



**UNIVERSIDAD
DE BURGOS**

FACULTAD DE CIENCIAS

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

TRABAJO FIN DE GRADO

CURSO 2022-2023

Estudio de la extracción de compuestos fenólicos de residuos de agrarios de mazorca de maíz mediante la metodología de superficie de respuesta

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos

Área de ingeniería Química

Tutoras: Beatriz Blanco Alcalde / María Olga Ruiz Pérez

Esther Fernández González

Junio 2023



**VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL
TRABAJO FIN DE GRADO** ⁽¹⁾

**GRADO EN: Ciencia y Tecnología de los Alimentos
CURSO: 2022-2023**

D/Dña. Beatriz Blanco Alcalde y María Olga Ruiz Pérez, Tutoras Académicas, informan de que la alumna Dña. Esther Fernández González, ha realizado el Trabajo Fin de Grado que lleva por título “Estudio de la extracción de compuestos fenólicos de residuos agrarios de mazorca de maíz mediante la metodología de superficie de respuesta” bajo su tutela y considera que la memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO *

(*) En caso negativo, indíquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 30 de mayo de 2023

Firmado por BLANCO ALCALDE
BEATRIZ - ***1438** el día
01/06/2023 con un certificado
emitido por AC FNMT Usuarios

Fdo.: Beatriz Blanco Alcalde

RUIZ PEREZ
MARIA
OLGA -
13130364D

Firmado
digitalmente por
RUIZ PEREZ MARIA
OLGA - 13130364D
Fecha: 2023.06.01
12:10:42 +02'00'

Fdo.: María Olga Ruiz Pérez

(1) Las memorias presentadas deberán contar con el visto bueno de los tutores. A tal efecto, **se incluirá en la contraportada este documento con la firma de los mismos.** (Regulación del reglamento interno de la facultad de ciencias para la gestión de la asignatura “Trabajo Fin de Grado” de la Facultad de Ciencias, aprobada en Junta de Facultad de 11 de febrero de 2022)



ÍNDICE

ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJECTIVES	3
3. PARTE EXPERIMENTAL	4
3.1 PRODUCTOS QUÍMICOS Y MATERIALES	4
3.2 SUBPRODUCTO DE LA MAZORCA DE MAÍZ	4
3.3 PROCESO DE EXTRACCIÓN	4
3.4 ESTUDIO DE LA SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	6
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	7
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
4.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA Y DE LA CANTIDAD DE RESIDUO	8
4.2 EFECTO DEL DISOLVENTE.....	9
4.3 EFECTO DEL CONTACTO POR ULTRASONIDOS	10
4.4 RESULTADOS DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS BOX-BEHNKEN	12
4.4.1 Efecto de las variables de operación sobre la extracción de TPC	12
4.4.2 Efecto de las variables de operación en la recuperación de p-cumárico	14
4.5 RESULTADOS DE EXTRACCIÓN EN LAS CONDICIONES ÓPTIMAS.....	17
5. CONCLUSIONES	18
6. BIBLIOGRAFIA.....	19



ABSTRACT

Corn is presently one of the most extensively cultivated cereals worldwide, resulting in significant agricultural solid residues. The corncob waste is considered a by-product due to its phenolic fraction rich in phenolic acids and flavonoids that could be substitute synthetic functional additives in various food and pharmaceutical applications. This study has been focused on investigating different extraction processes and operating conditions to recover the phenolic fraction from corncob waste, followed by an identification study to valorise the final extracts. The experiments were conducted using bath extraction with rotary agitation and ultrasound-assisted extraction. The solvent was ethanol, water, and various ethanol-water mixtures. Ultrasonication has been more effective than rotatory agitation, ensuring higher extraction yields in a much shorter contact time. The presence of kaempferol, p-coumaric acid and ethyl-ferulate has been identified in the phenolic profile of all extracts from the treatment of corncob waste with ethanol solvents. The response surface methodology with a Box-Behnken design (BBD) has been employed to analyse the combined effect of contact time, solid waste amount and ethanol fraction in the solvent on the extraction efficiency. Kinetic experiments were also performed with the optimal solvent selected from the BBD to examine maximising extraction of p-coumaric acid, kaempferol and ethyl-ferulate.

Keywords: Corncob waste, phenolic compounds, bath extraction, ultrasound-assisted extraction

1. INTRODUCCIÓN

Una de las fuentes más importantes de alimentos son los cereales y los alimentos basados en hidratos de carbono debido a su gran aporte de energía. A nivel mundial, los cultivos de cereales más importantes son el maíz, arroz y trigo. Una de las causas por las que estos alimentos sean tan importantes es debido a su disponibilidad y su bajo coste. El maíz (*Zea mays L.*) proviene de la familia de las *Gramineae*. Se trata de una de las especies de plantas más productivas y con más contenido en carbohidratos que tiene por unidad de área. A nivel mundial, el maíz es el cultivo líder del mercado, debido a su fácil adaptación a los diferentes ecosistemas que incluyen un modelo de agricultura extensiva y a las modificaciones genéticas que han ido adaptando este cereal a los diversos cultivos o climas dando como resultado un alto rendimiento. Los sectores donde mayor es su empleo es en la alimentación animal, humana y producción de energía como biofuel [1]. Estados Unidos, uno de los países con mayor producción de maíz, emplea cerca del 56% de su producción para la obtención de etanol, por lo que podemos ver cómo este cereal no solo está destinado a la alimentación humana o animal, sino que también se ha dotado de más usos. Desde un punto de vista económico, en 2019, el maíz, superó la demanda de un billón de toneladas métricas, representando un aumento de un 25% respecto a la demanda de otros cereales como el arroz y el trigo [2].

El maíz junto con el trigo, son los cereales con mayor importancia a nivel mundial. Esto supone un 35, 38 % de trigo y un 50, 94 % de maíz sobre el total de la producción de cereales. Con los datos obtenidos de La Junta de Castilla y León, se ha elaborado un gráfico (Fig. 1) en el que se compara el área de producción de los principales cultivos de 2022 expresado en hectáreas y la producción de las áreas expresadas en toneladas.

Los resultados muestran que el maíz es el 3º cereal más cultivado en Castilla y León por detrás del trigo y la cebada, siendo el cereal que tiene mayor rendimiento por producto obtenido y área sembrado. En 2022 se produjeron 1.383.132 toneladas de maíz y se emplearon 108.553 hectáreas de cultivo frente al trigo con 2.636.326 toneladas producidas y una superficie de 895.571 hectáreas y la cebada que obtuvo una producción de 2.172.972 toneladas con una superficie de 746.799 hectáreas [3].

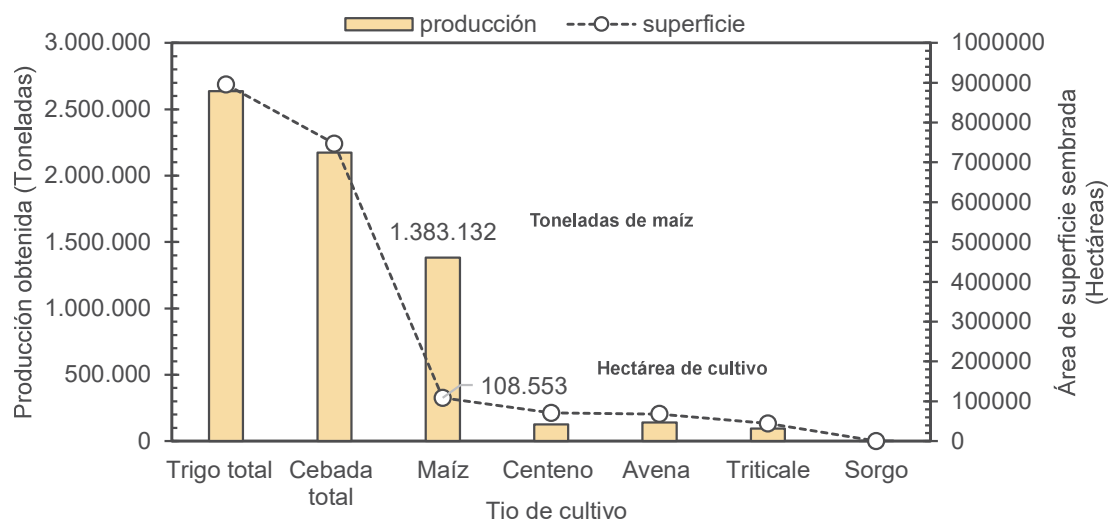


Figura 1. Estudio de la comparativa de producción de distintos cultivos en Castilla y León respecto a su área de cultivo en año 2022.

Por otro lado, centrándose en la composición química, la mazorca de maíz se divide aproximadamente en 39,1 % de celulosa; 42,1 % de hemicelulosa; 9,1 % de lignina; 1,7 % de proteína y 1,2 % de cenizas [4]. Según esta composición química, los residuos de la mazorca de maíz pueden tener un gran potencial como materia prima renovable para producir gran variedad de productos químicos tales como ácido cítrico, azúcares y etanol [5,6,7]. Sin embargo, los metabolitos secundarios de la mazorca de maíz (principalmente la fracción fenólica) siguen sin estar claros [8]. En este sentido, es necesario avanzar en el estudio de valorización de este residuo enfocado a la recuperación de la fracción fenólica, con el fin de mejorar su reutilización como materia prima en la producción de aditivos funcionales [9,10].

Los **compuestos fenólicos** son sustancias bioactivas altamente funcionales que actúan como antioxidantes naturales [9]. Engloban una gran variedad de moléculas, que van desde compuestos altamente polimerizados hasta moléculas simples con un solo anillo fenólico y un grupo carboxílico en su estructura, como los ácidos fenólicos. La principal fuente de éstos son las plantas, que los sintetizan en mayor medida como resultado del metabolismo. Entre los principales compuestos fenólicos destacan los ácidos fenólicos estilbenos, lignanos y flavonoides [10]. La capacidad antioxidante de los ácidos fenólicos y de los flavonoides es muy alta, lo que los convierte en una propiedad de gran importancia para su inclusión en nuevas formulaciones de alimentos funcionales basados en cereales o sus subproductos [10-12]. Tras una búsqueda bibliográfica se ha visto que se han aislado diversos compuestos fenólicos de interés a partir de los residuos agrarios de mazorca de maíz, entre los que se incluye el ácido p-cumárico, kaempferol y etilferulato, [8,13-17]

Para recuperar los compuestos de interés presentes en un sustrato sólido, se utiliza comúnmente una operación de extracción sólido-líquido. Las etapas implicadas en la



transferencia del soluto desde el sólido hasta el disolvente incluyen: 1) El cambio de fase del soluto desde la fase sólida hasta el disolvente que rellena los poros del sólido, 2) La difusión del soluto hasta la superficie del sólido a través del disolvente contenido en el poro y 3) La transferencia del soluto en la interfase sólido-líquido, es decir, desde la superficie del sólido hasta el seno del disolvente [18].

Respecto a la **extracción asistida por ultrasonidos** se presenta como una alternativa al proceso de extracción sólido-líquido convencional ya que va a incorporar el efecto de la cavitación provocada por la aplicación de una onda ultrasónica. Durante el proceso de ultrasonidos, el contacto entre la fase sólida y el disolvente se produce bajo la acción de una onda ultrasónica. La cavitación se trata de la formación de microburbujas por las fluctuaciones de presión dentro del disolvente. La presencia de microburbujas combinadas con presiones y temperaturas altas, van a provocar pequeñas lesiones en la pared o la membrana celular, lo que permite una mejor penetración del disolvente en el poro del sólido. Como resultado, la onda sónica va a aumentar la agitación entre las fases, así como la porosidad del sólido y la permeabilidad de la pared celular [19].

Respecto a la **elección del disolvente**, numerosos estudios avalan el uso de alcoholes, especialmente etanol y metanol, para extraer la fracción de polifenoles y antioxidantes de materiales vegetales [21-23]. Si bien el metanol es mejor que el etanol para la extracción, debemos tener en cuenta el origen, el método de extracción y las características tóxicas. Es por lo que la *Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU.* [23] recomienda el uso de disolventes como etanol, n-butanol e isopropanol.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el proceso de extracción de la fracción fenólica de residuos agrarios de mazorca de maíz utilizando como disolvente etanol, agua y sus mezclas. Se ha seleccionado la metodología de superficie de respuesta como herramienta estadística de análisis, debido a que es reconocida su gran efectividad para determinar el efecto combinado entre distintas variables de operación, así como para establecer su repercusión en el rendimiento de recuperación [24,25].

2. OBJECTIVES

The primary aim of this study was to maximise the recovery of phenolic compounds from corncob wastes. To achieve this, we used two extraction methods under different operation conditions such as contact time (1 min-30 h), working temperature (40-70 °C), and amount of solid residue in the solvent (1-10% (w/v)). The methods of extraction were bath shaking and ultrasonic extraction. In addition, a statistical study of the optimal extraction conditions was carried out in order to optimise the ultrasound-assisted extraction process. This main objective has been achieved through the following sub-objectives:

- 1- To study the bath extraction process under different operating conditions. The effect of temperature, contact time, ethanol in the solvent and solid mass on the extraction efficiency.
- 2- Comparison of the conventional bath extraction and ultrasound-assisted extraction.
- 3- Optimization study based on the response surface methodology with a Box-Behnken design in order to examine the effect of the solid mass, solvent composition and contact time on the ultrasound-assisted extraction.
- 4- Kinetic study using the previously selected operating conditions. Comparison of results to evaluate the effect of solvent and solid mass on the diffusion rate and extraction yield (mainly p-coumaric acid).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Productos químicos y materiales

Los residuos agrarios de maíz fueron proporcionados por agricultores de Saldaña (Palencia).

Durante el desarrollo experimental se emplearon los siguientes **reactivos**: Etanol absoluto (VWR Chemicals, pureza del 100 %), agua ultrapura Milli-Q, acetato de potasio (Merck, pureza 99%), cloruro de aluminio (Acros Organics, pureza 98,8%), sulfato de hierro (II) 7-hidrato (Panreac, pureza 98%), acetato de sodio (Merck, pureza 99%), ácido acético glacial (Panreac, pureza 100%), ácido clorhídrico 37% (VWR Chemicals), ácido gálico (Sigma-Aldrich, pureza 99%), Reactivo Folin-Ciocalteu (VWR Chemicals), carbonato sódico anhidro (Labkem, pureza del 99%), quercetina (Sigma-Aldrich, pureza >95%), 2,4,6-tris.2,pyridyl-s-triazine (TPTZ)(Sigma, pureza 98%), cloruro de hierro (III) 6-hidrato (Panreac, pureza 97%), acetato de amonio para HPLC (VWR Chemicals, pureza 99,2%), acetonitrilo para HPLC (Sigma-Aldrich, pureza > 99.8%). Destacar que no se llevó a cabo ningún tratamiento de purificación.

Por otra parte, se usaron diversos **equipos**: Balanza (Precisa 125 Å), secador de bandejas (EDIBON), centrífuga (Thermo scientific, ST 16 R), baño de ultrasonidos ($\pm 0,3$ ULTRASONS-H, J.P. SELECTA), baño de agitación termostataado OLS 200 ($\pm 0,1$ °C, Grant), espectrofotómetro UV-VIS (HITACHI U-2000) y HPLC con detector de diodos (Agilent 1100).

3.2 Subproducto de la mazorca de maíz

Las mazorcas se desgranaron de manera manual y se realizó una molienda con un molino SM 100 (Retsch). A continuación, se tamizó el producto molido para seleccionar la fracción correspondiente a un tamaño menor de 400 μm (Fig. 2).

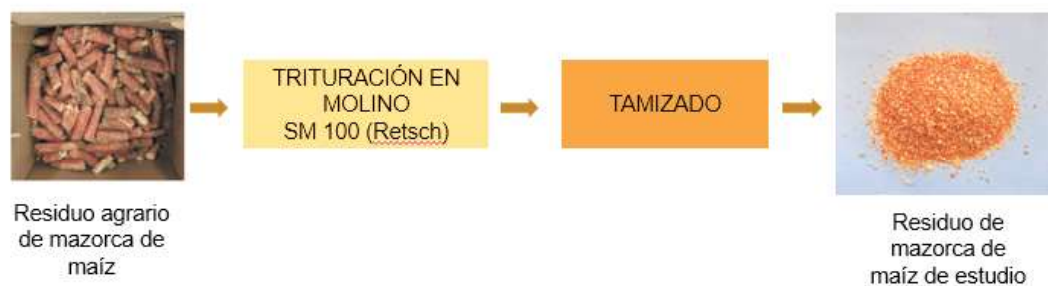


Figura 2. Esquema del proceso de extracción desde el subproducto de la mazorca de maíz, con la trituration en el molino y tamizado hasta la obtención de un polvo fino que se empleó como matriz de estudio.

3.3 Proceso de extracción

En todos los experimentos, se puso en contacto una masa conocida del residuo sólido ($1-10,0 \pm 0,1$ g) mostrado en la Fig. 2 con 100 mL de disolvente (etanol, agua y distintas mezclas de ambos).

En el caso de los experimentos de **extracción convencional en baño agitado (EB)** (maceración), el equipo utilizado (Fig. 3) fue un baño con agitación rotatoria o de vaivén (OLS 200, Grant) en el que las muestras se mantuvieron a una temperatura de 40,0 o de $70,0 \pm 0,1$ °C, con una agitación de $120 \pm 0,1$ rpm durante unas 27-30 h. Se tomaron muestras en diferentes tiempos de extracción, que se filtraron para eliminar restos de

sólidos en suspensión. Todos los extractos obtenidos se analizaron para determinar el contenido de TPC (total phenolic compounds). Por último, se congelaron para su posterior análisis en HPLC.



Figura 3. Fotografía del equipo utilizado en los experimentos de extracción convencional en baño agitado.

En los experimentos de **extracción por ultrasonidos (EUS)** (Fig. 4) se empleó un homogeneizador de ultrasonidos (Vibra-Cell VCX 500, Sonics & Materials Inc, USA,) equipado con una sonda de 13 mm de diámetro y acoplado a un baño termostático ($\pm 0,3$ ULTRASONS-H, J.P. SELECTA). Todos los experimentos realizados se llevaron a cabo a 70 °C, poniendo en contacto diferentes masas de residuo de mazorca con 100 mL de disolvente. Con el fin de no sobrecalentar la muestra durante la ultrasonificación, se establecieron diferentes ciclos de funcionamiento alternos de 40 segundos (30 s ON y 10 s OFF). El tiempo de ultrasonidos efectivo máximo fue de 60-90 min (120-180 min de tiempo real). Al igual que en las extracciones en baño, se cogieron diferentes muestras a distintos tiempos y posteriormente, las muestras de extracto se trataron siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente.



Figura 4. Fotografía del equipo empleado en los experimentos de extracción asistida con ultrasonidos.



Los experimentos de extracción se han realizado por duplicado y todas las muestras se midieron por triplicado. Los resultados recogidos en este trabajo se han expresado como el valor medio \pm la desviación estándar. Se aplicó el método de LSD de Fisher con un valor $p \leq 0,05$ para confirmar las diferencias significativas. Como se ha comentado anteriormente, para el tratamiento estadístico de los datos experimentales se utilizó el programa informático Statgraphics Centurion 19 (Statistical graph Co., Rockville, MD, EE. UU).

3.4 Estudio de la superficie de respuesta

Se empleó el software Statgraphics Centurion 19 (Statistical graph Co., Rockville, MD, EE. UU.) para el tratamiento estadístico de los datos experimentales. El diseño de experimentos fue un diseño Box-Behnken (BB) combinando tres niveles de cada factor independiente (X_n). Para la parte experimental del BB, se realizaron 15 experimentos de extracción asistida por ultrasonidos a 70 °C utilizando como variables X_n : la cantidad de etanol en agua destilada (desde 50 % hasta 100 % de etanol, $X_{\text{Etanol}} = \% \text{ EtOH}$), el tiempo de contacto (desde 2 hasta 60 min, $X_{\text{tiempo}} = t_{\text{EUS}}$) y la cantidad de residuo sólido (desde 1 g hasta 7 g en 100 mL de disolvente, $X_{\text{sólido}} = \% \text{ sólido}$). Las diferencias significativas entre los diferentes extractos se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) empleando el procedimiento de modelo lineal. El efecto combinado entre variables fue analizado empleando el análisis de los gráficos de superficie de respuesta y de Pareto. Se empleó una confianza del 95% ($p \leq 0,05$) para determinar la significancia y un método de regresión no lineal para ajustar el polinomio de segundo orden a los datos experimentales de cada respuesta, así como para identificar los puntos relevantes.

Tabla 1 Experimentos de extracción asistida por ultrasonidos a 70 °C del diseño Box-Behnken para las tres variables en estudio: fracción de etanol en el disolvente (X_{etanol}), cantidad de sólido en el disolvente ($X_{\text{sólido}}$) y tiempo de contacto ($X_{\text{tiempo}} = t_{\text{EUS}}$) para el estudio.

EXPERIMENTO	X_{etanol} (%v)	$X_{\text{sólido}}$ (% p/v)	$X_{\text{tiempo}} = t_{\text{EUS}}$ (min)
E1	75	4	31
E2	50	7	31
E3	50	4	60
E4	50	1	31
E5	100	4	2
E6	100	1	31
E7	50	4	2
E8	75	4	31
E9	75	7	2
E10	100	7	31
E11	100	4	60
E12	75	7	60
E13	75	1	60
E14	75	1	2
E15	75	4	31



3.5 Métodos analíticos

La concentración de **compuestos fenólicos totales** (total phenolic compounds, TPC) fue determinada utilizando el método de Folin-Ciocalteu [26]. Este método se basa en una reacción de óxido-reducción entre el reactivo Folin-Ciocalteu y los compuestos fenólicos presentes en la muestra, en el cual el reactivo de Folin va a sufrir una oxidación al oxidar a los TPC. La reacción resulta de la formación de un complejo de color azul cuya absorbancia, leída a 750 nm, es proporcional a la cantidad de compuestos fenólicos presente en la muestra. Para realizar el análisis, se toman 100 μL del extracto obtenido por los diferentes métodos de extracción, a los cuales se agregan 2,8 mL de agua destilada, 100 μL del reactivo Folin-Ciocalteu y 2 mL de carbonato sódico (Na_2CO_3) al 7,5% p/v. La mezcla se agita y se deja reposar durante 1 hora en oscuridad, a temperatura ambiente. Posteriormente, se mide la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro HITACHI U-2000. Para el blanco se reemplazan los 100 μL de la muestra por 100 μL del disolvente utilizado para la extracción. Se utiliza ácido gálico como patrón para obtener las curvas de calibrado para cada uno de los disolventes utilizados en la etapa de extracción: Etanol, agua y sus mezclas.

Perfil de compuestos fenólicos. Para la separación, identificación y cuantificación de cada tipo de compuesto fenólico se emplea un HPLC-DAD 1110. Se emplea una columna columna Kinetex® (5 μm Biphenyl 100 Å 250 x 4,6 mm). Se utilizó como fase móvil A acetato amónico 5 mM en agua milli-Q con 1 % de ácido acético y como fase móvil B acetato amónico 5 mM en acetonitrilo con 1 % de ácido acético. El método cromatográfico consta de un gradiente de fase móvil que comprende desde 98:2 (A:B) hasta 20:80 (A:B) durante los 90 minutos del análisis. El flujo es de 0,8 mL/min, la temperatura de operación de 25 °C y longitudes de onda de 280 nm, 330 nm, 350 nm y 370 nm. Las muestras se filtraron previamente a su análisis por HPLC con filtros de jeringa de polipropileno de 0,22 μm de tamaño de poro (Filter-LAB®). La cuantificación se llevó a cabo mediante curvas de calibrado a partir de los patrones de ácido p-cumárico, kaempferol y etil ferulato. Los diferentes picos se identificaron por el tiempo de retención y la comparación de los espectros de UV-VIS con los compuestos comerciales.

La capacidad reductora de los extractos se determinó mediante el método FRAP [27]. Se basa en la reacción de transferencia de un electrón entre un antioxidante y el radical libre (La capacidad del reactivo TPTZ para reducir el ión Fe^{3+} a Fe^{2+}). Esta reducción provoca la formación de un color violeta en la muestra, cuya absorbancia se puede medir espectrofotométricamente y es proporcional a su capacidad reductora. Para realizar este método, se toman 30 μL de muestra (Con diluciones 1:10) y se mezclan con 970 μL de reactivo TPTZ recién preparado. Para preparar el reactivo TPTZ, se agrega ácido acético 0,3 M a acetato de sodio 0,3 M hasta alcanzar un pH de 3,6. Luego se añade FeCl_3 20 mM reciente (FeCl_3 6-hidrato y agua Milli-Q), TPTZ 10 mM reciente (TPTZ en HCl 40 mM) y agua Milli-Q. Después de la mezcla, se incubó la muestra a 37 °C durante media hora en un baño termostático (Ultraterm, P SELECTA). Posteriormente, se mide la absorbancia espectrofotométrica en el espectrofotómetro (HITACHI U-2000) a una longitud de onda de 593 nm, utilizando tampón de acetato sódico pH 3,6 como autozero y el blanco como reactivo TPTZ incubado, pero sin la muestra. La cuantificación se realiza con una curva de calibrado utilizando sulfato de hierro II como patrón.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los apartados 4.1 y 4.2 se recogen los resultados obtenidos en los experimentos de extracción en baños agitados (EB) realizados variando la cantidad de sólido (1-9,6 g en

100 mL de disolvente), el tiempo de contacto (5 min–26 h), el porcentaje de etanol en el disolvente (50–100 %etanol) y la temperatura de operación (40 y 70 °C). Estos experimentos iniciales han permitido estudiar el efecto de estas variables sobre la eficacia de recuperación de la fracción fenólica del residuo agrario de mazorca de maíz.

Se ha realizado dos experimentos: uno de extracción en baño con agitación rotatoria y otro de extracción asistida con ultrasonidos (EUS) utilizando las mismas condiciones de operación: 70 °C, 100 mL de disolvente con un 70% de etanol y 5 g de residuo sólido (5 %p/v de sólido en el extractor). Los resultados se presentan en el apartado 4.3. El objetivo de este estudio fue comparar si la EUS resulta ser más efectiva que la extracción convencional con agitación rotatoria.

Posteriormente, en los apartados 4.4 y 4.5 se discuten los resultados obtenidos a partir de los 15 experimentos de EUS a 70 °C del diseño de experimentos Box-Behnken. El objetivo principal de esta parte del estudio ha sido evaluar, mediante la metodología de superficie, el efecto de las variables carga de sólido, porcentaje de etanol y tiempo de contacto, así como estudiar la posibilidad de maximizar la recuperación de la fracción de p-cumárico, kaempferol y etilferulato.

4.1 Efecto de la temperatura y de la cantidad de residuo

En la Fig. 5 (A) se muestran los resultados de extracción de TPC a distintos tiempos de contacto para un proceso EB a 40 °C y a 70 °C, con 5 %p/v de sólido y un 70% de etanol en el disolvente.

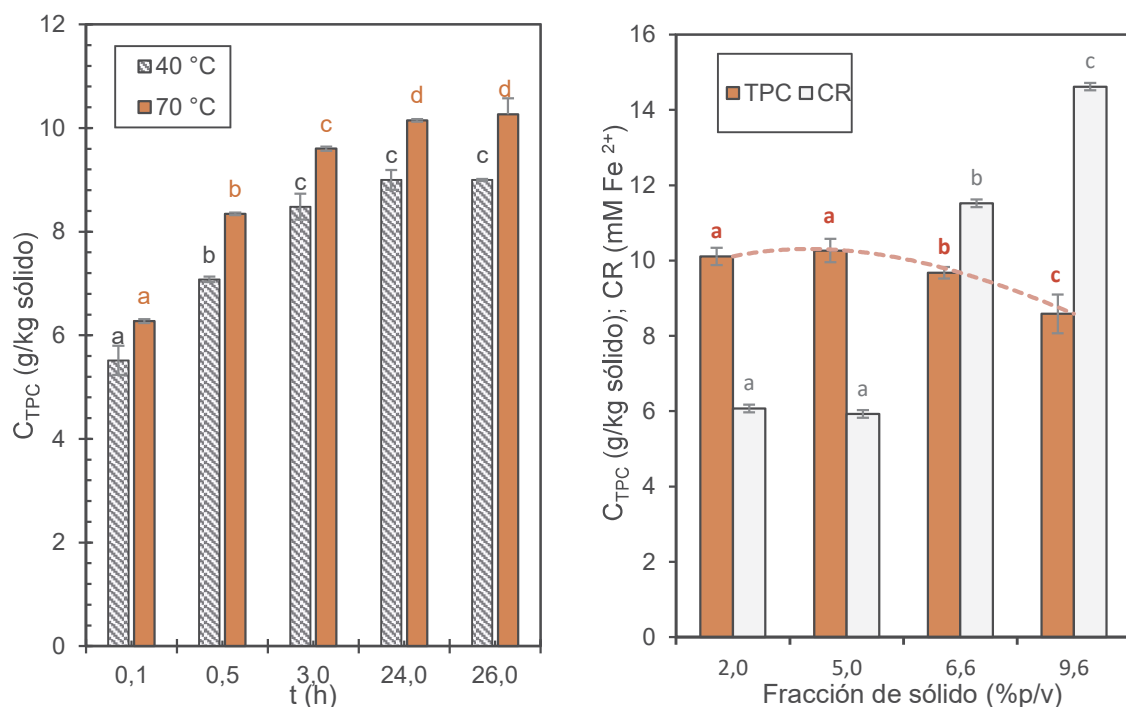


Figura 5. Resultados de la extracción de compuestos fenólicos totales (TPC) del residuo de mazorca de maíz para un proceso de extracción en baños agitados (EB) utilizando un disolvente con un 70% de etanol. **(A)** Efecto de la temperatura (40 °C o 70 °C) y del tiempo de contacto (0,1–26 h) utilizando 5 %p/v de sólido. **(B)** Efecto de la cantidad de sólido (2–9,6 %p/v) a las 26 h de contacto con una temperatura de operación de 70 °C. Los valores con distintas letras para el componente indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En la Fig. 5 (A) se observa que, desde los primeros minutos, la extracción de TPC es significativamente mayor a 70 °C respecto a la de 40 °C. Este resultado indica que la velocidad de difusión de la fracción fenólica desde el sólido al disolvente se ve favorecida por el aumento de temperatura de 40 a 70 °C, probablemente debido al aumento de la solubilidad de estos solutos en el etanol, así como a la reducción de la viscosidad del disolvente [28]. Este resultado justifica que el aumento de temperatura es una variable de operación favorable en el proceso de extracción de TPC. Sin embargo, se selecciona una temperatura máxima de 70 °C para evitar posibles efectos de pérdidas de disolvente por cambio de fase.

La Fig. 5 (B) muestra el efecto de la cantidad de residuo de mazorca de maíz sobre el rendimiento de la extracción de TPC. Estos resultados se han obtenido a partir de 4 experimentos de extracción EB a 70 °C, con un 70% etanol en el disolvente y después de un tiempo de contacto de 26 h. En la Fig. 5 (B) se observa que no se consigue aumentar el contenido de TPC en el extracto al aumentar la cantidad de sólido. Una proporción de 2 y 5 %p/v produce extractos con mayor cantidad de TPC que cuando se emplean concentraciones superiores a 6,6 %p/v. Así, estos resultados parecen sugerir que esta variable de operación tiene un efecto negativo en la recuperación de TPC del residuo en estudio. Sin embargo, el análisis FRAP mostró que la capacidad reductora tiene un efecto contrario al de recuperación de TPC. Esta controversia entre resultados sugiere un cambio de concentración de los distintos compuestos fenólicos en los extractos, siendo requerido un análisis del perfil de fenólicos para poder establecer una estimación más adecuada de su repercusión en la capacidad reductora del extracto final.

4.2 Efecto del disolvente

Para estudiar el efecto del disolvente (agua, etanol y sus mezclas) se llevó a cabo una secuencia de experimentos EB a 70 °C con un 5 %p/v de sólido. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Fig .6.

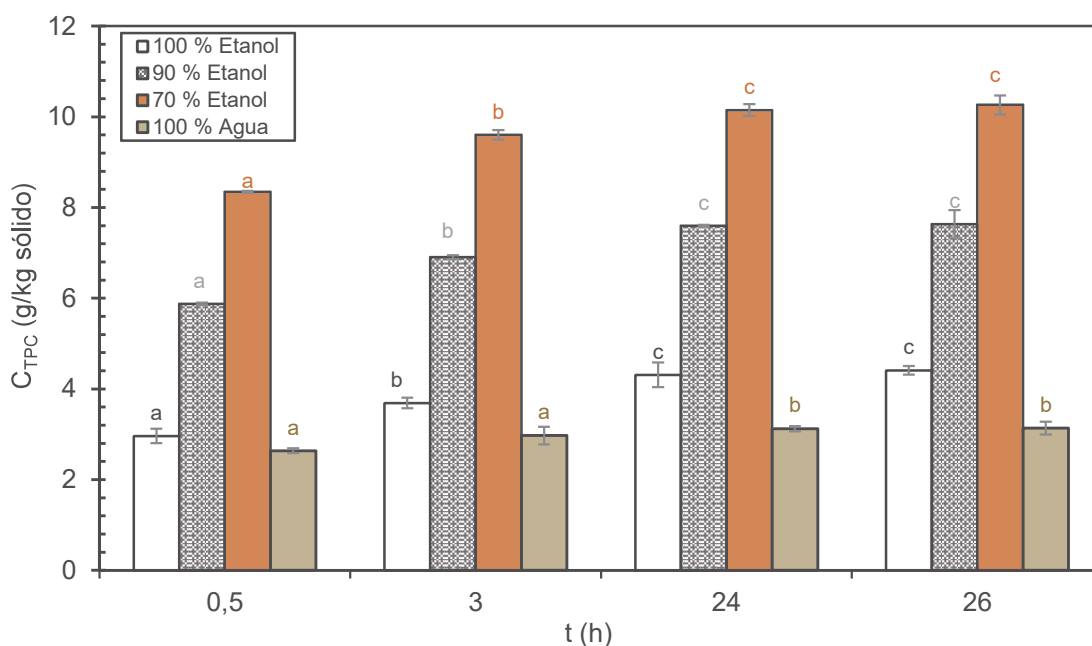
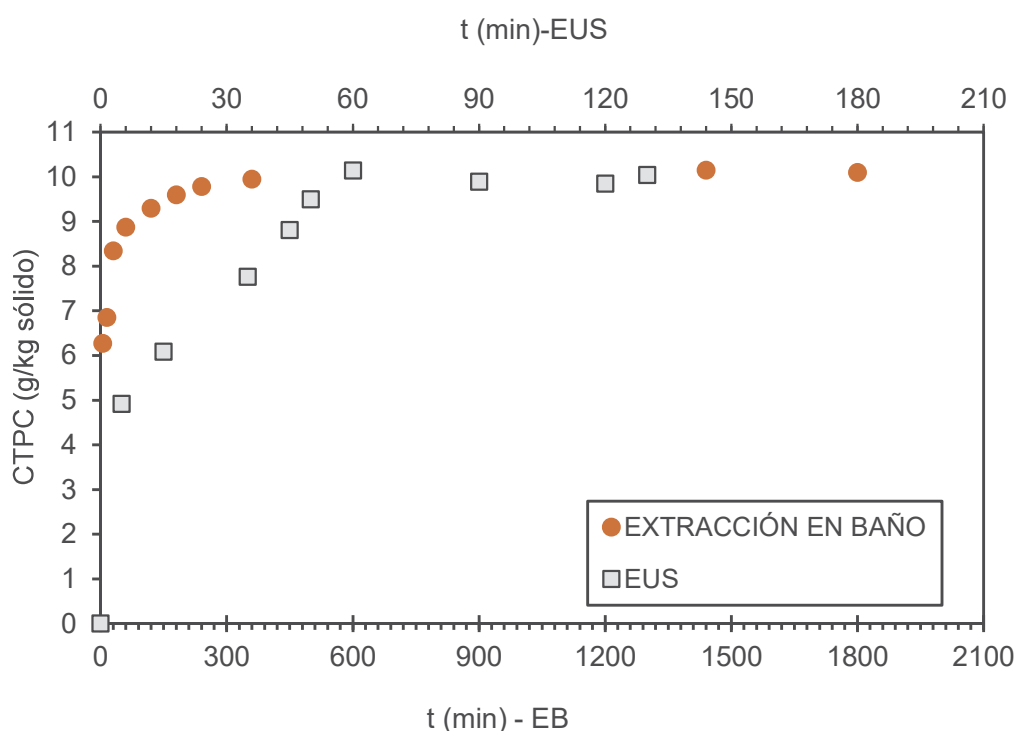


Figura 6. Resultados de los experimentos de extracción en baños agitados (EB) 70 °C, con un 5 %p/v y distintos disolventes. Los valores con distintas letras para el componente indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Se observa en la Fig. 6 que la mayor parte de la extracción tiene lugar con un tiempo de contacto de unos 30 min, alcanzándose una cantidad de TPC de aproximadamente 70-90% de la cantidad recuperada con un tiempo de contacto de 26 h. Por otra parte, la extracción de TPC del residuo de maíz fue considerablemente mayor para las mezclas etanol-agua que cuando se utilizaron los disolventes puros, proporcionando los valores más altos de extracción el disolvente con un 70% de etanol. Estos resultados se han podido contrastar bibliográficamente puesto que al emplear mezclas etanol-agua se crea una cierta polaridad en el disolvente que mejora la extracción de los ácidos fenólicos de matrices naturales [29, 30]. Los resultados sugieren que las mezclas de etanol y agua son disolventes adecuados para la extracción de la fracción fenólica de los residuos de mazorca de maíz debido a la diferente polaridad de ambos disolventes que mejora el rendimiento de recuperación, la posibilidad de mezclarlos en cualquier proporción y su aceptabilidad para el consumo humano.

4.3 Efecto del contacto por ultrasonidos

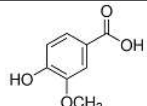

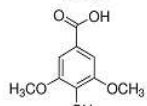

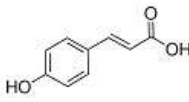

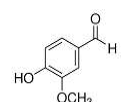

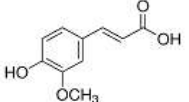

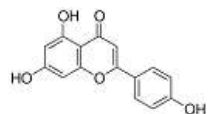
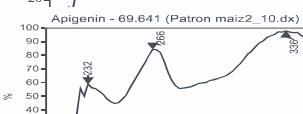
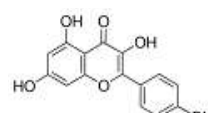
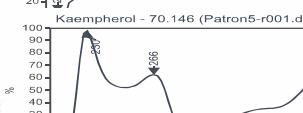
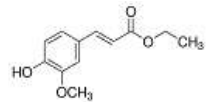

El objetivo de este estudio ha sido analizar si la extracción asistida con ultrasonidos (EUS) resulta ser más efectiva que la extracción EB. En la Fig. 7 se muestran los resultados de extracción de TPC para un proceso EB y EUS a 70 °C con un 5 %p/v de residuo de maíz y un 70% de etanol en el disolvente. Se observa que la cinética de extracción de TPC mediante EUS y EB llegan al mismo valor máximo de TPC recuperado en el extracto (10,04 g/kg sólido para EUS y 10,10 g/kg sólido para EB), con la diferencia que en la extracción con ultrasonidos se requiere un tiempo de contacto mucho menor que el que se necesita en baños con agitación rotatoria (aproximadamente 130 minutos para EUS y unos 1.800 minutos para EB).





En la Tabla 2 se recogen los resultados de identificación de compuestos fenólicos y flavonoides presentes en los extractos finales del residuo de mazorca de maíz. Se han identificado en ambos extractos la presencia de p-cumárico, kaempferol y etilferulato, compuestos fenólicos que han sido identificados bibliográficamente en diversos extractos de distintas clases de mazorca de maíz [13-17]. Además, se observa en la Tabla 2 que estos extractos de mazorca de maíz presentan en su composición otros ácidos fenólicos tales como el ácido vainillínico, ácido siríngico, y ácido ferúlico, que según indican numerosos estudios poseen una elevada capacidad reductora [8, 13-17]. Por otra parte, también se han encontrado flavonas como la apigenina, que al igual que el kaempferol son compuestos fenólicos valiosos que presentan capacidad antiinflamatoria [30] y antioxidante [31].

Tabla 2. Compuestos identificados en el extracto EB y EUS a partir de residuos de mazorca de maíz con el método de HPLC.

COMPUESTO	EB	EUS	TIEMPO RETENCIÓN (min)	ESTRUCTURA	ESPECTRO (210-400 NM)
ÁCIDO VANILLÍNICO	n.d.	d	25.5		
ÁCIDO SIRÍNGICO	d	d	30.9		
ÁCIDO P-CUMÁRICO	d	d	39.9		
VANILLINA	d	d	41.1		
ÁCIDO FERÚLICO	d	d	49.6		
APIGENINA	d	d	69.6		
KAEMPFEROL	d	d	70.1		
ETIL FERULATO	d	d	71.1		

*No detectado (n.d) / detectado (d)



4.4 Resultados del diseño de experimentos Box-Behnken

En la Tabla 3 se recogen los resultados experimentales de extracción obtenidos para los experimentos EUS a 70 °C del diseño Box-Behnken (Tabla 1) llevados a cabo con distinta fracción de etanol en el disolvente (X_{Etanol}), tiempo de contacto ($X_{\text{tiempo}}=t_{\text{EUS}}$) y cantidad de sólido ($X_s= \%p/v$ de sólido). Además, se hizo la suma de los compuestos fenólicos (P_i).

Tabla 3 Resultados de los experimentos EUS generados mediante el diseño de experimentos Box-Behnken para la extracción de TPC y de los compuestos fenólicos (P_i) de la Tabla 2.

EXPERIMENTO	C_{TPC} EXPERIMENTAL (g/kg sólido)	ÁCIDO P-CUMÁRICO (mg/kg sólido)	SUMA DE P_i DE LA TABLA 2 (mg/kg sólido)
E1	8,2 ± 0,2	15,665 ± 0,017	198,781 ± 0,089
E2	7,02 ± 0,6	31,352 ± 0,017	467,559 ± 0,087
E3	8,5 ± 0,7	67,350 ± 0,012	417,723 ± 0,099
E4	11,0 ± 0,2	6,006 ± 0,027	92,45 ± 0,02
E5	3,0 ± 0,5	n.d	13,531 ± 0,078
E6	5,57 ± 0,08	1,616 ± 0,025	17,510 ± 0,045
E7	7,1 ± 0,6	n.d	171,699 ± 0,021
E8	8,3 ± 0,5	15,224 ± 0,030	199,982 ± 0,055
E9	4,7 ± 0,3	7,184 ± 0,024	396,640 ± 0,047
E10	3,5 ± 0,2	6,816 ± 0,052	56,204 ± 0,078
E11	4,8 ± 0,5	7,201 ± 0,027	43,387 ± 0,014
E12	8,1 ± 0,3	63,173 ± 0,047	635,5487 ± 0,015
E13	10,2 ± 0,4	17,878 ± 0,088	52,759 ± 0,011
E14	8,33 ± 0,08	1,718 ± 0,029	39,060 ± 0,022
E15	8,22 ± 0,05	16,977 ± 0,025	210,684 ± 0,089

*No detectado (n.d.)

4.4.1 Efecto de las variables de operación sobre la extracción de TPC

Con los datos obtenidos, se obtiene la ecuación polinómica de segundo orden (Ec. 1) que predice el diseño BB para la extracción de TPC:

$$C_{\text{TPC}} = 2,517 + 0,296 \cdot x_{\text{etanol}} - 1,336 \cdot x_s + 0,0556 \cdot t_{\text{EUS}} - 0,003 \cdot x_{\text{etanol}}^2 + 0,006 \cdot x_{\text{etanol}} \cdot x_s - 0,002 \cdot x_{\text{etanol}} \cdot t_{\text{EUS}} + 0,029 \cdot x_s^2 + 0,004 \cdot x_s \cdot t_{\text{EUS}} - 0,0008 \cdot t_{\text{EUS}}^2 \quad (1)$$

($R^2=0,9912$)

donde x_{etanol} es la fracción de etanol en el disolvente expresada en porcentaje en volumen, x_s es la cantidad de sólido expresada en porcentaje peso/volumen y t_{EUS} es el tiempo de contacto.

El coeficiente de correlación obtenido (R^2) es superior a 0,99, indicando una buena relación entre los datos experimentales de TPC y los predichos con la Ec. 1. En la Tabla 4 aparecen los valores de TPC obtenidos y los valores predichos mediante la presente



ecuación. En cuanto a los resultados del análisis de varianza, mostrados en el diagrama de Pareto (Fig. 8 (A)), reflejan aquellas variables lineales, cuadráticas y combinadas que contribuyen de forma significativa al proceso de extracción de TPC con excepción del producto $X_{\text{etanol}} \cdot t_{\text{EUS}}$ que presentan un valor inferior a 1 en el diagrama de Pareto y una contribución inferior a 0,0002 en la Ec. 1. Además, se observa que un aumento de la cantidad de sólido y de la cantidad de etanol produce un efecto desfavorable en la extracción del TPC. Este resultado está en línea con los resultados anteriormente mostrados en el apartado 4.1.

Tabla 4. Comparación de la concentración de TPC experimental de la Tabla 3 con el predicho con la Ec. 1.

EXPERIMENTO	C_{TPC} EXPERIMENTAL (g/kg sólido)	C_{TPC} PREDICCIÓN (g/kg sólido)
E1	8,2 ± 0,2	8,2 ± 0,5
E2	7,02 ± 0,6	6,9 ± 0,8
E3	8,5 ± 0,7	8,9 ± 0,8
E4	11,0 ± 0,2	10,8 ± 0,8
E5	3,0 ± 0,5	2,6 ± 0,8
E6	5,57 ± 0,08	5,7 ± 0,8
E7	7,1 ± 0,6	7,0 ± 0,8
E8	8,3 ± 0,5	8,2 ± 0,5
E9	4,7 ± 0,3	4,9 ± 0,8
E10	3,5 ± 0,2	3,7 ± 0,8
E11	4,8 ± 0,5	4,9 ± 0,8
E12	8,1 ± 0,3	7,8 ± 0,8
E13	10,2 ± 0,4	10,0 ± 0,8
E14	8,33 ± 0,08	8,6 ± 0,8
E15	8,22 ± 0,05	8,2 ± 0,5

En la Fig.8 (B) se muestran los gráficos de superficie de respuesta que representan la relación entre el contenido fenólico total del extracto del residuo de mazorca de maíz y las variables experimentales (X_{etanol} , X_s , t_{EUS}). Al aumentar de forma generalizada el tiempo de contacto y disminuir la fracción de etanol y de sólido, da como resultado un efecto favorable en la extracción de TPC.

Con lo expuesto, el modelo predice que la condición óptima (Fig. 8(A)) de extracción requiere un 1,1 % p/v de sólido y un 56% de etanol en agua y un tiempo mínimo de 43

minutos para el proceso EUS a 70 °C. Se obtendrá una liberación de aproximadamente 10 g de TPC / kg sólido.

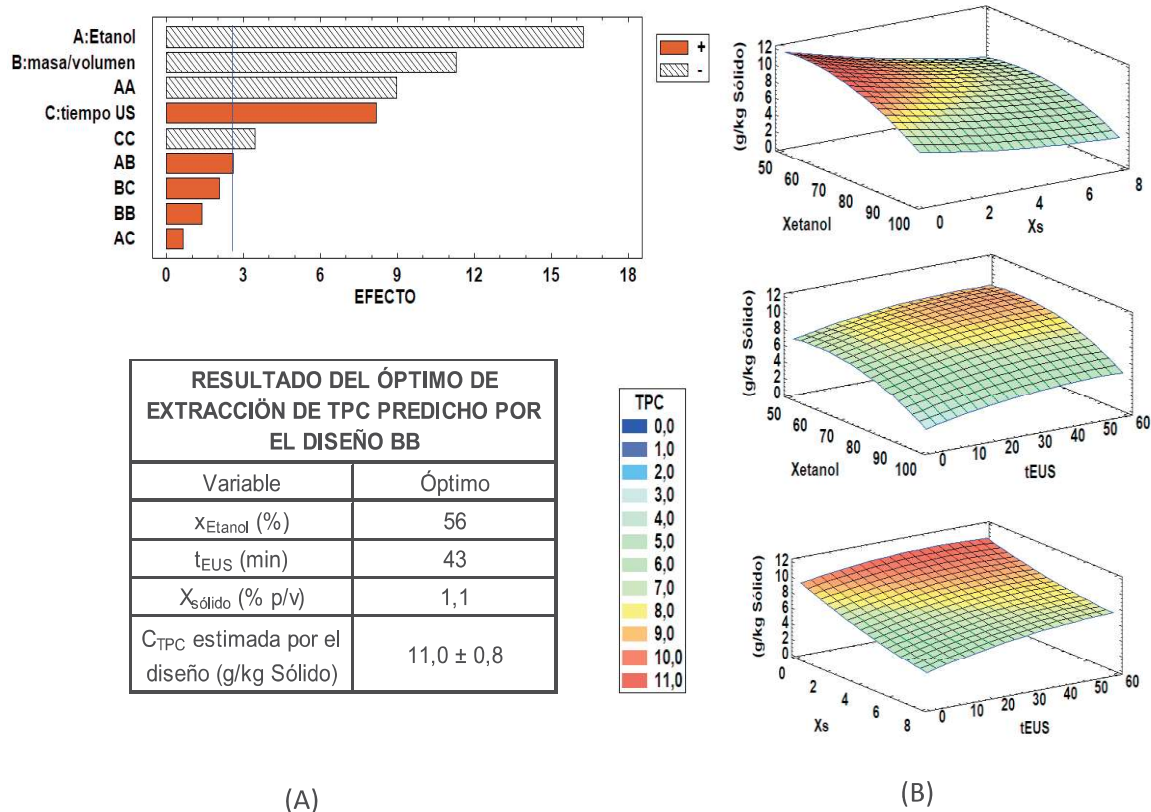


Figura 8. Resultados del análisis estadístico del diseño Box-Behnken. (A) Diagrama de Pareto y condiciones óptimas. (B) Gráficos de superficie de respuesta de la concentración de TPC en función de la fracción de sólido (X_s), de disolvente (X_{etanol}) y del tiempo de contacto (t_{EUS}). Los valores más cercanos al rojo representan condiciones óptimas para tener mayor extracción de TPC.

4.4.2 Efecto de las variables de operación en la recuperación de p-cumárico

En las Tablas 5 , 6 y en las Figs. 9 y 10 se recogen los principales resultados obtenidos del análisis estadístico del diseño Box-Behnken para la extracción de p-cumárico y para la suma de los compuestos fenólicos (P_i) de la Tabla 2.

En primer lugar, en la tabla 5 se representan los **valores de las ecuaciones polinómicas** de ajuste, el valor de R^2 es superior a 0,9 para ambas ecuaciones, lo que indica que los valores obtenidos experimentalmente se ajustan a los valores que el modelo predice.

Respecto al **análisis de la varianza** representados por el Diagrama de Pareto (Fig. 9), muestran que la mayoría de los efectos lineales, cuadráticos y combinados afectan significativamente en la extracción de p-cumárico, así como de los compuestos fenólicos (kaempferol, etilferulato, vainillina, ácido vainillínico, etc.). Además, se observa que un aumento en el tiempo de ultrasonidos tiene un efecto favorable en la extracción de p-cumárico, mientras que para la suma de los compuestos P_i tiene un efecto positivo el aumento de la masa. En ambos casos, un aumento del tiempo de ultrasonidos y de la



masa son efectos combinados que pueden tener un impacto beneficioso en la extracción de compuestos reductores.

Tabla 5. Parámetros de las ecuaciones polinómicas de segundo orden que predice el diseño BB para la extracción de p-cumárico, y para el total de los compuestos fenólicos (Pi) de la Tabla 2.

PARÁMETROS	P-CUMÁRICO	SUMA DE P _i DE LA TABLA 2
Ordenada en el origen	-68.328	-766.521
x_{etanol}	+1,470	+21.399
$x_{sólido}$	+5,169	+87.267
t_{EUS}	+1,224	+2.294
x_{etanol}^2	-0,007	-0,131
$x_{sólido}^2$	-0,037	+4,145
t_{EUS}^2	+0,008	+0,048
$x_{etanol} \cdot x_{sólido}$	+0,067	-1,121
$x_{etanol} \cdot t_{EUS}$	-0,021	-0,075
$x_{sólido} \cdot t_{EUS}$	+0,114	+0,645
R^2	0.972	0.932

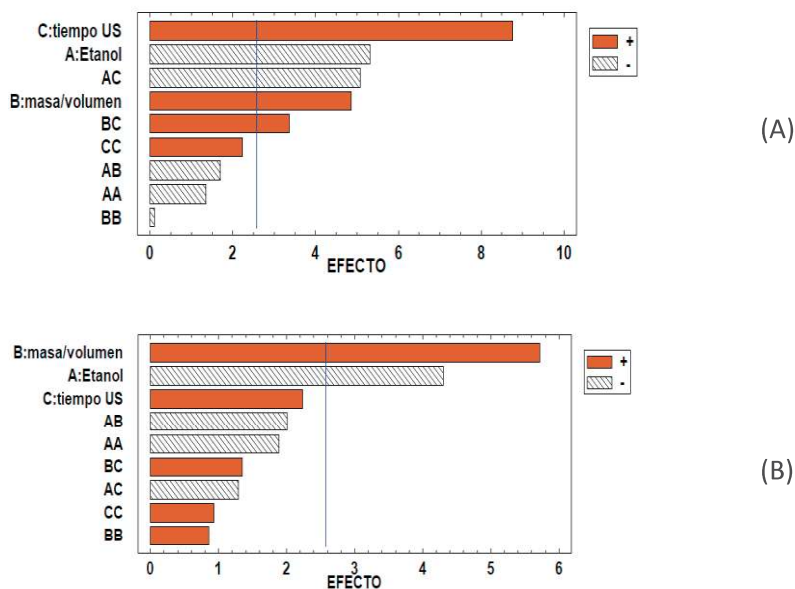


Figura 9. Resultados del diagrama de Pareto (A) para el ácido p-cumárico y (B) para la suma de los Pi de la Tabla 2. Variables: fracción de sólido ($B=X_{sólido}$), de disolvente ($A=x_{etanol}$) y tiempo de contacto ($C=t_{EUS}$).

En la Fig. 10 se muestran los gráficos de superficie, que corroboran los resultados anteriores. Se muestra la respuesta en función de dos variables y mantienen la otra variable en su nivel medio. Se confirma que un aumento de la concentración de etanol y de tiempo de ultrasonidos va a tener un efecto favorable para la extracción de ácido

p-cumárico (Fig 10. (A)), mientras que un aumento del porcentaje de etanol y de la masa, tendrá un impacto positivo en la extracción P_i (Fig 10. (B)). En ambas situaciones, el aumento de la masa y de tiempo de ultrasonidos tendrá un beneficio en la extracción de compuestos fenólicos.

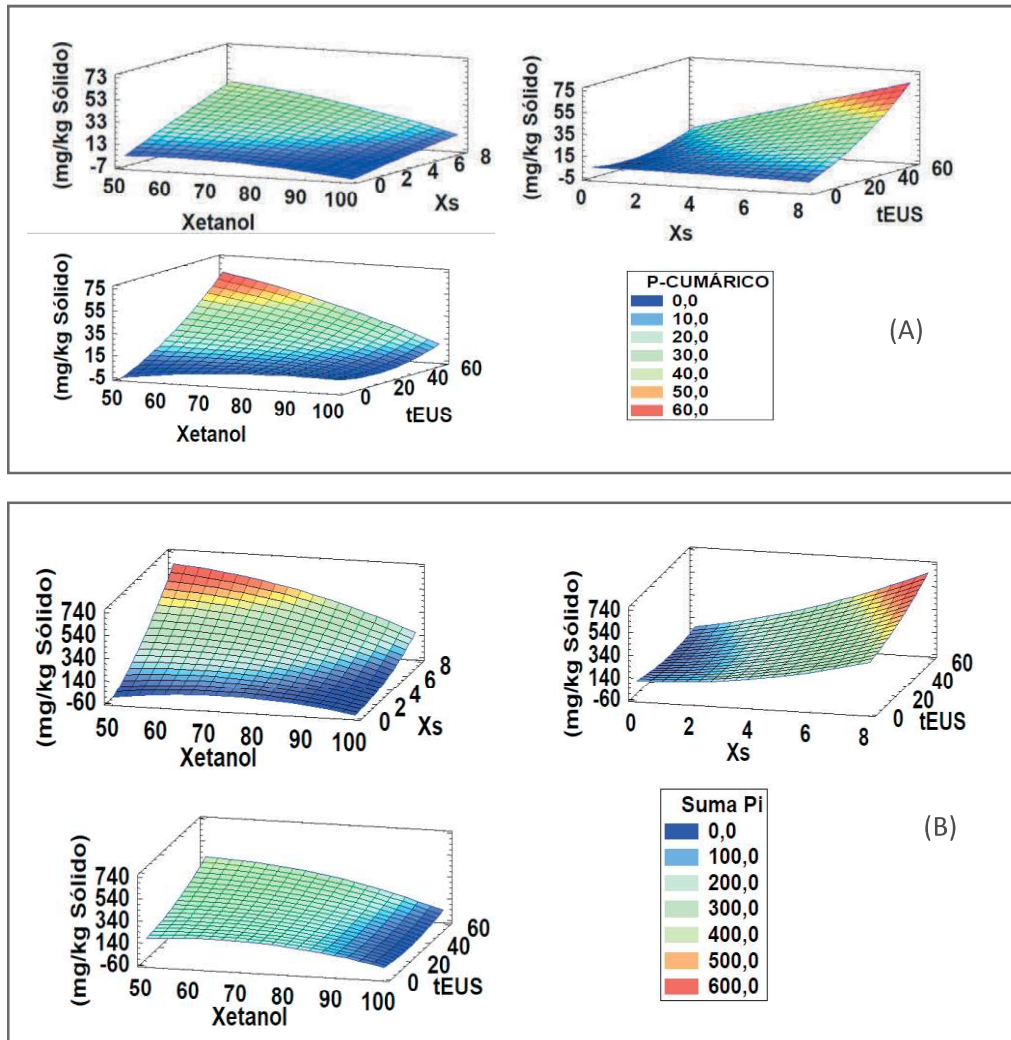


Figura 10. Gráficos de superficie de respuesta **(A)** para el ácido p-cumárico y **(B)** para la suma de los P_i de la Tabla 2. Variables: fracción de sólido (X_s), de disolvente (Xetanol) y tiempo de contacto (t_{EUS}).

En la Tabla 6 se muestran los resultados óptimos para la extracción de p-cumárico, y para la extracción total de todos los compuestos fenólicos (P_i) de la Tabla 2. El modelo predice que la **condición óptima de extracción para ácido p-cumárico** requiere de un 5.6 %p/v de sólido y un 52 % de etanol en agua para el proceso EUS a 70 °C y utilizando tiempos de contacto no superiores de 60 minutos se obtendrá una liberación de aproximadamente 74,07mg de p-cumárico/kg sólido. Respecto a las **condiciones óptimas de extracción para los compuestos fenólicos (P_i)**, el proceso requiere de un 7 %p/v de sólido y un 56 % de etanol en agua para el proceso de EUS a 70 °C empleando tiempos de contacto no superiores a 59 minutos, se alcanzará una liberación de aproximadamente 713mg de P_i / kg sólido.



Tabla 6. Resultado del óptimo de extracción de p-cumárico, y de la suma de todos los compuestos fenólicos (P_i) de la Tabla 2 predicho

PARÁMETROS	p-CUMÁRICO	SUMA DE LOS P_i DE LA TABLA 2
x_{etanol}	52	56
t_{eus} (min)	60	59
$x_{\text{sólido}}$ (%p/v)	5.6	7
C_{TPC} estimada por el diseño (mg/kg sólido)	74.07	713.79

Como conclusión, si se quiere **liberar la mayor cantidad de TPC**, el modelo BB predice que se deben trabajar con unas condiciones de un 56% de etanol en agua, 43 minutos a una temperatura de 70 °C y una masa de 1,1 % p/v de sólido.

En el caso de que se quiera **liberar la mayor cantidad de compuestos fenólicos**, se deberá trabajar con unas condiciones de 56% de etanol en agua, 59 minutos a una temperatura de 70 °C y una masa de 7 % p/v de sólido.

4.5 Resultados de extracción en las condiciones óptimas

En la Fig. 11 se presentan los resultados de extracción en las condiciones óptimas para liberar el máximo contenido de TPC (56% de etanol en agua, 43 minutos a una temperatura de 70 °C y una masa de 1,1 % p/v de sólido). Se puede comprobar que sí se llegan a alcanzar los 11 g/kg sólido que el modelo predice para la cantidad total de TPC. Se realizaron diferentes cinéticas de extracción para el ácido vainillínico, ácido p-cumárico, vainillina, kaempferol y etilferulato para comprobar las cantidades que se liberaban de cada uno en la extracción. El compuesto que más TPC libera es el etilferulato, llega a una concentración aproximada de 120 mg/kg sólido. Comprobamos que a partir de los 60 minutos aproximados se alcanza el estado estacionario y la extracción se mantiene constante.

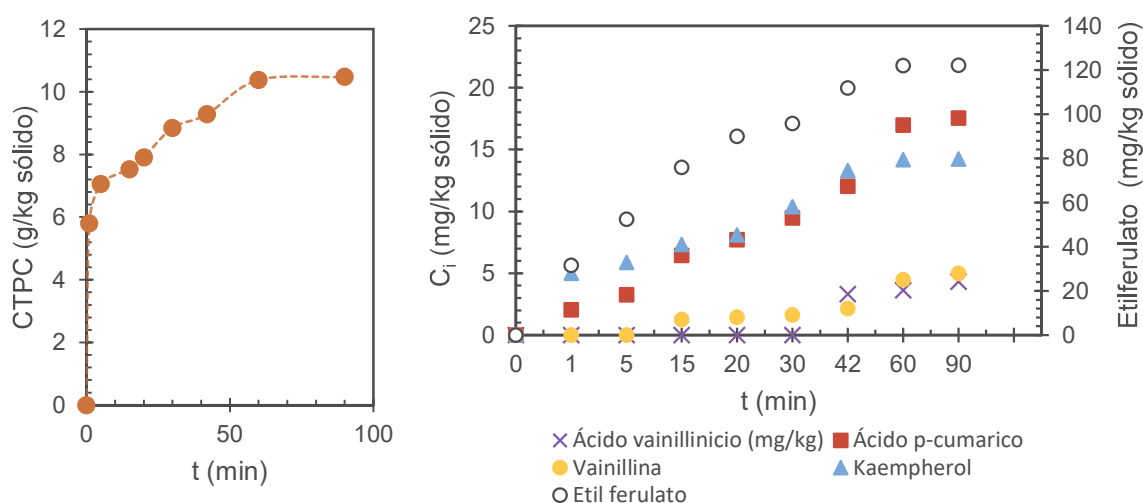


Figura 11. Resultados de la cinética de máxima extracción de TPC según el modelo BB con las condiciones de 56 % de etanol en agua, 43 minutos a una temperatura de 70 °C y una masa de 1,1 % p/v de sólido. El subíndice i hace referencia al kaempferol, vainillina y a los ácidos vainillínico y p-cumárico.

Finalmente, se realizó un experimento de extracción bajo las mismas condiciones de operación (70 °C, 56% de etanol y tiempos mínimos de contacto de 59 min) pero aumentando la cantidad de residuo de mazorca a 7 %p/v.

En la Fig. 12, se muestran los resultados comparativos de extracción para el ácido p-cumárico, kaempferol y etilferulato bajo de las condiciones óptimas (56% de etanol en agua, a una temperatura de 70 °C y una masa de 7 % p/v de sólido) y las condiciones óptimas de extracción de los TPC (56% de etanol en agua, a una temperatura de 70 °C y una masa de 1,1 % p/v de sólido). Se eligieron tres compuestos representativos del espectro y que son característicos por encontrarse en el residuo de mazorca de maíz como el ácido p-cumárico, el kaempferol y el etilferulato.

La cantidad máxima de TPC que se obtuvo empleando un 7 %p/v de sólido es considerablemente inferior a la que se obtuvo con 1 % p/v de sólido. Sin embargo, al aumentar la masa de sólido se consigue mejorar la recuperación de p-cumárico, kaempferol y etilferulato

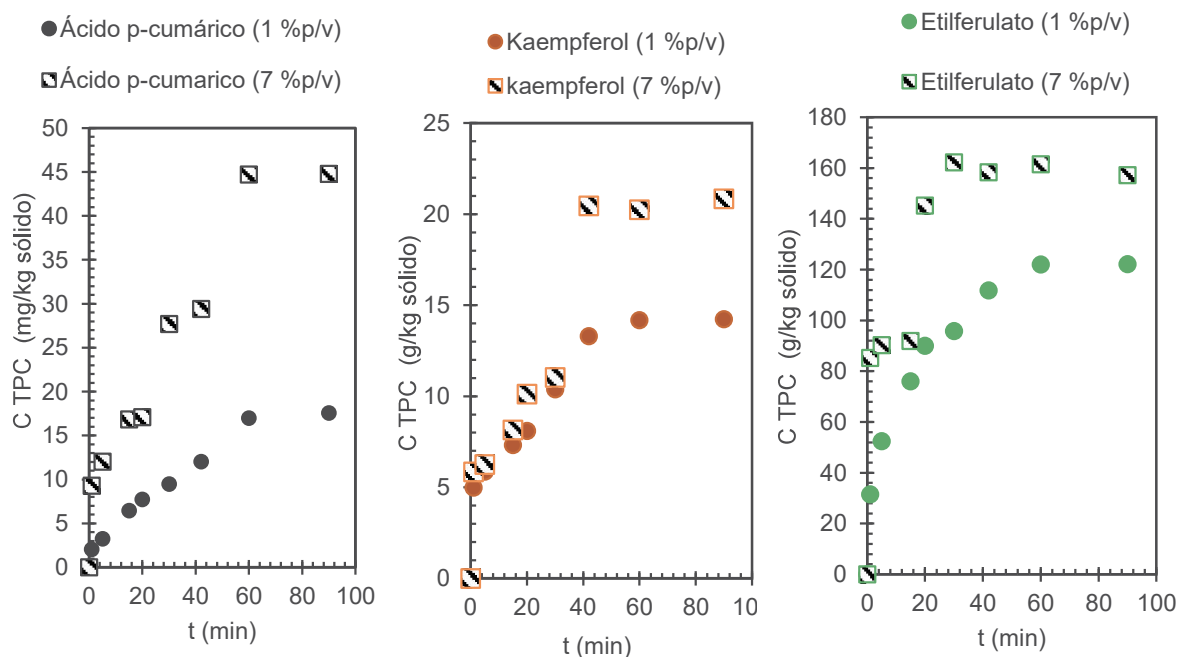


Figura 12. Comparación de cinéticas de TPC en los compuestos ácido p-cumárico, kaempferol y etilferulato para las condiciones óptimas en las que se trabaja con 1 %p/v (56% de etanol en agua y 43 minutos a una temperatura de 70 °C) y con 7 %p/v (56% de etanol en agua y 59 minutos a una temperatura de 70 °C).

5. CONCLUSIONES

Para finalizar el estudio se expondrán las conclusiones obtenidas tras el análisis de los resultados.

En primer lugar, respecto a los resultados obtenidos en los experimentos de extracción en baños agitados (EB) realizados variando la cantidad de sólido (1-9.6 g en 100 mL de disolvente), el tiempo de contacto (5 min-26 h), el porcentaje de etanol en el disolvente (50-100% etanol) y la temperatura de operación (40 y 70 °C), se observa que la cantidad



de sólido óptimo para la extracción de TPC es entre 1-5 %p/v, el tiempo de contacto en el que se extrae la mayor cantidad de compuestos fenólicos es de 1h, tiempo en el cual se llega al estado estacionario y el porcentaje de etanol óptimo es de 70 % ya que los compuestos de interés seleccionados presentan una cierta polaridad, pero no total puesto que cuando extraemos con una concentración de 100 % etanol, los resultados de TPC son menores. Estos experimentos iniciales han permitido estudiar el efecto de las variables sobre la eficacia de recuperación de la fracción fenólica del residuo agrario de mazorca de maíz.

Por otro lado, respecto al experimento de extracción en baño con agitación rotatoria y extracción asistida con ultrasonidos, utilizando las mismas condiciones de operación: 70 °C, 100 mL de disolvente con un 70 % de etanol y 5 g de residuo sólido (carga de sólido en el extractor = 5 %p/v). Los resultados experimentales muestran que la extracción asistida por ultrasonidos es más efectiva que la extracción convencional con agitación rotatoria, llegando a la misma concentración de TPC a la mitad de tiempo.

Finalmente, los resultados obtenidos a partir de los 15 experimentos de EUS a 70 °C del diseño de experimentos Box-Behnken, en el que se evaluó, mediante la metodología de superficie, el efecto de las variables carga de sólido, porcentaje de etanol y tiempo contacto para maximizar la recuperación de compuestos fenólicos, si se quiere extraer mayor cantidad de TPC se recomienda trabajar con 56% de etanol en agua, a un tiempo máximo de 43 minutos y una masa de 1,1 % p/v de sólido. Por otra parte, si se quiere mejorar la recuperación de TPC individualmente en cada perfil de compuesto fenólico, se aconseja trabajar bajo unas condiciones de 56% de etanol en agua, en un tiempo máximo de 59 minutos y una masa de 7 % p/v de sólido.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] García-Lara, S., & Serna-Saldivar, S. O. (2019). Corn History and Culture. En Elsevier eBooks (pp. 1-18). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811971-6.00001-2>
- [2] Lozano E., Belden FJ. Chapter 4 - Economics of Production, Marketing and Utilization, Corn (Third Edition), AACC International Press, 2019, Pages 87-107, Página web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128119716000048>
- [3] Cereales. (s. f.). <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/cereales/>
- [4] Barl, B., Biliaderis, C., Murray E. & Macgregor, A. Combined chemical and enzymatic treatments of corn husks lignocellulosics. *J. Sci. Food Agric.* 1991, 56, 195–214.
- [5] S, B. D., Ingram, L. O., Ben-Bassat, A., Doran, J. B., Fowler, D., Hall, R. E., & Wood, B. (1992). Conversion of hydrolysates of corn cobs and hulls into ethanol by recombinant *Escherichia coli* B containing integrated genes for ethanol production. *Biotechnology Letters*, 14(9), 857-862. <https://doi.org/10.1007/bf01029153>
- [6] Hang Y., Woodams E. Enzymatic enhancement of citric acid production by *Aspergillus niger* from corn cobs. *Lebensm. Wiss. Technol.* 2001;42:484–486. [Google Scholar]



-
- [7] Hang Y., Woodams E. Enzymatic production of soluble sugars from corn husks. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1999;32:208–210. [Google Scholar]
- [8] Ashour, A., Amer, M., Marzouk, A. M., Shimizu, K., Kondo, R., & El-Sharkawy, S. H. (2013). Corncobs as a Potential Source of Functional Chemicals. *Molecules*, 18(11), 13823-13830. <https://doi.org/10.3390/molecules181113823>
- [9] Kim, K., Tsao, R., Yang, R. S. H., & Cui, S. W. (2006b). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95(3), 466-473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.032>
- [10] Călinoiu, L., & Vodnar, D. C. (2018). Whole Grains and Phenolic Acids: A Review on Bioactivity, Functionality, Health Benefits and Bioavailability. *Nutrients*, 10(11), 1615. <https://doi.org/10.3390/nu10111615>
- [11] Pei, K., Ou, J., Huang, J., & Ou, S. (2016b). *p*-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 2952-2962. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7578>
- [12] Călinoiu, L.F., Vodnar, D.C. (2018). “Whole Grains and Phenolic Acids: A Review on Bioactivity, Functionality, Health Benefits and Bioavailability”, *Nutrients*, 10(11), 1-31
- [13] Cunha, F. A., Coelho, A. G., Da Silva Azevedo, P. S., Da Silva-Júnior, A. A., De Assis Oliveira, F., & Nunes, L. C. C. (2019b). Systematic review and technological prospection: ethyl ferulate, a phenylpropanoid with antioxidant and neuroprotective actions. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 29(2), 73-83. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1568410>
- [14] Kim, K., Tsao, R., Yang, R. S. H., & Cui, S. W. (2006c). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95(3), 466-473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.032>
- [15] Babío Núñez, Beatriz (2019). *Extracción de vainillina y ácido vanílico empleando disolventes eutécticos profundos*. Tesis (Master), E.T.S.I. Industriales (UPM).
- [16] Altemimi, A. B., Mohammed, M. J., Yi-Chen, L., Watson, D. K., Lakhssassi, N., Cacciola, F., & Ibrahim, S. A. (2020). Optimization of Ultrasonicated Kaempferol Extraction from *Ocimum basilicum* Using a Box–Behnken Design and Its Densitometric Validation. *Foods*, 9(10), 1379. <https://doi.org/10.3390/foods9101379>
- [17] Cunha, F. A., Coelho, A. G., Da Silva Azevedo, P. S., Da Silva-Júnior, A. A., De Assis Oliveira, F., & Nunes, L. C. C. (2019c). Systematic review and technological prospection: ethyl ferulate, a phenylpropanoid with antioxidant and neuroprotective actions. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 29(2), 73-83. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1568410>
- [18] Altemimi, A. B., Mohammed, M. J., Yi-Chen, L., Watson, D. K., Lakhssassi, N., Cacciola, F., & Ibrahim, S. A. (2020). Optimization of Ultrasonicated Kaempferol



- Extraction from *Ocimum basilicum* Using a Box–Behnken Design and Its Densitometric Validation. *Foods*, 9(10), 1379. <https://doi.org/10.3390/foods9101379>
- [19] Chen, C., You, L., Abbasi, A. M., Fu, X., & Liu, R. (2015). Optimization for ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry fruits with antioxidant and hyperglycemic activity in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 130, 122-132. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.003>
- [20] Naczki, M., & Shahidi, F. (2004b). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 95-111. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(04\)01409-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(04)01409-8)
- [21] Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., & Hamdi, M. (2007b). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105(3), 1126-1134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.010>
- [22] Y.M. Monroy, R.A.F. Rodrigues, A. Sartoratto, F.A. Cabral (2016). Extraction of bioactive compounds from cob and pericarp of purple corn (*Zea mays* L.) by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol, and water as solvents. *Journal of Supercritical Fluids*. 107: 250-259
- [23] D.D. Bartnik, C.M. Mohler, M. Houlihan, Methods for the production of food grade extracts, United States Patent Application, 20060088627, April 27, 2006.
- [24] Tabaraki, R., & Nateghi, A. (2011c). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(6), 1279-1286. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.05.004>
- [25] Martínez, R., Ruiz, M. O., García, A., Ramos, C., & Díez, V. (2021). Effect of salinity and temperature on the extraction of extracellular polymeric substances from an anaerobic sludge and fouling in submerged hollow fibre membranes. *Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects*, 625(126910), 126910.
- [26] V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventós (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Method. Enzymol.* 299: 152–178.
- [27] F. Benzie, J.J. Strain (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measurement of antioxidant power; the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 329: 70- 76.
- [28] R.W. Owen, W. Mier, A. Giacosa, W.E. Hull, B. Spiegelhalder, H. Bartsch (2000). Phenolic compounds and squalene in olive oils: concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*. 38(8): 647-659.
- [29] S. Pérez-Margariño, S.M. Ortega-Heras, E. Cano-Mozo (2008). Optimization of a solidphase extraction method using copolymer sorbents for isolation of phenolic



compounds in red wines and quantification by HPLC. *Journal and Food Chemistry*. 56(24): 11560- 11570.

- [30] Rho H., Ghimeray A., Yoo D., Ahn S., Kwon S., Lee K., Cho D., Cho J. Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-Inflammatory properties. *Molecules*. 2011;16:3338–3344. doi: 10.3390/molecules16043338. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
- [31] Harborne J., Williams C. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000;55:481–504. doi: 10.1016/S0031-9422(00)00235-1. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]



Agradecimientos:

Este Trabajo Fin de Grado ha sido realizado en el marco de los siguientes proyectos de investigación del grupo Biotecnología Industrial y Medioambiental (BIOIND) de la Universidad de Burgos:

TED2021-129311B-I00 - Tecnologías verdes basadas en el empleo de fluidos presurizados para valorizar biomasa lignocelulósica mediante la producción de furfural, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

PDC2022-133443-I00 - Diseño de un prototipo para la extracción de bioproductos con agua subcrítica, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

PID2020-116716RJ-I00 - Tecnologías de fluidos presurizados para la valorización de subproductos de la industria agroalimentaria: recuperación de pectina y otros compuestos bioactivos de alto valor, financiado por la Agencia Estatal de Investigación.

BU050P20 - Valorización de la fracción proteica de subproductos de la industria agroalimentaria de Castilla y León mediante tecnologías de fluidos presurizados, financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

PID2019-104950RB-I00 - Valorización de subproductos marinos mediante tecnologías de fluidos sub- y supercríticos para la obtención de biocompuestos valiosos, financiado por la Agencia Estatal de Investigación.
