
		9	16,4 ± 0,1	-	0 ± 0,5	0,1 ± 2,9	0,2 ± 0	0 ± 0,2	0,1 ± 0	0,1 ± 0,4	0,1 ± 0,1	0 ± 0,1
	100	3	88,4 ± 0,2	-	0,1 ± 2,3	0,1 ± 2	-	0,1 ± 0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,5	-
		6	41 ± 0,1	-	0,1 ± 3,1	0,1 ± 1,3	-	-	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,6	-
		9	33,8 ± 0,5	-	0,1 ± 3,5	0,1 ± 2	-	-	0,1 ± 0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,4	-

(-) compuesto no identificado.

**Tabla A. 18.** Extracción de RSN utilizando biodisolventes (2MeTHF, CPME, EL, DMI, CYR, GVL) mediante extracción con agitador orbital (EAO), extracción asistida por sonda de ultrasonidos (EASU) y extracción asistida por microondas (EAM). Contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y capacidad antioxidante (CA). Condiciones experimentales: relación D:M= 10. EAO: t extracción= 30 min; T extracción= 60 °C, Agitación: 900 rpm. EASU: t extracción= 6min; P =10 W. EAM: t extracción= 6 min; T= 100 °C, t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

		TPC (mg GAE/ g RSN)	TFC (mg QE / g RSN)	CA (mg TE/ g RSN)
EAO	2MeTHF	2,3±0,3	18,7±0	0±0
	CPME	0,3±2	8,3±4,8	0±0
	EL	4,1±0,4	10,7±0,2	0,6±0,2
	DMI	2,6±0,3	10,5±0,1	0,3±0,3
	CYR	20,2±0,3	10,4±0	0,8±1,1
	GVL	2,3±0,1	27,6±0,2	0,5±1,1
EASU	2MeTHF	3,4±0,1	17,4±0,2	0±0
	CPME	0,2±6,3	6,2±0,2	0,3±0,2
	EL	5,6±0	8±0	1,2±0,2
	DMI	5,5±0,1	10±0,1	1,4±0,2
	CYR	31,1±0,2	13,7±0,2	1,3±0,1
	GVL	5,8±1,1	29,4±0,3	1,9±0,2
EAM	2MeTHF	3±0	18,6±0,3	0,2±1,3
	CPME	0,4±0,9	7,8±1,6	0,1±0,4
	EL	5,3±0,1	8,9±0,2	0,4±0,4
	DMI	4,6±0,1	8,9±0,1	0,2±0,7
	CYR	28,3±2	12,4±0,1	0,7±0,2
	GVL	25,6±0,1	12,6±0	1,3±0,2

**Tabla A. 19.** Extracción de RSN utilizando biodisolventes (2MeTHF, CPME, EL, DMI, CYR, GVL) mediante extracción con agitador orbital (EAO), extracción asistida por sonda de ultrasonidos (EASU) y extracción asistida por microondas (EAM). Cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD y cuantificación de azúcares mediante HPLC-RI. Condiciones experimentales: relación D:M= 10. EAO: t extracción= 30 min; T extracción= 60 °C, Agitación: 900 rpm. EASU: t extracción= 6min; P =10 W. EAM: t extracción= 6 min; T= 100 °C, t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

		HPLC (mg/g RSN ± RDS%)												
		HESP	NAR	CAT	RUT	QUER	AG	ACaf	ApC	AF	AP	SAC	GLU	FRU
EAO	2MeTHF	0,5±0,7	0±8,7	-	-	-	0,2±0	-	0,0±14	0,0±3,7	-	-	-	-
	CPME	0,4±0,0	0±3,2	0±4,1	-	0±12,8	-	0±0,3	0±0,8	0±0,8	0,0±0,2	-	3,6±8,6	7,8±1,6
	EL	9,2±2,8	1,0±3,6	0,0±3	0,0±1	-	0,2±4	-	0±1	0±1	-	341,2±1,9	305,2±4,6	249,8±1,6
	DMI	13,1±1,8	-	-	0,0±3,5	-	0,1±1,7	-	-	0±2,5	0,2±2,9	151,6±2,5	228,4±2,8	210,7±1,2
	CYR	5,5±5,9	0±1,3	-	0±1,5	-	-	-	0±0,7	0±2,2	-	54,3±9,5	94±8,6	1,9±11,5
	GVL	6,6±74	0,6±2,1	0,1±4,2	0±3,1	-	0,1±2,6	-	0±3,6	0±1	-	32,9±3	67,7±2,1	21,3±3,7
EASU	2MeTHF	0,8±1,5	0,8±0,9	0±11,5	-	-	0,3±2,2	0±0,3	0±1,4	0,2±0,1	0,1±0,9	5,2±7,5	12,7±0,9	52,5±15,2
	CPME	0,7±0,4	0±2,5	0±0,6	-	0±4,3	0±1,3	0±0,2	0±0,8	0±1,5	0±0,2	0,7±5,9	3,1±1,3	4±1,3
	EL	19,2±0,2	-	0,2±3,3	0±1,5	-	0,3±5,4	-	0±0,7	0±2,7	0,2±5,7	274,2±10,3	253,2±1,9	476,9±1,1
	DMI	29,9±0,1	0,1±4,9	0,2±0,7	0,1±0,8	-	0,2±0,5	0±3	0±0,7	0,1±2,7	0,3±1,7	250,5±9,6	352,4±6,7	133,5±5,9
	CYR	19,5±0,6	-	-	-	-	-	-	0±0,9	0±0,6	-	4,1±5,2	6,7±2,8	80,3±0,6
	GVL	24,8±0,3	-	0,4±7,7	-	-	0,3±4,1	-	0±4,2	0±14,5	0,1±0,2	58±3,9	68,5±3,6	13±5,6
EAM	2MeTHF	1,2±1,9	-	0±15,4	-	-	0,3±0,3	-	0±5,3	0,2±2,1	0,1±0,2	1,6±8,7	7,1±4,6	67,4±17,7
	CPME	0,2±0,5	0±1,7	0±2,2	-	0±7,1	0±1,1	-	0±3,2	0±2,1	0±0,3	0,6±8,4	3,2±3,9	4,3±4,4
	EL	12±2,7	2,2±11,4	0,1±14	0±21,8	-	0,2±1,6	0±0	-	0±1	0,1±0,2	253,8±6,1	311,1±1,3	449,6±3
	DMI	24,7±0,1	-	-	0±1,2	-	0,2±0,8	0±0	-	0±2,6	0,2±3,2	166,1±4,3	262,8±1,6	122,1±4,8
	CYR	14,0±0,0	-	-	-	-	-	-	0±0	0±1,2	-	3,4±2,7	19,7±5,9	21,7±4,7
	GVL	17,8±1,5	2,8±0	0,3±0	0±0	-	0,2±0	0±0,3	0±5,6	0±6,1	0,1±0	8,5±3,8	50,5±4	79,5±1,9

(-) compuesto no identificado.

**Tabla A. 20.** Optimización con GVL como disolvente de la extracción asistida por sonda de ultrasonidos y microondas. Cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD y cuantificación de azúcares mediante HPLC-RI. Condiciones experimentales: relación D:M= 10. EAO. EASU: t extracción= 1,5; 3 y 6 min; P =10 y 20 W. EAM: t extracción= 1,5; 3; 6; 9 y 12 min; T= 60, 80 y 100 °C, t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

	t (min)	HPLC (mg/g RSN ± RDS%)											
		HESP	CAT	RUT	AG	ACaf	ApC	AF	AP	SAC	GLU	FRU	
EASU	1,5	8,4 ± 0,3	0,1 ± 1	0 ± 0,6	0,1 ± 0,5	0 ± 1,2	0 ± 0,8	0 ± 1,3	0,1 ± 1,1	38,3 ± 4,4	37,4 ± 2,5	20,4 ± 4,9	
	10 W	3	12,8 ± 0,2	0,2 ± 3,4	0 ± 0,2	0,2 ± 0,7	0 ± 2,9	0 ± 1,3	0 ± 2	0,1 ± 1,1	47,6 ± 0,8	68 ± 2,5	58,5 ± 2,7
		6	22,2 ± 1	0,3 ± 15,8	0 ± 1,5	0,4 ± 2,5	0 ± 4	0,1 ± 2,2	0 ± 1,7	0,1 ± 1,4	21,7 ± 1,6	82,2 ± 1	129,9 ± 0,6
	20 W	1,5	12,4 ± 0,1	0,2 ± 0,5	0 ± 1,9	0,2 ± 4	0 ± 1,5	0 ± 1,4	0 ± 1,9	0,1 ± 0,4	75,1 ± 1,6	77,6 ± 0,5	63,6 ± 1,5
		3	23 ± 1	0,3 ± 4,7	0 ± 2,2	0,3 ± 6,6	0 ± 1,1	0,1 ± 0,4	0 ± 2,3	0,1 ± 0,5	26,3 ± 2,9	83,7 ± 1,4	147 ± 0,4
		6	9,5 ± 0,3	0,1 ± 0,4	0 ± 0,7	0,1 ± 0,7	0 ± 1,4	0 ± 1,6	0 ± 0,4	0,1 ± 0,2	45,1 ± 0,9	50,5 ± 2,3	31,3 ± 4,6
EAM	80 °C	6	8,8 ± 0,2	0,1 ± 4,7	0 ± 1,4	0,2 ± 0,6	0 ± 1,9	0 ± 0	0 ± 1,2	0,1 ± 0,3	32,7 ± 1	42,2 ± 0,3	38,1 ± 4,7
		1,5	10,4 ± 0,2	0,1 ± 4,2	0 ± 2,5	0,2 ± 5,8	0 ± 2,4	0 ± 0,6	0 ± 0,6	0,1 ± 1,2	32,8 ± 2,7	37,3 ± 1,9	39,6 ± 3,6
		3	19,8 ± 0	0,2 ± 1	0 ± 1	0,3 ± 0,6	0 ± 5,3	0,1 ± 0,3	0 ± 2,3	0,1 ± 0,5	28 ± 3,5	83,9 ± 4,3	131,8 ± 2,1
	100 °C	6	12,4 ± 2,7	0,2 ± 0,3	0 ± 1,1	0,3 ± 0,4	0 ± 4,5	0 ± 1,3	0 ± 0,4	0,1 ± 0,5	51 ± 1,2	55,3 ± 0,8	70,9 ± 0,4
		9	12,9 ± 0,3	0,2 ± 10	0 ± 1,8	0,3 ± 0,7	0 ± 2,8	0 ± 0,4	0,1 ± 0,3	0,1 ± 1,1	56,4 ± 3,6	55,7 ± 2	71,2 ± 2,6
		12	13,7 ± 0,2	0,2 ± 1,2	0 ± 2,3	0,3 ± 0,4	0 ± 1	0 ± 1,5	0 ± 1,1	0,1 ± 0,1	51,7 ± 1,5	56,3 ± 1,1	80,9 ± 0,7

Naringina y quercetina no identificadas en ningún extracto.

**Tabla A. 21.** Optimización con EL como disolvente de la extracción asistida por sonda de ultrasonidos y microondas. Cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD y cuantificación de azúcares mediante HPLC-RI. Condiciones experimentales: relación D:M= 10. EASU: t extracción= 1,5; 3 y 6 min; P =10 y 20 W. EAM: t extracción= 1,5; 3; 6; 9 y 12 min; T= 60, 80 y 100 °C, t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

	t (min)	HPLC (mg/g RSN ± RDS%)												
		HESP	NAR	CAT	RUT	AG	ACaf	ApC	AF	AP	SAC	GLU	FRU	
EASU	10 W	1,5	10,1 ± 6,3	3 ± 10,4	0,1 ± 9,4	0 ± 0,7	0,3 ± 4,3	0 ± 0,4	0 ± 3,4	0 ± 1,7	0,1 ± 0,5	149,9 ± 2,6	183,1 ± 2,5	164,6 ± 2,1
		3	10,5 ± 4,3	2,9 ± 17	0,1 ± 3,8	0 ± 2	0,4 ± 0,6	0 ± 1	0 ± 10,9	0 ± 1,6	0,1 ± 0,2	262,2 ± 6,4	229,9 ± 2,1	225,2 ± 0,9
		6	15,1 ± 5,4	4,4 ± 1	0,1 ± 4,9	0 ± 8,5	0,4 ± 1,4	0 ± 0,6	0,1 ± 1,1	0 ± 0,2	0,1 ± 0,2	399,9 ± 3,7	316,7 ± 0,8	342,7 ± 2,6
		12	15,6 ± 7,9	6,3 ± 1,5	0,2 ± 4,8	0 ± 2,4	0,7 ± 1,1	0 ± 1,9	0,1 ± 0,7	0,1 ± 1	0,1 ± 1	582,5 ± 4,5	256,5 ± 4	518,1 ± 1,3
20 W	1,5	10,1 ± 3,6	2,5 ± 4,7	0 ± 13	0 ± 2,1	0,3 ± 2,2	0 ± 1	0 ± 6	0 ± 4,7	0,1 ± 1,1	247,6 ± 7,3	229 ± 1,9	225,3 ± 6	
	3	16 ± 3,2	4,7 ± 9,5	0,1 ± 1,3	0 ± 1	0,4 ± 1	0 ± 1,6	0,1 ± 1,1	0 ± 0,6	0,1 ± 0,9	361,8 ± 0,3	318,8 ± 0,5	370,8 ± 0,6	
EAM	60 °C	6	6,5 ± 4,2	2,3 ± 2,3	0 ± 1,9	0 ± 0,5	0,2 ± 0,4	0 ± 0,1	0 ± 2,7	0 ± 1,4	0,1 ± 0,5	263,9 ± 6,5	119,3 ± 1,1	106,9 ± 11,9
	80 °C	6	8,3 ± 0,9	3 ± 1,1	0,1 ± 11	0 ± 3	0,3 ± 0,1	0 ± 2,5	0 ± 1,5	0 ± 0,9	0,1 ± 0,6	289,8 ± 4,2	208,7 ± 1,3	215,6 ± 2,5
	100 °C	1,5	7,8 ± 2,3	2,5 ± 6,2	0,1 ± 2,5	0 ± 1,9	0,3 ± 2,8	0 ± 1,8	0 ± 2,4	0 ± 4,4	0,1 ± 0,2	227,8 ± 5,9	145,4 ± 0,6	166,6 ± 1,1
		3	9,1 ± 5,1	3,1 ± 4,8	0,1 ± 3,8	0 ± 6	0,3 ± 2	0 ± 0,8	0 ± 2,7	0 ± 1,2	0,1 ± 0,2	211,9 ± 3,5	160,6 ± 4,9	185,5 ± 4,8
		6	7,6 ± 74,1	3,5 ± 1,4	0,1 ± 1,9	0 ± 1,2	0,4 ± 0,4	0 ± 2,9	0 ± 0,6	0 ± 2	0,1 ± 0,8	307,7 ± 2,9	236,7 ± 1,9	319,9 ± 1,4
		9	10,3 ± 1,7	3,6 ± 3,3	0,1 ± 7,3	0 ± 1	0,4 ± 0,2	0 ± 3,9	0 ± 4,9	0 ± 3,9	0,1 ± 0,9	257,1 ± 2,8	268,6 ± 4	327,3 ± 2,9
12	11,4 ± 1,8	3,8 ± 6,8	0,1 ± 2,1	0 ± 1,8	0,5 ± 2,3	0 ± 9	0,1 ± 3	0 ± 0,3	0,1 ± 0,4	341,1 ± 5,8	252,9 ± 2,2	352,2 ± 0,7		

Quercetina no identificada en ningún extracto.

**Tabla A. 22.** Valorización del RSN a través de extracción en cascada. Etapa 1: Extracción asistida por sonda de ultrasonidos con EL como disolvente. Etapa 2: extracción asistida por ultrasonidos con GVL como disolvente. Condiciones experimentales Etapa 1 y 2: relación D:M= 10. EASU: t extracción= 6 min; P =10 W, t centrifugación (4200 rpm) = 10 min.

	HPLC (mg/g RSN ± RDS%)												
	HESP	NAR	CAT	RUT	QUER	AG	ACaf	ApC	AF	AP	SAC	GLU	FRU
Etapa 1	26,7 ± 0,1	-	0,3 ± 1,1	0 ± 1,8	-	0,4 ± 0,6	0 ± 1,1	0,1 ± 1,7	0 ± 5,2	0,2 ± 1,3	21,9 ± 4	76,5 ± 6	147,7 ± 0,4
Etapa 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	386,2 ± 0,3	202,5 ± 3,5	252,6 ± 2,1

(-) compuesto no cuantificable.

# Contribuciones científicas

## Artículos científicos

1. B. Sáenz de Miera, R. Cañadas, R. Santiago, I. Díaz, M. González-Miquel, E.J. González, A pathway to improve detoxification processes by selective extraction of phenols and sugars from aqueous media using sustainable solvents, *Sep. Purif. Technol.* 299 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.121675>.



A pathway to improve detoxification processes by selective extraction of phenols and sugars from aqueous media using sustainable solvents

Blanca Sáenz de Miera <sup>a</sup>, Raquel Cañadas <sup>a</sup>, Rubén Santiago <sup>a,b</sup>, Ismael Díaz <sup>a</sup>, María González-Miquel <sup>a</sup>, Emilio J. González <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Dpto. Ingeniería Química Industrial y del Medio Ambiente, ETSI Industriales, Universidad Politécnica de Madrid, C/ José Gutiérrez Abascal 2, Madrid 28006, Spain  
<sup>b</sup> Departamento de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid 28049, Spain





2. B. Sáenz de Miera, R. Cañadas, M. González-Miquel, E.J. González, Recovery of Phenolic Compounds from Orange Peel Waste by Conventional and Assisted Extraction Techniques Using Sustainable Solvents, *Front. Biosci.* 15 (2023) 30. <https://doi.org/10.31083/j.fbe1504030>.



*Front. Biosci. (Elite Ed)* 2023; 15(4): 30  
<https://doi.org/10.31083/j.fbe1504030>

Original Research

## Recovery of Phenolic Compounds from Orange Peel Waste by Conventional and Assisted Extraction Techniques Using Sustainable Solvents

Blanca Sáenz de Miera <sup>1</sup> , Raquel Cañadas <sup>2</sup> , María González-Miquel <sup>1</sup> , Emilio J. González <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Dpto. Ingeniería Química Industrial y del Medio Ambiente, ETSI Industriales, Universidad Politécnica de Madrid, 28006 Madrid, Spain

<sup>2</sup> Advanced Biofuels and Bioproducts Unit, Department of Energy, CIEMAT, 28040 Madrid, Spain

\*Correspondence: [ej.gonzalez@upm.es](mailto:ej.gonzalez@upm.es) (Emilio J. González)

Academic Editor: Vincent Courdavault

Submitted: 22 September 2023 Revised: 8 November 2023 Accepted: 16 November 2023 Published: 12 December 2023

### Contribuciones a congresos

1. Blanca Sáenz de Miera, Raquel Cañadas, Ismael Díaz, Manuel Rodríguez, María González-Miquel, Emilio J. González. Separación selectiva de inhibidores y azúcares mediante extracción líquida con disolventes sostenibles. Contribución oral. II congreso Anual Internacional de Estudiantes de Doctorado (Universidad Miguel Hernández) (3-4/02/2022).
2. Blanca Sáenz de Miera, Raquel Cañadas, Ismael Díaz, Manuel Rodríguez, María González-Miquel, Emilio J. González. Selective separation of phenolic compounds and sugars by liquid extraction with sustainable solvents. Contribución póster. 2nd European Sample preparation e-Conference (EuSP2022) (14-16/03/2022).
3. Blanca Sáenz de Miera, Rubén Santiago, Raquel Cañadas, Ismael Diaz, María González-Miquel, Emilio J. González. Selective extraction of inhibitory compounds and sugars from aqueous media using green solvents. Contribución póster. 20th International Symposium on Solubility Phenomena and Related Equilibrium Processes (04-09/09/2022).
4. Emilio J. González, Blanca Sáenz de Miera, María González-Miquel, Emilio J. González. Valorisation of orange peel waste through the extraction of phenolic compounds and sugars using bio-based solvents and assisted extraction techniques. 5-CIAB Iberoamerican Congress on Biorefineries, Jaén (2-4/10/024) - Aceptada como póster.
5. Blanca Sáenz de Miera, María González-Miquel, Emilio J. González. Natural eutectic solvents and assisted extraction techniques for orange peel waste valorization through the extraction of antioxidants. XI Congreso Internacional de Química, Bioquímica e Ingeniería Química, La Habana (4-4/11/024) - Aceptada como póster.