

# Universidad de Burgos

Facultad de Ciencias

Área de Ingeniería Química

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos



Recuperación de compuestos bioactivos de subproductos de la industria alimentaria mediante el empleo de mezclas etanol/agua presurizadas

## TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Dirigido y tutorizado por

*Óscar Benito Román*

Memoria presentada por

*Vanessa Arciniegas Cabrera*



**AUTORIZACIÓN DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**CURSO: 2019/2020**

D. ÓSCAR BENITO ROMÁN, Director del Trabajo fin de Máster de Dña. VANESSA ARCINIEGAS CABRERA, que lleva por título: "Recuperación de compuestos bioactivos de subproductos de la industria alimentaria mediante el empleo de mezclas etanol/agua"

Autoriza  No autoriza

A defender públicamente el trabajo mencionado.

Burgos, a 7 de septiembre de 2020

Fdo.: Oscar Benito Román

**AUTORIZACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER AL REPOSITORIO (RIUBU)**

Dña. Vanessa Arciniegas Cabrera y D. Óscar Benito Román, autor y Director del Trabajo fin de Máster autorizan que esta memoria sea transferida al Repositorio Institucional de la Universidad de Burgos (RIUBU) en la siguiente modalidad:

Acceso restringido  Acceso abierto  Acceso abierto con periodo de embargo

Burgos, a 7 de septiembre de 2020

Fdo.: Oscar Benito Román

Fdo.: Vanessa Arciniegas Cabrera

Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto de Investigación VALORIZACIÓN INTEGRAL DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA MEDIANTE TECNOLOGÍAS EMERGENTES (ALVALOR) financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (BU301P18) y desarrollado en el Grupo de investigación Biotecnología Industrial y Medioambiental, reconocido por la UBU (GIR-UBU BIOIND) y por la Junta de Castilla y León como Unidad de Investigación Consolidada UIC-128.

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	5
<b>3. PROCESOS ALTERNATIVOS DE EXTRACCIÓN BASADOS EN FLUIDOS PRESURIZADOS (PHW Y PAE)</b> .....	6
3.1 Extracción con agua caliente presurizada (PHW).....	7
3.2 Extracción con etanol acuoso presurizado (PAE).....	7
3.3 Extracción con etanol puro presurizado.....	8
<b>4. METODOLOGÍAS PARA EXTRACCIÓN CON FLUIDOS PRESURIZADOS (ETANOL Y AGUA)</b> .....	8
4.1 Tratamiento de las muestras.....	9
4.2 Equipos para las extracciones.....	9
4.2.1 Sistema por lotes (estáticos).....	10
4.2.2 Sistema de flujo continuo y/o semicontinuo (dinámicos).....	10
4.3 Ejemplos de extracciones.....	11
4.3.1 Residuos de mora ( <i>Rubus fruticosus L.</i> ).....	11
4.3.2 Cáscara de maracuyá ( <i>Passiflora edulis</i> ).....	12
4.3.3 Cáscara de feijoa ( <i>Acca sellowiana (O. Berg) Burret</i> ).....	13
4.3.4 Residuos de juçara ( <i>Euterpe edulis Mart.</i> ).....	14
4.3.5 Orujo de uva ( <i>Vitis vinifera L. CV. Syrah</i> ).....	14
4.3.6 Calabaza amarga ( <i>Momordica charantia</i> ).....	15
4.3.7 Cebada cerosa ( <i>Hordeum vulgare</i> ).....	16
4.3.8 Salvado de arroz desgrasado ( <i>Oryza sativa</i> ).....	16
4.3.9 Tallo de paja de arroz.....	17
4.3.10 Paja de cebada y canola.....	17
4.3.11 Salvado de trigo.....	18
4.3.12 Café molido agotado.....	18
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	21
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	21

## RESUMEN

Se realizó una revisión bibliográfica sobre la recuperación de compuestos bioactivos (antocianinas, flavonoides y compuestos fenólicos, entre otros) de subproductos de la industria alimentaria que son desechados sin considerar que, una vez extraídos, pueden ser utilizados como aditivos o ingredientes para mejorar las propiedades de los alimentos. De esta forma se contribuye a valorizar esos subproductos de la industria alimentaria. Como tecnología estudiada para la recuperación de estos compuestos bioactivos, se ha seleccionado la extracción mediante mezclas etanol/agua presurizadas (PAE), tanto a temperaturas bajas como superiores a 100 °C. Se ha podido comprobar que la adición de etanol en el agua, en proporciones variables, mejora la solubilidad de determinados compuestos bioactivos obtenidos a partir de diferentes matrices, como son los residuos de mora, cáscara de maracuyá, cebada cerosa, entre otras. Frente a otros procesos de extracción el empleo de PAE permite la extracción de familias más amplias de componentes antioxidantes y disminuye los compuestos de oscurecimiento de las reacciones de Maillard, minimizando las reacciones de fragmentación. La tecnología PAE presenta otras ventajas como selectividad, menores tiempos de operación y rendimientos de extracción más altos. De igual manera se considera una técnica de extracción verde, dado que los métodos de extracción convencionales de este tipo de compuestos, se basan en el uso de disolventes orgánicos, generalmente tóxicos y consumidos en grandes proporciones.

## 1. INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria genera una elevada cantidad de subproductos que contienen un reservorio de carbohidratos, proteínas, lípidos, nutraceuticos y compuestos bioactivos que pueden formar las materias primas para la elaboración de otros productos comercialmente importantes (Ravindran & Jaiswal, 2016). Desechar alimentos aún comestibles o que podrían utilizarse como materia prima en la industria, causa pérdidas económicas, afectando la economía y generando un fuerte impacto en el medio ambiente. Según el estudio del programa FUSIONS del Séptimo Programa Marco realizado en el 2019 por la Comisión Europea, en la UE se desperdician anualmente unos 88 millones de toneladas de alimentos, lo que supone unos costes estimados en 143.000 millones de euros. La mitad de las frutas y verduras producidas en todo el mundo forman parte de estos desperdicios, descartando en ellos buenas fuentes de polifenoles, carotenoides y ácidos grasos, compuestos bioactivos que tienen muchos beneficios para la salud (Santos et al., 2019; Ou & Kwok, 2004).

Los datos primarios de los países en desarrollo indican que las industrias a gran escala procesan residuos de productos alimentarios en biogás o lo compostan para obtener biofertilizante. Los desechos de las industrias de procesamiento organizadas y no organizadas, con la excepción de muy pocas instalaciones importantes de compostaje y generación de biogás, se eliminan en su mayor parte a través de sistemas municipales de eliminación de desechos (Banerjee et al., 2017). Por lo tanto, se ha despertado el interés en la recuperación de estos subproductos como materia prima para el procesamiento de nuevos alimentos y productos farmacéuticos ya que agrega valor al desperdicio de alimentos y reduce su eliminación al medio ambiente (Machado et al., 2015).

Además, la disponibilidad de los subproductos alimentarios ha animado a investigadores a realizar estudios detallados sobre el valor agregado de los desechos, su posible uso como materia prima y potencial contenido de compuestos bioactivos. A partir de estos residuos se puede obtener extractos ricos en compuestos bioactivos que sean usados como aditivos alimentarios que mejoren el perfil nutricional de aquéllos alimentos en los que se incorporen. El uso de extractos de plantas en los alimentos está

regulado por la Ley General de Alimentos (178/2002/CE), que asigna la responsabilidad legal principal para la seguridad de productos puestos en el mercado para operadores comerciales. Este reglamento establece la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Bart, 2011).

Los compuestos bioactivos o fitoquímicos se encuentran en frutas (uvas, mango, granada, cítricos), vegetales (repollo, papa, cebolla, pimientos), cereales (cebada, arroz, lino) y hierbas (té verde, romero, orégano, ginseng) y comprenden una serie de compuestos fenólicos (flavonoles, antocianinas, catequinas), polisacáridos (azúcares, almidón, hemicelulosa, celulosa) y otros (alcaloides, aceites esenciales, etc.). Los compuestos fenólicos tienen actividades antioxidantes y antimicrobianas y su consumo se ha correlacionado con una menor incidencia de cáncer, enfermedades cardíacas y diabetes. Los polisacáridos también se consideran fitoquímicos importantes que se pueden usar en varias aplicaciones alimentarias, farmacéuticas y de combustible (Saldaña & Valdivieso-Ramírez, 2015). La actividad antioxidante de los compuestos bioactivos los hace de especial interés para la industria alimentaria, quien se ha alejado del uso de antioxidantes sintéticos como el hidroxitolueno butilado por su presunta carcinogenicidad y por la preferencia del consumidor para elegir productos con ingredientes naturales, inclinados cada vez más por una alimentación saludable y menos artificial (Bartłomiej et al., 2012; Elder et al., 2019).

Por ejemplo, las cáscaras, orujo y semillas de desechos de procesamiento de frutas podrían ser una buena materia prima para la recuperación de pectina, lípidos, flavonoides y fibras dietéticas (Banerjee et al., 2017). El salvado de arroz, trigo y maíz, son unas de las principales fuentes de residuos agrícolas, ricos en fibra, proteínas, minerales, vitaminas y compuestos bioactivos como tocoferoles, polifenoles y alquilresorcinoles, un antioxidante natural (Ravindran & Jaiswal, 2016; Chiou et al., 2012).

La recuperación de los compuestos bioactivos de los materiales vegetales puede realizarse mediante diversas técnicas clásicas de extracción. La mayoría de estas técnicas se basan en el poder de extracción de diferentes solventes orgánicos y de la aplicación de calor (Azmir et al., 2013). Las técnicas clásicas existentes para obtener compuestos bioactivos de las plantas son: extracción Soxhlet, maceración e hidrodestilación. La extracción de Soxhlet, fue diseñada principalmente para la extracción de lípidos. Consiste en evaporar el disolvente que ha sido mezclado con el sólido que contiene el compuesto a extraer. Este solvente se condensa y regresa a la cámara del disolvente separando los compuestos extraídos hasta llegar a una concentración deseada. Se ha utilizado ampliamente para extraer valiosos compuestos bioactivos de diversas fuentes naturales y como modelo para la comparación de nuevas alternativas de extracción. En el estudio de la extracción de los compuestos bioactivos de la cáscara de feijoa, se obtuvo que la extracción por Soxhlet aunque permite un alto rendimiento de recuperación, la calidad del extracto referida al contenido total de polifenoles es menor que en una técnica no convencional, como la extracción líquida presurizada (Azmir et al., 2013; Santos et al., 2019).

La maceración, se convirtió en una forma popular y económica de obtener aceites esenciales y compuestos bioactivos. Se realiza siguiendo tres pasos, la molienda de materiales vegetales en partículas pequeñas para mayor superficie de contacto con el solvente, la adición de un solvente en un recipiente adecuado cerrado y la filtración del líquido. La hidrodestilación, también permite la extracción de compuestos bioactivos y aceites esenciales de las plantas. Implica tres procesos fisicoquímicos principales, hidrodifusión, hidrólisis y descomposición por calor. A una temperatura de extracción alta, pueden perderse algunos componentes volátiles. Este inconveniente limita su uso para la extracción de compuestos termolábiles.

Para el uso de un determinado disolvente en estos procesos convencionales de extracción, hay regulaciones a considerar si los productos recuperados se van a utilizar en alimentos, como la norma del uso de solvente apropiado, según el documento presentado por la Directiva 2009/32/CE del Parlamento Europeo. En esta normativa, se exponen los disolventes de extracción cuya utilización está autorizada para el tratamiento de materias primas, productos alimenticios, componentes de productos alimenticios o de sus ingredientes. Algunos de estos disolventes son el propano, butano, acetato de etilo, etanol, anhídrido carbónico, protóxido de hidrógeno y acetona (excepto para el refinado de aceite de orujo de oliva). En el caso de otros disolventes como el hexano, acetato de metilo, metiletilacetona, diclorometano, metanol, propanol-2, éter dimetílico, butanol-1, butanol-2, propano-1 y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, su uso se ve limitado a ciertas condiciones de utilización y a un contenido máximo en residuos de los productos alimenticios según el Real Decreto 1101/2011, de 22 de julio, por el que se aprueba la lista positiva de los disolventes de extracción que se pueden utilizar en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes. 2011. Núm. Disposición 14223 del BOE núm. 208.

En la Tabla 1, se recogen algunos ejemplos de los solventes que permiten la recuperación de determinados compuestos bioactivos. La polaridad del compuesto objetivo es el factor más importante para su elección. La afinidad molecular entre el solvente y el soluto, la transferencia de masa, el uso de codisolventes, la seguridad ambiental, la toxicidad humana y la viabilidad financiera también deben considerarse en la selección del solvente para la extracción de compuestos bioactivos (Azmir et al., 2013).

**Tabla 1.** Solventes orgánicos utilizados para la extracción de compuestos bioactivos.

Agua	Etanol	Metanol	Cloroformo	Diclorometano	Éter	Acetona
Antocianinas	Taninos	Antocianina	Terpenoides	Terpenoides	Alcaloides	Flavonoides
Taninos	Polifenoles	Terpenoides	Flavonoides		Terpenoide	
Saponinas	Flavonol	Saponinas				
Terpenoides	Terpenoides	Taninos				
	Alcaloides	Flavonas				
		Polifenoles				

(Azmir et al., 2013, adaptado de Cowan, 1999)

Gran parte de los disolventes empleados son tóxicos además de perjudiciales para el medio ambiente, por lo que deben separarse del extracto final (Starmans & Nijhuis, 1996). Para ello, se requieren procedimientos de eliminación de solventes estrictos, siempre que los productos o extractos se preparen para alimentos o usos médicos. Además, los solventes en sí mismos pueden ser costosos de obtener con alta pureza y, a menudo, no pueden eliminarse fácilmente, lo que requiere tiempo y dinero (Munir et al., 2018). Aparte de la toxicidad de los disolventes empleados, los procesos de extracción convencionales presentan otra serie de inconvenientes que han de ser abordados: el material vegetal debe ser pre-tratado para obtener rendimientos de extracción razonables (maceración, corte, secado y rotura, molienda criogénica) (Starmans & Nijhuis, 1996); comprenden un elevado consumo del disolvente, que como ya se ha indicado es tóxico, por ejemplo, la recuperación de compuestos bioactivos y antocianinas de residuos de juçara mediante la extracción convencional, requiere aproximadamente 150 mL de etanol por cada 3 g de residuo de fruta, lo cual conlleva a una pérdida de solvente y de tiempo, así como a una baja calidad del compuesto recuperado (menor actividad antioxidante) (García-Mendoza et al., 2017).

Con respecto a la duración de la extracción, en las técnicas convencionales se necesita de un tiempo prolongado, como en el caso de la recuperación de fenólicos libres donde la extracción puede durar hasta 24 h en un tanque agitado a temperatura

controlada usando metanol o acetona a concentraciones de hasta 70% (Ó. Benito-Román et al., 2015). Por otro lado, la extracción durante un amplio período de tiempo usando altas temperaturas, puede causar la descomposición de ciertos compuestos fenólicos como las antocianinas y también puede conducir a la pérdida de su bioactividad (Belwal et al., 2018).

En consecuencia, existe la necesidad de disponer de técnicas de extracción y/o solventes que no sean tóxicos, que permitan mejorar el rendimiento y calidad de los compuestos bioactivos recuperados. En este sentido, el empleo de fluidos presurizados conocido también como extracción de líquido a presión (PLE, en sus siglas en inglés), permite superar algunas de las limitaciones de los procesos de extracción convencional. En comparación con la extracción tradicional, disminuye el consumo de tiempo, el uso de solventes y es considerada una técnica de extracción verde (Ibañez et al., 2012; Richter et al., 1996). Dadas estas ventajas, se ha aplicado con éxito para extraer compuestos bioactivos de diferentes materiales vegetales (Azmir et al., 2013). El solvente que se emplea tiene un menor consumo y baja toxicidad como el caso del agua, el etanol e incluso una mezcla de ambos que reemplaza formas más tóxicas como metanol, cloroformo y diclorometano (Lee et al., 2011). Un ejemplo del estudio de la eficiencia de estos solventes en este procedimiento, se analizó en la extracción de flavonoides de las espinacas por PLE, en el cual la mezcla de etanol y agua (70:30) fue más eficiente que la extracción con el agua pura (Howard & Pandjaitan, 2008).

En el presente trabajo, se ha realizado una revisión bibliográfica acerca del empleo de mezclas de etanol/agua presurizadas como disolvente para la recuperación de compuestos bioactivos de diferentes materias primas, especialmente, de subproductos de la industria alimentaria. La importancia de este estudio radica en conocer el efecto del contenido en etanol empleado en las mezclas etanol/agua presurizadas sobre la efectividad en la recuperación de los compuestos bioactivos y cómo puede influir en la actividad antioxidante de los mismos, así como el efecto de otras variables de operación como la temperatura, presión o tiempo de operación.

## **2. OBJETIVOS**

De forma general, el objetivo del presente trabajo ha sido realizar un estudio bibliográfico de la recuperación de compuestos bioactivos (antioxidantes) de subproductos de la industria alimentaria mediante el empleo de fluidos presurizados, en particular con mezclas etanol/agua.

Asimismo se han fijado los siguientes objetivos parciales:

- Evaluar la necesidad de la obtención de compuestos bioactivos de subproductos de la industria alimentaria, para la valorización de estos subproductos.
- Comparar los métodos convencionales de extracción de compuestos bioactivos con procesos alternativos de extracción basados en fluidos presurizados.
- Comparar el efecto del solvente (agua y mezcla agua/etanol) en la extracción líquida presurizada de compuestos bioactivos en subproductos de la industria alimentaria.
- Estudiar las condiciones de operación utilizadas para la extracción de compuestos bioactivos (equipos de extracción, condiciones de operación, actividad antioxidante) de distintas materias primas.

### 3. PROCESOS ALTERNATIVOS DE EXTRACCIÓN BASADOS EN FLUIDOS PRESURIZADOS (PHW Y PAE)

Conocidas las desventajas de la extracción convencional de compuestos bioactivos, han surgido tecnologías emergentes de fluidos presurizados que utilizan solventes ecológicos, como agua caliente presurizada o agua subcrítica (*Pressurized Hot Water*, PHW), etanol acuoso presurizado (*Pressurized Aqueous Ethanol*, PAE) y CO<sub>2</sub> supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) que pueden utilizarse para la producción de fitoquímicos a partir de una variedad de biomásas (Saldaña & Valdivieso-Ramírez, 2015). El CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas (presión y temperatura por encima de las críticas: 7 MPa y 31 °C respectivamente) destaca por su baja polaridad, lo que recomienda su uso para la extracción de lípidos o aceites de fuentes naturales. Este hecho limita su aplicación para la extracción de compuestos fenólicos, que necesitan un disolvente con cierta polaridad. Para mejorar su polaridad se puede emplear etanol o algún otro disolvente (agua, metanol, etc.) como modificador, de manera que su polaridad se incremente y se puedan recuperar compuestos fenólicos. El agua caliente presurizada o las mezclas etanol agua presurizadas permiten superar estas limitaciones (O. Benito-Román et al., 2019). La extracción con líquidos presurizados (PLE), apareció como alternativa para la extracción y fraccionamiento de productos naturales, ya que permite una extracción más rápida y reduce el consumo de solventes a través de una tecnología "verde" (Machado et al., 2015).

El principio básico de extracción líquida a presión (PLE) se basa en el uso de solventes para realizar extracciones a altas presiones y temperaturas, siempre por debajo de sus puntos críticos, de modo que el estado líquido del solvente se mantenga durante todo el proceso de extracción. Por ejemplo, en el caso del agua se trabaja a temperaturas por encima de la ebullición (100 °C) pero por debajo de la temperatura crítica (374 °C) aplicando la presión necesaria para mantenerla en estado líquido durante todo el proceso de extracción. Al aplicar esas condiciones, resultan procesos de extracción más rápidos, en los cuales, se obtienen rendimientos más altos con bajos volúmenes de solventes, disminuyendo así la dilución del extracto final. Esto se debe a mejoras en la transferencia de materia (con el aumento de temperatura por encima de sus puntos de ebullición y presión), aumento de la solubilidad de los analitos en el disolvente por la disminución de la viscosidad del disolvente y de la tensión superficial (lo que permite una mejor penetración del disolvente en la matriz) (Herrero et al., 2013), una cinética de extracción más prominente por la difusividad mejorada del solvente y la matriz de la planta y a la ruptura de las fuerzas de unión (dipolo-dipolo, van der Waals y H<sub>2</sub>) que facilita la difusión de compuestos fenólicos dirigidos a las superficies externas de matrices sólidas (Ameer et al., 2017). Estas características, indican que la eficiencia de una extracción depende de las condiciones en las cuales se realiza (temperatura, presión, tiempo de extracción), así como de la naturaleza de la muestra y de los analitos a extraer (Kronholm et al., 2007). Usando PLE, se logra una tasa de extracción relativamente más rápida debido a una combinación de la interacción del solvente líquido con las moléculas de la matriz y temperatura y presiones elevadas para la extracción eficiente de componentes específicos.

Aun cuando existen otras técnicas para extraer compuestos bioactivos, como la extracción asistida por microondas y la extracción asistida por ultrasonido, estas son más lentas (aproximadamente cinco veces en comparación con la extracción de agua subcrítica), requieren una fuente de energía alternativa y son ineficientes en comparación con PLE (Munir et al., 2018; Wang et al., 2017). La extracción asistida por microondas implica un largo tiempo de extracción y se dispone de poca información sobre las condiciones adecuadas para extraer compuestos bioactivos (Kala et al., 2016), mientras que la extracción asistida por ultrasonido debe realizarse con cuidado

ya que puede degradar rápidamente los compuestos bioactivos (Veggi et al., 2014; Zhao et al., 2006).

### **3.1 Extracción con agua caliente presurizada (PHW)**

La extracción con agua caliente presurizada (PHW), es una técnica de extracción que ofrece una serie de ventajas en comparación con los métodos tradicionales de extracción con solventes (Munir et al., 2018), una de ellas es la poca toxicidad, dado que sólo se emplea agua como disolvente (Wang et al., 2017). El término "agua caliente a presión" se utiliza para denotar la región de la fase condensada de agua entre el rango de temperatura de 100 °C (punto de ebullición del agua) a 374 °C (punto crítico del agua), el efecto de presión sobre las propiedades del agua es mínimo, pero el aumento de presión puede facilitar la extracción de muestras donde los analitos quedan atrapados en los poros de la matriz ya que permite mantener el agua en su fase líquida.

Las propiedades de agua se ven modificadas a temperaturas elevadas con lo cual aumenta la capacidad del fluido para solubilizar analitos. Hay una viscosidad reducida y una difusividad mejorada del agua para permitir una mejor penetración a través de las partículas de la matriz (Teo et al., 2010), por ejemplo, en la recuperación de compuestos fenólicos de las pieles de cebolla con este proceso, la eficiencia de la extracción se ve afectada por la temperatura de extracción y el tamaño de la partícula (Munir et al., 2018). Otros cambios en las propiedades del agua están relacionados con la variación en su polaridad. La constante dieléctrica del agua es aproximadamente 80 a temperatura ambiente, sin embargo, este valor disminuye a 27 a 250 °C, valor que se encuentra cercano al del metanol y el etanol a 25 °C (33 y 24 respectivamente), es decir, a una temperatura elevada, la constante dieléctrica reducida del agua mejora sus propiedades de disolución al tener un valor similar a la del etanol (Wiboonsirikul & Adachi, 2008; Ong et al., 2006). Otras ventajas de la extracción PHW, son:

- Evita el consumo de solventes orgánicos disminuyendo así problemas medioambientales.
- Elevada eficiencia de extracción gracias a la mejora en los efectos de solubilidad y transferencia de masa así como una mayor interrupción del equilibrio de la superficie (Teo et al., 2010).
- Tiempos de extracción cortos.

Sin embargo, se han reportado algunas desventajas asociadas a PHW si las temperaturas de extracción son elevadas como la formación de aldehídos y posibles compuestos generados por las reacciones de Maillard (Saldaña & Valdivieso-Ramírez, 2015), además de la posible degradación de algunos compuestos fenólicos si también se emplean tiempos prolongados. Otro inconveniente de las altas temperaturas usando PHW, es la extracción de algunas proteínas y polisacáridos, disminuyendo así la selectividad de la recuperación (Santos et al., 2019).

### **3.2 Extracción con etanol acuoso presurizado (PAE)**

La adición de algunos modificadores y aditivos orgánicos e inorgánicos pueden mejorar la solubilidad de los analitos en el extractante, aumentar las interacciones de los analitos con el agua y mejorar las tasas de recuperación de los compuestos objetivos (Teo et al., 2010; Ameer et al., 2017). Agregar etanol al agua como modificador permite extraer químicos polares y no polares de diferentes matrices, logra aumentar la solubilidad de los compuestos bioactivos de baja polaridad, como los compuestos fenólicos (Tangkavanich et al., 2013, Klinchongkon et al., 2017; Saldaña & Valdivieso-Ramírez, 2015). Es decir, mejora las propiedades solventes de PHW para extraer familias más amplias de componentes antioxidantes, tal y como se determinó en el trabajo de Ó. Benito-Román et al. (2015), donde la adición de etanol, redujo la cantidad de ácido gálico extraído, pero recuperó ácido síringico, ácido clorogénico, naringenina y

ácido ferúlico. El uso de etanol rompe los enlaces lignina-fenólicos, enlaces de éter de los fenólicos con la lignina, facilitando la despolimerización de la lignina, como también se observó en la extracción de ácido ferúlicos del salvado de arroz (Pazo-Cepeda et al., 2020). Esto ocurre ya que el PAE contiene especies iónicas adicionales de etanol en la solución con una constante dieléctrica, más baja que permite la despolimerización de hemicelulosas y ligninas, produciendo una mayor cantidad de fenoles que la obtenida usando solo agua a presión. La constante dieléctrica del agua a 135 °C es aproximadamente de 47 y la del etanol a la misma temperatura es de aproximadamente 11 (Dannhauser & Bahe, 1964). Estas características permiten que la adición de etanol, reduzca la temperatura óptima del proceso y mejore la eficiencia de extracción de polifenoles (Mariotti-Celis et al., 2018), aunque disminuya el rendimiento de la extracción por el cambio de solubilidad de la mezcla hidroalcohólica, como se determinó en la extracción de la calabaza amarga (Syahariza et al., 2017) por ser una extracción más selectiva que PHW.

Por otra parte, el etanol en agua subcrítica puede afectar negativamente la capacidad de extracción de los carbohidratos, aunque la coextracción de moléculas de baja polaridad, especialmente fitoquímicos bioactivos, debería agregar más funcionalidad para obtener carbohidratos (Klinchongkon et al., 2017). En el caso de la extracción de  $\beta$ -glucanos, polisacáridos sin almidón, un alto contenido de etanol disminuye su rendimiento aunque recupera  $\beta$ -glucanos de mayor peso molecular, evitando su despolimerización y la formación de los productos de degradación de los monómeros (Ó. Benito-Román et al., 2015). Incluso agregar una pequeña cantidad de etanol en el disolvente (16%), puede disminuir hasta en un 50% el contenido de productos de la reacción de Maillard como el hidroximetil furfural (HMF) (Mariotti-Celis et al., 2018).

### **3.3 Extracción con etanol puro presurizado**

El etanol puro, es otro de los disolventes utilizados en la extracción líquida a presión para la recuperación de compuestos bioactivos. Según ciertas investigaciones como la de Battistella Lasta et al. (2019), el etanol puro como solvente puede mejorar la selectividad de la extracción en las hojas y tallos de la remolacha, con un incremento en el contenido fenólico. De la misma manera ocurrió al utilizar hojas de mango (Fernández-Ponce et al., 2015), el etanol puro permitió rendimientos globales más bajos pero resultó ser más selectivo favoreciendo la recuperación de flavonoles, mangiferina y derivados de benzofenona, sin embargo, la actividad antioxidante y el contenido de ácido gálico (usado como antioxidante y conservante en la industria alimentaria) fue mayor en agua y mezclas hidroalcohólicas. Aunque estos estudios parecen afirmar que usar etanol puro es más eficiente, la desventaja del uso de este solvente, se asocia a términos económicos y de sostenibilidad, ya que las mezclas hidroalcohólicas son más favorables que los alcoholes puros (Mustafa & Turner, 2011). Además, otros autores como Pazo-Cepeda et al. (2020), han destacado las mejoras en contenido fenólico y actividad antioxidantes que confiere usar etanol acuoso en las extracciones por PLE, datos que se exponen más adelante en la Tabla 2.

## **4. METODOLOGÍAS PARA EXTRACCIÓN CON FLUIDOS PRESURIZADOS (ETANOL Y AGUA)**

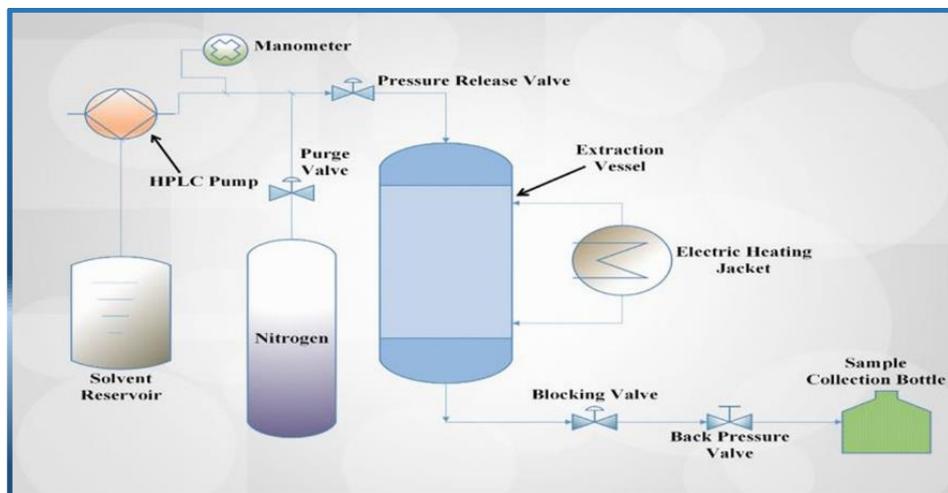
Si bien la temperatura, la presión y el tiempo son parámetros que influyen en la extracción, el equipo que se utiliza para este proceso y el tratamiento de las muestras antes de ser tratadas, son aspectos también importantes en la recuperación de los compuestos bioactivos mediante PLE, ambos se detallan a continuación.

## 4.1 Tratamiento de las muestras

La selectividad y eficiencia de la extracción de PLE se ve afectada por las características de la matriz del subproducto y por la naturaleza del compuesto objetivo. El comportamiento de unión relativa del analito con el disolvente de extracción (solvatación) se ve afectado por el contenido de humedad de la matriz y la distribución del tamaño de la partícula. El tamaño de la partícula de la muestra, debe ser apropiado para maximizar la superficie de contacto y evitar los efectos de canalización (aglomeración de partículas), ya que este parámetro influye en los rendimientos de la extracción, en la velocidad de la transferencia de masa (disminución de las rutas de difusión) y en la cinética de extracción de varios compuestos (Ameer et al., 2017; Arapitsas & Turner, 2008; Ong et al., 2006). En algunas aplicaciones, los dispersantes (por ejemplo, perlas de vidrio) se introducen junto con la muestra en el recipiente de extracción para favorecer la distribución uniforme de la muestra y el extractante. La agitación también se puede utilizar para evitar la formación de aglomerados (Plaza & Turner, 2015). Por lo tanto, es necesario el tratamiento previo de las muestras antes de cargarlas en la celda de extracción. Dicho tratamiento depende del tipo de residuo a tratar, de manera general consiste en una etapa de secado que se realiza al aire o por congelación, luego la molienda de la muestra hasta lograr un tamaño entre 100-1000  $\mu\text{m}$  y por último el tamizado con tamiz de aproximadamente 2 mm (Ong et al., 2006).

## 4.2 Equipos para las extracciones

En general la extracción se lleva a cabo dentro de un recipiente de acero inoxidable que soporta elevadas presiones (R.R. Huerta & Saldaña, 2018). Además del extractor donde se coloca la materia prima, los montajes para realizar la extracción constan generalmente de una bomba de alta presión para inducir el solvente al extractor, un sistema de calentamiento (horno o resistencia eléctrica) y una válvula que permite regular la presión del sistema (back pressure regulator).

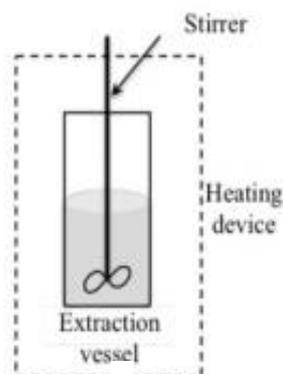


**Figura 1.** Principio esquemático operacional y mecanismo del sistema de extracción de líquido a presión (PLE)(Ameer et al., 2017)

El sistema puede equiparse con un dispositivo refrigerante para un enfriamiento rápido del extracto resultante (Herrero et al., 2006) y evitar así permanecer a altas temperaturas durante un tiempo prolongado y que pueda inducir su degradación. En la Figura 1, se muestra un esquema en el que se pueden ver los diferentes elementos necesarios para hacer la extracción con fluidos presurizados. Los equipos utilizados para realizar una extracción de líquido a presión pueden ser: sistemas por lotes (estáticos) y sistemas de flujo continuo y/o semicontinuos (dinámicos). A continuación se van a presentar las características más importantes de cada uno de ellos.

#### 4.2.1 Sistema por lotes (estáticos)

No requiere una bomba, aunque se puede usar una opcional para suministrar agua al recipiente de extracción. La presión de la operación se eleva al calentar el recipiente hasta la presión de saturación a una temperatura de trabajo dada. La convección se logra usando un agitador para acelerar la transferencia como el que se identifica en la Figura 2. El recipiente de extracción es más ancho que el utilizado en el sistema de flujo continuo.

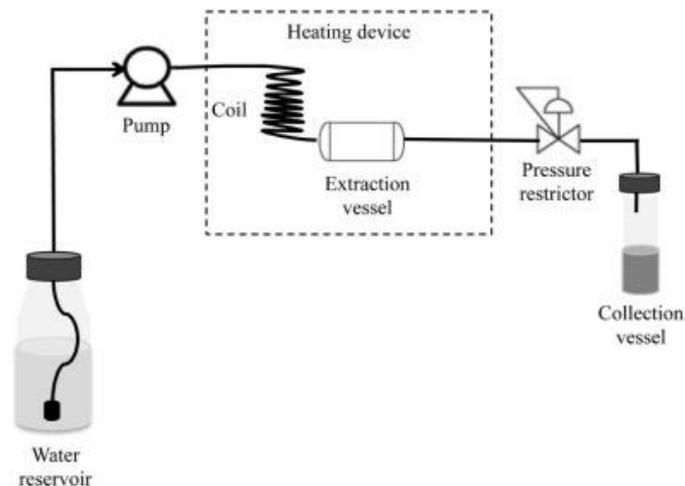


**Figura 2.** Partes principales de un sistema de flujo por lotes (estático) (Plaza & Turner, 2015)

Ser un sistema más simple y fácil de usar, que no necesita una bomba ni un limitador de presión (siempre y cuando se controle la velocidad de la extracción), son sus principales ventajas. Sin embargo, el tiempo de residencia de los analitos es mucho más largo, porque tanto el calentamiento como el enfriamiento del extractor son lentos, lo que puede ocasionar que los analitos térmicamente lábiles se degraden. El tiempo de extracción afecta tanto la eficiencia de extracción como el grado de degradación de los analitos. El equilibrio para la distribución de analitos desde la matriz de muestra al extractante, se estabilizará después de algún tiempo, ya que el volumen del extractante es constante. Por lo tanto, en este caso, la eficiencia de la extracción depende de la relación de distribución de los analitos en el solvente de extracción (Plaza & Turner, 2015). En el estudio sobre la recuperación de compuestos fenólicos a partir de la piel de cebolla, la extracción se llevó a cabo en un reactor comercial de 1 L (reactor de alta presión Serie 4540; Parr Instrument Company, EE. UU.), donde se utilizó varios ciclos de extracción estática (Choi et al., 2015). Estos equipos también pueden ser diseñados y ensamblados por el propio grupo de investigación, un ejemplo de ello se observó en la extracción de compuestos bioactivos de la cáscara de feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret). Los experimentos de PLE se llevaron a cabo en un equipo personalizado ensamblado en el Laboratorio de Termodinámica y Tecnología Supercrítica (LATESC, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil), donde utilizaron una bomba de HPLC (Waters, 515 HPLC, Milford, MA, EE. UU.) (Santos et al., 2019).

#### 4.2.2 Sistema de flujo continuo y/o semicontinuo (dinámicos)

En la Figura 3 se muestra el diagrama del sistema de flujo continuo. En este se necesita una bomba para controlar el flujo, puede ser una bomba HPLC, la cual suministra agua al recipiente de extracción y debe poder alcanzar la presión necesaria para mantener el agua en estado líquido durante el proceso de extracción (normalmente de 3.5 a 20 MPa). El control de la presión, temperaturas y presiones moderadas (es decir, condiciones de extracción típicas para compuestos bioactivos de 100–200 °C y 5–10 MPa), se puede utilizar una columna de HPLC vacía como recipiente de extracción. Sin embargo, si se van a usar temperaturas cercanas al punto crítico (es decir, por encima de 250 °C hacia 374 °C), el recipiente de extracción debe ser de una aleación de metal resistente a la corrosión, para evitar la corrosión del recipiente.



**Figura 3.** Partes de un sistema de flujo continuo (dinámico) (Plaza & Turner, 2015)

Una de las ventajas de este sistema es el tiempo de residencia de los analitos en el agua, a altas temperaturas es más corto que en el sistema por lotes, ya que el disolvente fresco se bombea continuamente a través del recipiente de extracción hacia el vial de recolección. Permite controlar la cinética de extracción y la degradación del analito, ya que la velocidad del flujo controlará el tiempo de residencia. Uno de los desafíos, es la obstrucción de las tuberías el agua con los analitos extraídos se enfría a temperaturas a las que algunos de los analitos extraídos ya no son solubles, por lo que precipitan y bloquean el tubo. Se puede solventar usando una cinta calefactora alrededor del tubo de la salida del horno o usar una bomba adicional para lavar las tuberías después del recipiente de extracción (Plaza & Turner, 2015). En cualquier caso, debe tenerse en cuenta, la temperatura y presión de funcionamiento máximas, el material del recipiente de extracción (se deben utilizar materiales resistentes a la corrosión) y las precauciones generales de seguridad (Herrero et al., 2013; Plaza & Turner, 2015).

### 4.3 Ejemplos de extracciones

A continuación se indican y comentan los resultados de las investigaciones sobre una serie de subproductos de la industria alimentaria utilizados como materia prima en la extracción de compuestos bioactivos. En cada uno de ellos se utiliza la extracción líquida a presión con diferentes proporciones de la mezcla de etanol/agua como solvente.

#### 4.3.1 Residuos de mora (*Rubus fruticosus* L.)

En la industria alimentaria, las moras se usan para producir suplementos dietéticos, zumos, yogures, helados, jaleas y otros dulces (Kafkas et al., 2006). Considerando que es una fruta con una fuente importante de compuestos fenólicos, como ácidos fenólicos, taninos, elagitaninos, flavonoides y antocianinas, se realizó un estudio sobre la extracción de compuestos bioactivos (antocianinas y contenido fenólico total) de los residuos de mora (Machado et al., 2015). En esta investigación, la extracción líquida presurizada (PLE) se realizó en un sistema a de flujo continuo, en una unidad similar a la representada en la Figura 1. En la celda de extracción se colocaron 5 g de residuos de mora (bagazos de cáscara y semillas), se probaron diferentes temperaturas, 60, 80 y 100 °C, utilizando agua pura, etanol puro, agua/etanol (50% v/v) y agua acidificada (pH=2.5) como solventes. Se evaluaron un total de 12 condiciones diferentes, todas a una presión de 750 bar, tiempo de 30 min y una relación disolvente/masa de alimentación constante. Las velocidades de flujo variaron para cada solvente (3,00

mL/min para agua acidificada y agua pura; 3,80 mL/min para etanol puro; y 3,35 mL/min para agua/etanol 50% v/v), tomando en cuenta que sus densidades no son las mismas.

El efecto del incremento de la temperatura se observó de la misma manera en todos los solventes aplicados, aumentó el rendimiento del extracto y el contenido fenólico total (TPC). De la misma manera, aumentó la actividad antioxidante (AA) debido a la posible formación de productos de la reacción de Maillard (relacionados también con el oscurecimiento de las muestras en la extracción) y a la presencia de otros compuestos fenólicos como las procianidinas y los ácidos fenólicos ya que las altas temperaturas disminuían el contenido de antocianinas. Para conocer el contenido fenólico total (TPC) de los extractos, se usó el método espectrofotométrico de Folin Ciocalteu expresado como mg equivalentes de ácido gálico (GAE), patrón que se emplea para hacer la recta de calibrado en este método, en el caso de las antocianinas monoméricas (MA) se empleó el método de pH diferencial, expresado en mg de cianidin-3-rutinósido equivalente (C<sub>3</sub>RE)/g de residuo. La actividad antioxidante (AA) se evaluó con el método DPPH (1,1-difenil-2-picrylhydrazyl) expresado como mmol equivalente de Trolox (mg TE/g de residuo).

La condición óptima de extracción con PLE fue con la mezcla etanol/agua 50% v/v como solvente a 100 °C, extrajo mayor cantidad de fenólicos (7,36 ± 0,18 mg GAE/g residuo fresco) y antocianinas (1,02 ± 0,11 C<sub>3</sub>GE), con mayor actividad antioxidante (7,603 ± 0,105 mmol TE/g residuo fresco) y un rendimiento de 6,33 ± 0,04%. La sinergia positiva entre la temperatura y el disolvente (agua/etanol) contribuyó a la mejora de la extracción de compuestos fenólicos. Al comparar estos resultados con la extracción convencional con etanol, esta última es menos eficiente, con un rendimiento del extracto de 5,51 ± 0,27% y un contenido fenólico menor que en la extracción por PLE, de 4,10 ± 0,71 mg GAE/g residuo fresco.

#### 4.3.2 Cáscara de maracuyá (*Passiflora edulis*)

La cáscara de maracuyá, corresponde a casi el 90% del peso del fruto, que se descarta como residuo durante el procesamiento para la producción del zumo de esta fruta (de Souza et al., 2018). La maracuyá es un fruto que pertenece al género *Passiflora*, los cuales son ricos en compuestos bioactivos con funciones antioxidantes, antimicrobianos y antivirales (Ye et al., 2011). También contienen pectinas, un tipo de carbohidrato que se usa en la industria alimentaria como agente gelificante, espesante y estabilizante para elaborar mermeladas, jaleas y confituras. En una de las investigaciones sobre la recuperación de compuestos bioactivos de la cáscara de maracuyá (Klinchongkon et al., 2017), se analizó el efecto de la adición de etanol en la extracción líquida a presión con agua (0,10, 20 y 30% v/v) agregando 5 g de residuo en un reactor discontinuo a temperaturas de 100, 120, 140 y 160 °C y el tiempo de residencia entre 5,64 y 7,94 min. Los objetivos fueron recuperar (con PLE) y purificar (mediante precipitación) el polisacárido péctico (pectina) del residuo tratado, determinar en este el contenido fenólico total, la composición de azúcares neutros y ácidos urónicos, grado de esterificación, peso molecular, viscosidad y actividad antioxidante (DPPH). En sus resultados, a 160 °C y 30% v/v etanol/agua se obtuvo la mejor cantidad de contenido fenólico (6,02 mg GAE/g polisacárido péctico), mayor que en la extracción convencional (1,85 mg GAE/g polisacárido péctico). Para los polisacáridos pécticos el máximo rendimiento (12,28%) fue a una temperatura de 140 °C y 10% v/v de etanol/agua, siendo su componente principal el ácido galacturónico (72,11 y 94,76% en peso, analizado por HPLC).

El aumento de la concentración de etanol no confirió ventajas con respecto al rendimiento, el peso molecular o la viscosidad de la pectina, fue beneficioso para la actividad antioxidante, con actividades de captación de radicales DPPH que variaban del 34 al 45%. Estos resultados sugirieron que algunos antioxidantes también podrían

extraerse de la cáscara de la fruta de la pasión y precipitarse con polisacárido péctico. Por otra parte, el incremento de la temperatura influyó en el tamaño de la cadena de polisacáridos pécticos obtenida (disminuía el peso molecular de la cadena de polisacáridos), disminuía la viscosidad aparente de las soluciones de este compuesto y aumentó la actividad antioxidante.

Es posible realizar la recuperación de compuestos bioactivos antes de la extracción de la pectina sin pérdida de la calidad de su estructura, tal y como se observó en la investigación de Souza et al. (2018), donde se trabajó con extracción secuencial de flavonoides y pectina de la cáscara de maracuyá mediante PLE. La primera extracción fue para recuperar flavonoides utilizando mezclas de etanol/agua (80, 70, 60, 50% v/v), presión de 103,42 a 117,21 bar, temperatura constante de 80 °C y 10 min de extracción por cada ciclo (3 en total). Los residuos de la primera extracción se utilizaron para recuperar la pectina en 3 ciclos, con una solución acuosa de ácido cítrico al 1% p/v, bajo las mismas condiciones de temperatura y presión descritas.

La cromatografía líquida con detección de matriz de diodos y espectrometría de masas de ionización por electropulverización (LC - DAD - ESI - MS), se utilizó como procedimiento general para investigar los compuestos fenólicos, identificándose los flavonoides C-glucósidos (orientin - 7 - O - glucósido y luteolin - 6 - C - glucósido). Los resultados indican que la mezcla etanol/agua 60% v/v a 80 °C, condujo a un aumento considerable en la recuperación total de polifenoles  $4,67 \pm 0,04$  mg GAE/g de residuo. El método de extracción secuencial desarrollado en este estudio demostró que es viable y ventajoso, dado que fue posible extraer diferentes moléculas, sin pérdida de rendimiento o propiedades químicas. Nuevamente PLE fue más eficiente que la extracción convencional con metanol 50% y acetona 70% con un contenido fenólico total de  $2,05 \pm 0,04$  mg GAE/g de residuo en un tiempo mayor de 1 h.

#### 4.3.3 Cáscara de feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret)

La feijoa también conocida como guayaba de piña, es originaria de las tierras altas del sur de Brasil, de algunas zonas de EE.UU y de Nueva Zelanda (Peng et al., 2019; Santos et al., 2019). Su pulpa es jugosa y dulce, pero su cáscara representa el 50% del peso de la fruta y por ser agria y amarga es descartada durante el procesamiento industrial de la fruta. En el estudio de Santos et al. (2019), realizaron técnicas de extracción a alta presión (PLE) para determinar su eficiencia en términos de rendimiento y recuperación de compuestos bioactivos (contenido total de compuestos fenólicos) de la cáscara de feijoa. Evaluaron el efecto de tres tipos de solventes, agua, etanol y la mezcla etanol /agua 50% v/v, en un equipo personalizado con un sistema continuo y caudal de 3 mL/min, 3 g de materia prima fueron colocados en la celda de extracción. El tiempo total de la extracción fue de 60 min, temperaturas de 40, 55 y 80 °C y presión de 100 bar. En la mezcla de etanol/agua al 50%, se obtuvo el mayor rendimiento global ( $50 \pm 2\%$ ), mayor contenido fenólico total en extracto ( $132 \pm 0,7$  mg GAE/g) y en muestra seca ( $66 \pm 0,4$  mg GAE/g) a la temperatura de 80°C.

El efecto de la temperatura sobre la actividad antioxidante (0,305 mmol TE/g, analizado mediante FRAP) también fue prominente, mayor temperatura conduce a una alta eficiencia de la calidad del extracto. Se identificaron compuestos fenólicos por LC-ESI-MS/MS, los ácidos ferúlico, gálico y eláxico fueron los principales compuestos encontrados en todos los extractos. Los resultados cromatográficos confirmaron la bioactividad de la piel de feijoa, resaltaron la selectividad de PAE al comparar etanol acuoso con otros solventes y sugirieron la presencia de otros compuestos fenólicos como los taninos condensados (proantocianidinas), que se localizan principalmente en la piel de la fruta y promueven la actividad antioxidante y peculiar astringencia (Weston, 2010).

Otros métodos de extracción (ultrasonido, fluidos supercríticos, Soxhlet) fueron realizados en dicho estudio para determinar cuál es el proceso más eficaz en el tratamiento de estos residuos, resultando PLE el método más efectivo. Al compararlo con el método Soxhlet con agua/etanol, aunque en el rendimiento global ( $47 \pm 2\%$ ) no hay diferencias significativas con respecto a la técnica no convencional, el contenido fenólico ( $71 \pm 1$  mg GAE/g en el extracto y  $33,6 \pm 0,6$  mg GAE/g en muestra seca) se ve favorecido en la extracción con PLE.

Las condiciones de extracción de este estudio que permitieron la mejor calidad del extracto coinciden con las utilizadas por Peng et al. (2019). La relación de etanol/agua 50% v/v, el tiempo de 60 min y temperatura de 50 °C, permitieron un contenido fenólico de  $64,71 \pm 0,05$  mg GAE/g de residuo y actividad antioxidante de  $0,401 \pm 0,001$  mmol TE/g de residuo (analizado mediante FRAP) de la cáscara de feijoa. Estos valores son mayores que los obtenidos para la pulpa de feijoa a distintos valores de temperatura y relación de solvente (para una temperatura de 50 °C y relación etanol/agua 50%v/v) el contenido fenólico fue de  $14,58 \pm 1,25$  mg GAE/g y la actividad antioxidante  $0,087 \pm 0,007$  mmol TE/g).

#### 4.3.4 Residuos de juçara (*Euterpe edulis Mart.*)

Juçara (*Euterpe edulis Mart.*), es una palmera tropical ampliamente extendida en el bosque atlántico brasileño. Produce una fruta esférica rica en compuestos fenólicos, especialmente antocianinas las cuales se concentran en las vacuolas celulares de las cáscaras. En el procesamiento industrial de la juçara, la cáscara y la semilla se convierten en residuo. En la extracción de PLE realizada en residuos de juçara (García-Mendoza et al., 2017), se evaluaron cuatro disolventes etanol a 99,5%, mezcla acidificada (pH=2) de etanol y agua (50% v/v), agua pura y agua acidificada (pH=2). Los disolventes se acidificaron con ácido nítrico. Las temperaturas fueron elegidas para evitar la degradación térmica (40, 60 y 80 °C), la presión de 100 bar y el caudal de 1,5 mL/min.

Según esta investigación los resultados óptimos ocurrieron a una temperatura de 80 °C, con una mezcla acidificada de agua/etanol 50% v/v, el contenido fenólico fue de  $51,4 \pm 0,4$  mg GAE/g, mayor que el obtenido por Soxhlet con etanol (21,9 mg GAE/g de residuo seco). Bajo las mismas condiciones, el contenido de las antocianinas monoméricas (MAC) ( $1,80 \pm 0,01$  C<sub>3</sub>RE/g) fue menor que el obtenido en el método convencional ( $10,5 \pm 0,1$  C<sub>3</sub>RE/ g de residuo seco) aunque con una actividad antioxidante mayor de  $119,5 \pm 0,7$  mmol TE/g de residuo seco, en comparación a  $80,2 \pm 0,6$  mmol TE/g de residuo seco del método Soxhlet. El MAC fue mayor al utilizar agua acidificada como solvente a 40 °C ( $9,7$  C<sub>3</sub>RE/g). El contenido de antocianinas monoméricas (MAC) de los extractos se determinó mediante el método de pH diferencial. Se identificaron mediante UPLC cuatro antocianinas cianidin-3-glucósido; cianidin-3-rutinósido; peonidin-3-glucósido; peonidin-3-rutinósido.

En este estudio se concluyó que el aumento de la temperatura en PLE mejoró la recuperación de compuestos fenólicos al mejorar su difusión y solubilidad en diferentes solventes. Sin embargo, las temperaturas superiores a 40 °C condujeron a la degradación térmica de las antocianinas, dando como resultado los bajos rendimientos de extracción. La extracción de antocianinas se favorece con la acidificación del solvente, siendo estas más estables en medios ácidos, donde encuentran condiciones favorables para la formación de iones flavilio, responsable de las coloraciones rojas de las antocianinas monoméricas.

#### 4.3.5 Orujo de uva (*Vitis vinifera L. CV. Syrah*)

EL orujo de uva es el principal residuo sólido de las industrias vinícolas corresponde al 50% de la masa total de la uva, rico en compuestos bioactivos, especialmente de

antocianinas. Es el resultado del proceso de fermentación de la uva, contiene semillas y piel como componentes principales. Actualmente se utiliza como fertilizante, alimento para animales y como sustrato para la extracción de ácido tartárico el orujo de uva (Negro et al., 2003).

La PLE en la extracción del orujo de uva (Pereira et al., 2019), se realizó en una primera parte con una extracción en un solo paso, para determinar las mejores condiciones de reacción. En ella se utilizaron temperaturas de 40, 60, 80, 100 °C, los solventes etanol puro, mezcla agua/etanol (50% v/v), mezcla acidificada (agua/etanol pH= 2,0) al 50% v/v. La presión y el caudal másico de disolvente se mantuvieron constantes a 100 bar y 5,0 g/min, respectivamente. Luego, con las condiciones óptimas de temperatura, solvente y tiempo, se dividió el proceso en dos pasos secuenciales para recuperar primero las antocianinas y luego los compuestos fenólicos. El primer paso se realizó a 40 °C con agua/etanol pH = 2,0 (50% p/p) como disolvente, y el segundo se realizó a 100 °C con agua/etanol (50% p/p).

El proceso PLE secuencial permite recuperar antocianinas y compuestos fenólicos con altos rendimientos utilizando condiciones de extracción adecuadas para cada grupo de compuestos. Informaron que el contenido de antocianinas monoméricas más alto fue de  $10,21 \pm 0,53$  mg Mv-3-glc/g, expresada como malvidina-3-O-glucósido la principal antocianina encontrada en uvas (Rockenbach et al., 2011) por gramo de residuo, este resultado se logró en la extracción con el disolvente acidificado dada su estabilidad en este medio (etanol/agua 50% v/v con pH 2,0 a 40 °C), tal y como ocurrió en PLE de residuos de juçara (*Euterpe edulis Mart*). El mayor contenido fenólico ( $65,68 \pm 2,24$  mg GAE/g) se obtuvo a 100 °C, con la mezcla etanol/agua 50% v/v y la actividad antioxidante fue de 1452 mg TE/g (mediante FRAP). Esto indica que la capacidad antioxidante de los extractos se debe principalmente a sus compuestos fenólicos.

#### 4.3.6 Calabaza amarga (*Momordica charantia*)

La fruta de la calabaza amarga (*Momordica charantia*) es oblonga y se asemeja a un pequeño pepino. Crece en áreas tropicales de Asia, Amazonia, África Oriental y el Caribe. Es conocida por sus diversas propiedades medicinales (como antidiabético, antihelmíntico, anticonceptivo, antipalúdico y laxante) (Grover & Yadav, 2004) y culinarios como la elaboración de yogurt (Park et al., 2018) y como aditivo alimentario. Estas cualidades se deben a su alto poder antioxidante por el contenido de compuestos polifenólicos presentes en ellos. Por lo tanto Syahariza et al.,(2017) investigaron la extracción líquida presurizada de esta fruta con etanol acuoso (20, 50, 80% v/v), con temperaturas entre 45, 60, 110, 175 °C y tiempos de 5, 10, 24, 38 min, en un extractor de solvente acelerado, obteniendo un contenido fenólico total de  $54 \pm 3$  mg GAE/g de residuo, contenido total de flavonoides (TFC) 15 mg QE/g de residuo seco (mg equivalentes de quercetina QE) y actividad antioxidante de 0,778 mmol FS/g de residuo (FRAP) a 80% v/v de etanol, 160°C y 10 min.

Concluyeron, que la actividad antioxidante (de la calabaza se relaciona con la temperatura de extracción y la concentración de etanol en lugar del tiempo de procesamiento, lo que favorece la optimización de estos parámetros para un tratamiento industrial. La extracción convencional se realizó en una instalación Soxhlet usando como disolvente etanol acuoso al 90% a 80°C durante 240 min, el contenido fenólico total ( $8 \pm 0,9$  mg GAE/g), el TFC ( $3 \pm 0,4$  mg QE/g) y actividad antioxidante de  $0,065 \pm 0,005$  mmol FS/g de residuo seco, con este método fueron menores los valores que los conseguidos con PLE.

#### 4.3.7 Cebada cerosa (*Hordeum vulgare*)

La cebada (*Hordeum vulgare*) es considerada un alimento saludable debido a su alto contenido en  $\beta$ -glucanos y antioxidantes fenólicos, siendo predominante el ácido ferúlico, seguido por el ácido p-cumárico (Abdel-Aal et al., 2012). Estos compuestos son utilizados en la industria como ingredientes alimentarios. Empleando un sistema de extracción de fluidos presurizados con un reactor discontinuo, Ó. Benito-Román et al. (2015), evaluaron las condiciones óptimas de extracción, presión (25 bar), temperatura (135 – 175 °C), porcentaje de etanol (5 – 20%) y tiempo (15 a 55 min), para recuperar cuatro tipos de compuestos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, un flavano y flavonoles) y un derivado del ácido ferúlico y  $\beta$ -glucanos de alto peso molecular de la cebada cerosa. Entre sus resultados más importantes se tiene que los  $\beta$ -glucanos y los compuestos fenólicos tienen una tendencia completamente opuesta durante la extracción.

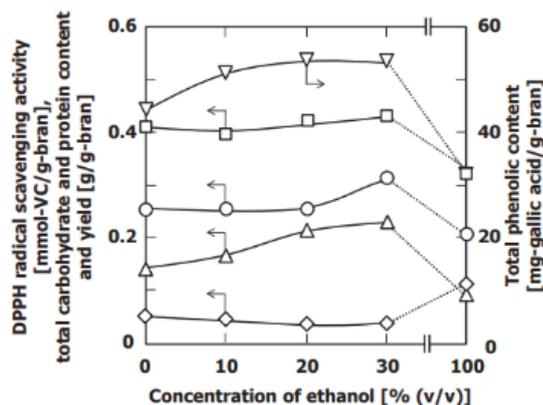
Altas temperaturas y largos tiempos de extracción (> 35 min) resultan en bajas concentraciones de  $\beta$ -glucano y alto contenido fenólico en el extracto líquido. Las mezclas de etanol acuoso presurizado en altas temperaturas tienden a degradar el  $\beta$ -glucano, pero son útiles para extraer ácido hidroxicinámico (fuertemente ligado a la lignina). La temperatura es el factor principal para la extracción de fenólicos seguido de sus interacciones con el tiempo y el etanol. La interacción temperatura-tiempo son factores importantes en cualquier contenido de etanol para la alta actividad antioxidante y contenido fenólico en los extractos. La cantidad total de ácidos hidroxibenzoicos (principalmente ácidos gálico y siríngico) fue mayor que la de ácidos hidroxicinámicos (principalmente ferúlico y p-ácidos cumáricos), probablemente debido a los fuertes enlaces entre los ácidos hidroxicinámicos y la lignina.

Los procesos convencionales conducen a un producto  $\beta$ -glucano de bajo peso molecular y un bajo rendimiento de extracción, en condiciones de 55 °C y 3 h, el peso molecular promedio resultó de 55 kDa (Ó. Benito-Román et al., 2015). Al compararlo con los resultados de la investigación es menos eficiente, las condiciones en PAE para obtener extractos líquidos ricos en  $\beta$ -glucanos y compuestos fenólicos deben ser suaves (151 °C, 21 min y 16% de etanol) el rendimiento de extracción de  $\beta$ -glucanos fue de 51% con un peso molecular de 500-600 kDa y 5 mg de GAE/g de cebada. Los flavonoides, se extrajeron a 175 °C, con 12,5% de etanol durante 55 min, con mayor cantidad de flavanos que de flavonoles, el TPC bajo estas condiciones fue de 10,71 mg GAE/g y la actividad antioxidante 111,58 mmol FS/g (mmol de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  por gramo de cebada).

#### 4.3.8 Salvado de arroz desgrasado (*Oryza sativa*)

El salvado de arroz (*Oryza sativa*), es un subproducto del proceso de molienda o pulido del arroz integral para producir más arroz blanco visualmente atractivo. Para desgrasarlo se utilizó la extracción por Soxhlet con éter de petróleo como disolvente. El salvado de arroz desgrasado encuentra usos en alimentos para animales y fertilizantes, aun así la mayor parte se descarta como residuos de producto agrícola. Chiou et al. (2012), trabajaron con concentraciones de etanol entre 10 y 100%, temperaturas de 120 a 137 °C y tiempos entre 5 y 60 min. Informaron que el contenido fenólico total más alto obtenido fue de 53,3 mg GAE/g y la actividad antioxidante 0,230 mmol VC/g, con una mezcla subcrítica de agua con 20% v/v etanol a 237 °C por 5 minutos.

Además, se determinó el efecto del etanol en esta extracción, comparándose en este caso con la recuperación de compuestos bioactivos con agua pura a las mismas condiciones de temperatura, tiempo y presión, siendo más efectiva la mezcla de agua y etanol, con la cual, se puede extraer más eficazmente proteínas, carbohidratos y compuestos fenólicos del salvado de arroz desgrasado como lo reportaron en la Figura 4. Las cantidades de sustancias funcionales en los extractos no siempre fueron proporcionales al rendimiento de extracción.



**Figura 4.** Contenido total de carbohidrato (◇), DPPH radical scavenging activity (△), contenido total de proteína (○), rendimiento (□) y contenido fenólico total (▽) de los extractos obtenidos de salvado de arroz tratado a varias concentraciones de etanol a 237°C por 5 min (Chiou et al., 2012).

#### 4.3.9 Tallo de paja de arroz

La paja de arroz es un residuo agrícola utilizado para analizar la recuperación de compuestos bioactivos mediante PLE (Tangkhavanich et al., 2013). En esta investigación se empleó un sistema por lotes a temperaturas de 170 °C a 230 °C, variando el contenido de etanol en el solvente de extracción de 0 a 100%. El efecto de la temperatura y de la concentración de etanol, fueron objetos de estudio. El contenido total de compuestos fenólicos fue de  $45,2 \pm 1,1$  mg GAE/g de residuo obteniéndose el mayor rendimiento con la mezcla subcrítica de etanol y agua de 75% v/v a 230 °C. La concentración de etanol tuvo un ligero efecto sobre la cantidad de los compuestos fenólicos extraídos, pero influyó especialmente en el tipo de compuestos fenólicos disueltos en el fluido subcrítico. La actividad captadora de radicales de los extractos obtenidos con etanol subcrítico ( $< 0,1$  mmol-VC/g) fue menor que el de los extractos obtenidos utilizando agua subcrítica y mezclas de etanol/agua (0,308 mmol-VC/g). La temperatura de tratamiento más alta también proporcionó a los extractos un contenido fenólico total y una actividad antioxidante más altos. Tal y como se detectó en otros residuos como el de orujo de uva, de mora y las cáscaras de feijoa, la actividad antioxidante y el contenido fenólico, son dos valores directamente proporcionales.

#### 4.3.10 Paja de cebada y canola

Cultivos agrícolas como el de la cebada y canola, generan grandes cantidades de paja, biomasa lignocelulósica renovable con biocompuestos que puede ser utilizada como materia prima para extraerlos. En la investigación de Raquel Razzera Huerta & Saldaña, (2018) se concluyó que la temperatura y la concentración de etanol influyen en la eliminación o recuperación de compuestos bioactivos. El tratamiento de esta biomasa puede producir compuestos valiosos, como carbohidratos y fenólicos, de utilidad en las industrias química, alimentaria y farmacéutica. Los azúcares se pueden eliminar de la hemicelulosa y la celulosa, mientras que los compuestos fenólicos se pueden obtener mediante la escisión de los enlaces, uniendo la hemicelulosa con la lignina. La extracción se realizó en un sistema de flujo semicontinuo a temperaturas de 140 °C a 220 °C, con presiones entre 50 a 200 bar y concentraciones de etanol de 0 a 100% (v/v), siendo las más favorables 180 °C, 50 bar y 20% de etanol, para dar como resultado un TPC de  $45,4 \pm 1,8$  mg GAE/g y actividad antioxidante de  $63,8 \pm 1,9$  mmol FeSO<sub>4</sub>/g (FRAP) de paja de cebada;  $52,9 \pm 2,0$  mg GAE/g y actividad antioxidante de  $69,1 \pm 2,7$  mmol FeSO<sub>4</sub>/g (FRAP) de paja de canola. El aumento de la concentración de etanol en sistemas presurizados aumenta la cantidad de azúcares

hemicelulósicos y disminuye la cantidad de fenoles totales en los hidrolizados debido a cambios en la constante dieléctrica del solvente (Ó. Benito-Román et al., 2015).

#### 4.3.11 Salvado de trigo

El salvado de trigo es un subproducto de la molienda del grano de trigo que se acumula en grandes cantidades durante la producción de harina de trigo blanco. Es una materia prima importante para extraer componentes de valor añadido, sin embargo, se utiliza principalmente como ingrediente de bajo valor en la alimentación animal (Pazo-Cepeda et al., 2020). El ácido ferúlico (FA), es el compuesto fenólico más abundante en el salvado de trigo, tiene aplicaciones comerciales en alimentos (agente conservante, propiedades formadoras de gel, precursor del sabor), salud (antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio) y cosmético.

En la investigación de Pazo-Cepeda et al., (2020) se realizó la recuperación de ácido ferúlico y compuestos bioactivos en un reactor discontinuo mezclando 2,6 g de salvado de trigo con 130 mL de solvente y una velocidad de agitación en 800 rpm, con soluciones de etanol acuoso presurizado, con concentraciones de etanol en agua de 0, 20, 5 y 80%, temperaturas de 130, 145, 160 °C y tiempos de extracción 20, 40, 60 min. Se observó que la extracción de FA aumenta con cantidades más bajas de etanol, mientras que el contenido fenólico (TPC) no se ve afectado por el porcentaje de etanol en el solvente, en ambos casos, con tiempos largos y altas temperaturas. Las mejores condiciones para la extracción de FA fueron 20% de etanol, 160 °C y 40 min, lo que llevó a  $0,2268 \pm 0,0014$  mg FA/g correspondiente a un rendimiento de extracción de 8,8%. En el caso del TPC las mejores condiciones fueron a 160 °C, 50% de etanol y 60 min, se obtuvo 13,8 mg GAE/g.

#### 4.3.12 Café molido agotado

El café es uno de las bebidas más consumidas en diferentes partes del mundo y que generan grandes cantidades de residuos que representan graves problemas ambientales. Este residuo se obtiene después de procesar el café tostado con agua y se conoce como café molido agotado (SCG siglas en inglés). Mariotti-Celis et al. (2018), combinaron la extracción por PLE con la purificación de resinas para obtener extractos de polifenoles de SCG. Para la extracción líquida a presión se trabajó con temperaturas entre 60 y 90°C y un contenido de etanol de 0 a 16%.

La presencia de etanol en la etapa de extracción puede reducir la recuperación de polifenoles en la etapa de purificación de la resina (RP) posterior, ya que la elución de estos compuestos se realiza con una mezcla de etanol/agua, razón por la cual se seleccionó un bajo porcentaje de etanol en PAE. Sin embargo, la adición de etanol hasta el 16% en la etapa de extracción muestra recuperaciones generales superiores al 90% para ácido 4-feruloilquínico, ácido 5-feruloilquínico y epicatequina, aunque algunos polifenoles, como ácido gálico, ácido cafeico, ácido-cumaroilquínico, el ácido 3,5-dicafeoilquínico y el ácido 3-feruloil-4-cafeoilquínico no se recuperaron en el extracto purificado, resultando un contenido fenólico de  $13,87 \pm 0,01$  mg GAE/g. Además. El tostado de los granos de café se realiza comúnmente a temperaturas extremadamente altas (~ 220 ° C), lo que desencadena la generación de compuestos de Maillard como HMF. Otro resultado importante de este estudio, fue destacar la disminución de HMF de los extractos de SCG (~ 50%) con la adición de etanol.

En la Tabla 2, se resumen los valores más importantes destacados en cada uno de los trabajos presentados hasta ahora, como las condiciones en las que se llevó a cabo la extracción óptima así como los principales resultados obtenidos como la actividad antioxidante y el rendimiento de extracción máximo.

**Tabla 2.** Resumen de condiciones de extracción de la recuperación de compuestos bioactivos de diferentes subproductos de la industria alimentaria mediante la extracción líquida con etanol/agua presurizadas

Materia Prima	Compuestos bioactivos	Condiciones de operación				Máximo rendimiento				Contenido total	AA	Fuente
		%etanol	min	°C	bar	%etanol	min	°C	bar			
Residuos Mora	Compuestos fenólicos Antocianinas	50	30	60-100	750	50	-	100	750	7,36 mgGAE/g  1,02 mgC <sub>3</sub> GE/g	7,603 mmolTE/g (DPPH)	Machado et al., 2015
Cáscara Maracuyá	Polisacáridos pécticos	0 a 30	5,64-7,94	100-160	-	10	6,9	140	-	-	-	Klinchongkon et al., 2017
	Compuestos fenólicos					30	7,94	160	-	6,02 mgGAE/g		
	Flavonoides					50 a 80	10	80	103,42-117,21	60	10	
Cáscara feijoa	Compuestos fenólicos	0-50	60	40-80	100	50	60	80	100	132 mgGAE/gext  66 mgGAE/g	0,305 mmolTE/g (FRAP)	Santos et al., 2018
		0-50	60	40-80	-	50	60	50	-	64,71 mgGAE/g	0,401 mmolTE/g (FRAP)	Peng et al. 2019
Residuos juçara	Compuestos fenólicos Antocianinas	0-50-99,5	-	40-80	100	50 (pH=2)  0 (pH=2)	-	80  40	100	51,4 mgGAE/g  9,7 C <sub>3</sub> RE/g	119,5 mmolTE/g (DPPH)	Garcia-Mendoza et al., 2017
Orujo de uva	Compuestos fenólicos Antocianinas	0-50	-	40-100	10	50  50 (pH=2,0)	-	100  40	10	65,68 mgGAE/g  10,21 mgMv-3-glc/g	1452,00 mgTE/g (FRAP)	Pereira et al., 2019

Materia Prima	Compuestos Bioactivos	Condiciones de operación				Máximo rendimiento				Contenido Total	AA	Fuente
		%etanol	min	°C	bar	%etanol	min	°C	bar			
Calabaza amarga	Compuestos fenólicos	20-50-80	5,5-42,5	45,5-175,5	-	80	10	160	-	54 mgGAE/g	0,778 mmolFS/g	Syahariza et al., 2017
	Flavonoides									15 mgQE/g		
Cebada Cerosa	β-glucanos	5 a 20	15-55	135-175	25	16	21	151	-	5 mgGAE/g	11158 mmolFS/g (FRAP)	Benito et al., 2015
	Compuestos fenólicos (Flavonoides)					12,5	55	175	-	10,71 mgGAE/g		
Salvado arroz	Compuestos fenólicos	10 a 100	5-60	120-137	-	20	5	237	-	53,3 mgGAE/g	0,230 mmolVC/g	Chiou et al. 2012
Tallo arroz	Compuestos fenólicos	0 a 100	-	170-230	-	75	-	230	-	45,2 mgGAE/g	0,308 mmolVC/g	Tangkhavanich et al., 2013
Paja cebada	Compuestos fenólicos	0 a 100		140-220	50-200	20	-	180	50	45,4 mgGAE/g	63,8 mmolFS/g (FRAP)	Razzera et al., 2017
Paja canola	Compuestos fenólicos	0 a 100	-	140-220	50-200	20	-	180	50	52,9 mgGAE/g	69,1 mmolFS/g (FRAP)	Razzera et al., 2017
Salvado de trigo	Ácido ferúlico	0 a 80	20-60	130-160	-	20	40	160	-	0,2268 mgFA/g	-	Pazo-Cepeda et al., 2020
	Compuesto fenólicos					50	60	160	-	13,8 mgGAE/g		
Café molido gastado	Compuestos fenólicos (polifenoles)	0 a 16	-	60-90	-	16	-	90	-	13,87 mgGAE/g	-	Mariotti et al., 2018

Los resultados de reportan por gramos de residuo o materia seca, gext indica gramos de extracto. La actividad antioxidante (AA) de los extractos se expresó como mmol equivalente de Trolox (TE)/g de residuo y en otros casos como mmolVCEquiv/g, donde se usó el ácido L-ascórbico como estándar. El poder antioxidante férrico (FRAP) se expresó en mmol Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(FS)/g de residuo. La cantidad de antocianinas monoméricas (MAC) de los extractos se expresó en mg de cianidin-3-rutinósido equivalente (C<sub>3</sub>RE)/g de residuo y en mg malvidina-3-O-glucósido (mgMv-3-glc)/g de residuo. El contenido fenólico total se expresó en mg de equivalente del ácido gálico (GAE) /g de residuo. El contenido fenólico se expresó como mg equivalentes de quercetina QE/g de residuo.

## 5. CONCLUSIONES

El creciente interés de la industria alimentaria por emplear antioxidantes naturales como aditivos e ingredientes en lugar de antioxidantes sintéticos, ha impulsado el estudio de diferentes técnicas para recuperar compuestos bioactivos de desperdicios o subproductos de alimentos. La extracción líquida presurizada es una de estas técnicas, seleccionada como la más eficiente para recuperar compuestos bioactivos por su baja toxicidad y tiempos de extracción más cortos, en comparación a la extracción convencional.

La mezcla de etanol/agua como solvente, mejora las extracciones líquidas presurizadas de compuestos bioactivos en residuos de la industria alimentaria. En el presente trabajo se ha evaluado el efecto del empleo de mezclas etanol/agua presurizadas en la recuperación de diferentes tipos de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industria alimentaria de muy diversa naturaleza. La cantidad de etanol óptima puede variar entre 12,5 a 75% v/v y la temperatura entre 40 y 230 °C. Ambos parámetros, han presentado una relación importante que influye significativamente en la eficiencia de las extracciones, por lo tanto, la selección de un rango de temperatura y del porcentaje de etanol en PAE, va a depender principalmente del residuo y del tipo de compuesto a recuperar. Al aumentar el contenido de etanol, se favorece la solubilidad de compuestos fenólicos (como los flavonoides) y la disminución de la temperatura del proceso. Sin embargo, no es muy recomendable para la recuperación de ácido gálico y antocianinas, estas últimas, necesitan de un medio ácido para su extracción y de bajas temperaturas.

De forma general se ha podido ver que el empleo de mezclas etanol/agua como solvente disminuye el rendimiento de obtención de extracto en comparación con los obtenidos mediante PHW, sin embargo, aumenta su contenido fenólico total y la actividad antioxidante, ambas características necesarias para un extracto de calidad, que pueda ser empleado en la industria alimentaria.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Ameer, K., Shahbaz, H. M., & Kwon, J.-H. (2017). Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 295–315. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12253>
- Arapitsas, P., & Turner, C. (2008). Pressurized solvent extraction and monolithic column-HPLC/DAD analysis of anthocyanins in red cabbage. *Talanta*, 74(5), 1218–1223. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.08.029>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Banerjee, J., Singh, R., Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D., Patti, A. F., & Arora, A. (2017). Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food Chemistry*, 225, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.093>
- Bart, H.-J. (2011). Extraction of Natural Products from Plants - An Introduction. In *Industrial Scale Natural Products Extraction*.

<https://doi.org/10.1002/9783527635122.ch1>

- Bartłomiej, S., Justyna, R.-K., & Ewa, N. (2012). Bioactive compounds in cereal grains – occurrence, structure, technological significance and nutritional benefits – a review. *Food Science and Technology International*, 18(6), 559–568. <https://doi.org/10.1177/1082013211433079>
- Battistella Lasta, H. F., Lentz, L., Gonçalves Rodrigues, L. G., Mezzomo, N., Vitali, L., & Salvador Ferreira, S. R. (2019). Pressurized liquid extraction applied for the recovery of phenolic compounds from beetroot waste. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101353>
- Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., Devkota, H. P., Orhan, I. E., Patra, J. K., Das, G., Nabavi, S. M., & Atanasov, A. G. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 100, 82–102. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.018>
- Benito-Román, Ó., Alvarez, V. H., Alonso, E., Cocero, M. J., & Saldaña, M. D. A. (2015). Pressurized aqueous ethanol extraction of  $\beta$ -glucans and phenolic compounds from waxy barley. *Food Research International*, 75, 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.006>
- Benito-Román, O., Varona, S., Sanz, M. T., & Beltrán, S. (2019). Valorization of rice bran: Modified supercritical CO<sub>2</sub> extraction of bioactive compounds. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.08.005>
- Chiou, T.-Y., Neoh, T. L., Kobayashi, T., & Adachi, S. (2012). Properties of extract obtained from defatted rice bran by extraction with aqueous ethanol under subcritical conditions. *Food Science and Technology Research*, 18(1), 37–45. <https://doi.org/10.3136/fstr.18.37>
- Choi, I. S., Cho, E. J., Moon, J.-H., & Bae, H.-J. (2015). Onion skin waste as a valorization resource for the by-products quercetin and biosugar. *Food Chemistry*, 188, 537–542. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.028>
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582.
- Dannhauser, W., & Bahe, L. W. (1964). Dielectric constant of hydrogen bonded liquids. III. Superheated alcohols. *The Journal of Chemical Physics*, 40(10), 3058–3066. <https://doi.org/10.1063/1.1724948>
- de Souza, C. G., Rodrigues, T. H. S., e Silva, L. M. A., Ribeiro, P. R. V., & de Brito, E. S. (2018). Sequential extraction of flavonoids and pectin from yellow passion fruit rind using pressurized solvent or ultrasound. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1362–1368. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8601>
- Elder, A. S., Coupland, J. N., & Elias, R. J. (2019). Antioxidant activity of a winterized, acetic rye bran extract containing alkylresorcinols in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 272, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.011>
- Fernández-Ponce, M. T., Casas, L., Mantell, C., & De La Ossa, E. M. (2015). Use of high pressure techniques to produce *Mangifera indica* L. leaf extracts enriched in potent antioxidant phenolic compounds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 29, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.04.006>
- García-Mendoza, M. D. P., Espinosa-Pardo, F. A., Baseggio, A. M., Barbero, G. F., Maróstica Junior, M. R., Rostagno, M. A., & Martínez, J. (2017). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues

- using pressurized liquids and supercritical fluids. *Journal of Supercritical Fluids*, 119, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.08.014>
- Grover, J. K., & Yadav, S. P. (2004). Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(1), 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.03.035>
- Herrero, M., Castro-Puyana, M., Mendiola, J. A., & Ibañez, E. (2013). Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 43, 67–83. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.12.008>
- Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review. *Food Chemistry*, 98(1), 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.058>
- Howard, L., & Pandjaitan, N. (2008). Pressurized liquid extraction of flavonoids from spinach. *Journal of Food Science*, 73(3). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00658.x>
- Huerta, R.R., & Saldaña, M. D. A. (2018). Pressurized fluid treatment of barley and canola straws to obtain carbohydrates and phenolics. *Journal of Supercritical Fluids*, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.11.029>
- Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J. A., & Castro-Puyana, M. (2012). Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: Macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates. In *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications* (Vol. 9781461412). [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1247-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1247-2_2)
- Kafkas, E., Koşar, M., Türemiş, N., & Başer, K. H. C. (2006). Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food Chemistry*, 97(4), 732–736. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.023>
- Kala, H. K., Mehta, R., Sen, K. K., Tandey, R., & Mandal, V. (2016). Critical analysis of research trends and issues in microwave assisted extraction of phenolics: Have we really done enough. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 85, 140–152. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.09.007>
- Klinchongkon, K., Chanthong, N., Ruchain, K., Khuwijitjaru, P., & Adachi, S. (2017). Effect of Ethanol Addition on Subcritical Water Extraction of Pectic Polysaccharides from Passion Fruit Peel. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5). <https://doi.org/10.1111/jfpp.13138>
- Kronholm, J., Hartonen, K., & Riekkola, M.-L. (2007). Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(5), 396–412. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.03.004>
- Lee, H. J., Lee, E. H., Jung, S. H., Lee, D. U., & Kim, C. Y. (2011). Solvent composition effects on efficiency of pressurized liquid extraction of bioactive isoflavonoids from *Belamcanda chinensis* rhizomes. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 34(2), 143–154. <https://doi.org/10.1080/10826076.2011.540921>
- Machado, A. P. D. F., Pasquel-Reátegui, J. L., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2015). Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: A comparison with conventional methods. *Food Research International*, 77, 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.042>
- Mariotti-Celis, M. S., Martínez-Cifuentes, M., Huamán-Castilla, N., Vargas-González, M., Pedreschi, F., & Pérez-Correa, J. R. (2018). The antioxidant and safety properties

- of spent coffee ground extracts impacted by the combined hot pressurized liquid extraction–resin purification process. *Molecules*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/molecules23010021>
- Munir, M. T., Kheirkhah, H., Baroutian, S., Quek, S. Y., & Young, B. R. (2018). Subcritical water extraction of bioactive compounds from waste onion skin. *Journal of Cleaner Production*, 183, 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.166>
- Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>
- Negro, C., Tommasi, L., & Miceli, A. (2003). Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, 87(1), 41–44. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00202-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00202-X)
- Ong, E. S., Cheong, J. S. H., & Goh, D. (2006). Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *Journal of Chromatography A*, 1112(1–2), 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.052>
- Ou, S., & Kwok, K.-C. (2004). Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1261–1269. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1873>
- Park, S., Lee, S., & Kim, M. (2018). Quality characteristics and functionality of yogurt added with momordica charantia L. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 47(12), 1251–1258. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2018.47.12.1251>
- Pazo-Cepeda, V., Benito-Román, Ó., Navarrete, A., & Alonso, E. (2020). Valorization of Wheat Bran: Ferulic Acid Recovery Using Pressurized Aqueous Ethanol Solutions. *Waste and Biomass Valorization*, 11(9), 4701–4710. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00787-7>
- Peng, Y., Bishop, K. S., & Quek, S. Y. (2019). Extraction optimization, antioxidant capacity and phenolic profiling of extracts from flesh, peel and whole fruit of New Zealand grown feijoa cultivars. *Antioxidants*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/antiox8050141>
- Pereira, D. T. V., Tarone, A. G., Cazarin, C. B. B., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2019). Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc. *Journal of Food Engineering*, 240, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.07.019>
- Plaza, M., & Turner, C. (2015). Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 71, 39–54. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.022>
- Ravindran, R., & Jaiswal, A. K. (2016). Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. *Trends in Biotechnology*, 34(1), 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.008>
- Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N., & Pohl, C. (1996). Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033–1039. <https://doi.org/10.1021/ac9508199>
- Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliri, V., Genovese, M. I., Goncalves, A. E. D. S. S., & Fett, R. (2011). Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry*, 127(1), 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.137>

- Saldaña, M. D. A., & Valdivieso-Ramírez, C. S. (2015). Pressurized fluid systems: Phytochemical production from biomass. *Journal of Supercritical Fluids*, *96*, 228–244. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.09.037>
- Santos, P. H., Baggio Ribeiro, D. H., Micke, G. A., Vitali, L., & Hense, H. (2019). Extraction of bioactive compounds from feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) peel by low and high-pressure techniques. *Journal of Supercritical Fluids*, *145*, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.12.016>
- Starmans, D. A. J., & Nijhuis, H. H. (1996). Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *7*(6), 191–197. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)10020-0](https://doi.org/10.1016/0924-2244(96)10020-0)
- Syahaariza, Z. A., Torkamani, A. E., Norziah, H. M., Mahmood, W. A. K., & Juliano, P. (2017). Optimisation of pressurised liquid extraction for antioxidative polyphenolic compound from *Momordica charantia* using response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, *52*(2), 480–493. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13304>
- Tangkavanich, B., Oishi, Y., Kobayashi, T., & Adachi, S. (2013). Properties of rice stem extracts obtained by subcritical water/ethanol treatment. *Food Science and Technology Research*, *19*(4), 547–552. <https://doi.org/10.3136/fstr.19.547>
- Teo, C. C., Tan, S. N., Yong, J. W. H., Hew, C. S., & Ong, E. S. (2010). Pressurized hot water extraction (PHWE). In *Journal of Chromatography A* (Vol. 1217, Issue 16, pp. 2484–2494). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.050>
- Veggi, P. C., Cavalcanti, R. N., & Meireles, M. A. A. (2014). Production of phenolic-rich extracts from Brazilian plants using supercritical and subcritical fluid extraction: Experimental data and economic evaluation. *Journal of Food Engineering*, *131*, 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.01.027>
- Wang, Y., Gao, Y., Ding, H., Liu, S., Han, X., Gui, J., & Liu, D. (2017). Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, *218*, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.058>
- Weston, R. J. (2010). Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. *Food Chemistry*, *121*(4), 923–926. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.047>
- Wiboonsirikul, J., & Adachi, S. (2008). Extraction of functional substances from agricultural products or by-products by subcritical water treatment. *Food Science and Technology Research*, *14*(4), 319–328. <https://doi.org/10.3136/fstr.14.319>
- Ye, X.-Q., Chen, J.-C., Liu, D.-H., Jiang, P., Shi, J., Xue, S., Wu, D., Xu, J.-G., & Kakuda, Y. (2011). Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. *Food Chemistry*, *124*(4), 1561–1566. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.013>
- Zhao, L., Zhao, G., Chen, F., Wang, Z., Wu, J., & Hu, X. (2006). Different effects of microwave and ultrasound on the stability of (all-E)-astaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(21), 8346–8351. <https://doi.org/10.1021/jf061876d>