



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Máster en Técnicas Avanzadas en Química. Análisis y Control
de Calidad Químicos**

**Recuperación de compuestos con propiedades antioxidantes a
partir de residuos de la industria del café**

Autor: Marta Sagredo Acitores

Tutor/es: Juan Carlos López Linares y Juan José Jiménez Sevilla





El presente documento ha sido firmado en virtud de la Ley 59/2003 de 19 de Diciembre. El C.V.D. asignado es: 0005-A8AC-B22E-0D95*00A5-7F41. Para cotejar el presente con su original electrónico acceda a la Oficina Virtual de la Universidad de Valladolid, y a través del servicio de Verificación de Firma introduzca el presente C.V.D. El documento resultante en su interfaz WEB deberá ser exactamente igual al presente. El/los firmante/s de este documento es/son: MARTA SAGREDO ACITORES a fecha: 2020-06-22 lun 16:13:39 CEST



El presente Trabajo Fin de Máster, perteneciente al Máster Técnicas Químicas. Análisis y Control de Calidad, se realiza dentro del marco del proyecto "**VALORIZACIÓN DE RESIDUOS AGROALIMENTARIOS PRODUCIDOS EN CASTILLA Y LEÓN PARA LA RECUPERACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS MEDIANTE TECNOLOGÍAS ECO-EFICIENTES**" (Junta de Castilla y León, Ref. VA028G19) y concedido al Grupo de Investigación Reconocido de Tecnología de Procesos Químicos y Bioquímicos (GIR 30) de la Universidad de Valladolid. En el TFM colaboran profesores de la Unidad de Procesos Químicos y Bioquímicos y de la Unidad de Química Analítica, MedioAmbiente y Quimiometría pertenecientes al Instituto de Procesos Sostenibles de la misma universidad.



Resumen

Con la valorización de residuos de la industria alimentaria en el marco de la **economía circular** se busca la recuperación de compuestos de alto valor añadido como son los **compuestos fenólicos**, lo que conlleva buscar un menor impacto ambiental y la búsqueda de la reutilización de los residuos producidos, acrecentado por la demanda de los consumidores por ingredientes de origen natural de diferentes fuentes de **compuestos bioactivos**. Por ello este Trabajo de Fin de Máster, tiene como objetivo maximizar la **recuperación de los compuestos fenólicos** del residuo sólido del café, estudiando el efecto de diferentes parámetros en la **extracción asistida por microondas**.

Previamente se realiza la caracterización de dicho residuo, con el fin de conocer su estructura y composición y compararla con residuos existentes en bibliografía de características similares. La determinación de los compuestos presentes en el residuo es clave para plantear una estrategia de recuperación adecuada de los compuestos fenólicos.

Una vez finalizada la caracterización se realiza un **diseño experimental central compuesto** para optimizar el proceso de extracción de los compuestos fenólicos empleando como disolvente mezclas eutécticas (DES) constituidas por cloruro de colina (ChCl) y glicerol (Glic). Se analizará el efecto de las variables temperatura, tiempo, % de agua en DES y relación molar ChCl:Glic que permita maximizar la concentración de compuestos fenólicos en el extracto. Las condiciones óptimas de extracción fueron **120 °C, 7,27 min, 28,78% agua en DES y 1,01 relación molar ChCl:Glic**, siendo la concentración de fenoles en el extracto de **1,98 mg GAE/g m.p.**

Finalmente, se establecieron los parámetros analíticos básicos de los diferentes métodos de análisis empleados en este trabajo, resultando adecuados todos de ellos. Entre estos parámetros se encuentran la linealidad, la repetibilidad, el sesgo, el límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC), habiéndose seguido de acuerdo con las directrices de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH).

Además, se ha puesto a punto un **método de separación mediante HPLC** para la determinación de compuestos fenólicos individuales.



Abstract

With the recovery of waste from the food industry in the scope of the **circular economy**, the recovery of compounds with high added value, such as **phenolic compounds**, is sought, which implies seeking a lower environmental impact and seeking to reuse the waste produced, increased by consumer demand for naturally derived ingredients from different sources of **bioactive compounds**. Therefore, this Final Master's Project aims to maximize the **recovery of phenolic compounds** from the spend coffee grounds, studying the effect of different parameters on **microwave-assisted extraction**.

Previously, the characterization of said residue is carried out, in order to know its structure and composition and compare it with existing residues in the bibliography with similar characteristics. The determination of the compounds present in the residue is key to proposing an adequate recovery strategy for phenolic compounds.

Once the characterization is completed, a **composite central experimental design** is carried out to optimize the extraction process of phenolic compounds, using Dee Eutectic Solvents (DES) consisting of choline chloride (ChCl) and glycerol (Glyc) as solvent. The effect of the variables temperature, time, % of water in DES and molar ratio ChCl:Glyc that will maximize the concentration of phenolic compounds in the extract will be analyzed. The optimal extraction conditions were **120 ° C, 7,27 min, 28,78% water in DES and 1,01 ChCl:Glyc molar ratio**, the concentration of phenols in the extract being **1,98 mg GAE/g m.p.**

Finally, the basic analytical parameters of the different analysis methods used in this work were established, all of them being adequate. These parameters include linearity, repeatability, bias, detection limit (LD) and limit of quantification (LC), having been followed in accordance with the guidelines of the International Conference on Harmonization (ICH).

In addition, an **HPLC separation method** has been developed for the determination of individual phenolic compounds.





El presente documento ha sido firmado en virtud de la Ley 59/2003 de 19 de Diciembre. El C.V.D. asignado es: 0005-A8AC-B22E-0D95*00A5-7F41. Para cotejar el presente con su original electrónico acceda a la Oficina Virtual de la Universidad de Valladolid, y a través del servicio de Verificación de Firma introduzca el presente C.V.D. El documento resultante en su interfaz WEB deberá ser exactamente igual al presente. El/los firmante/s de este documento es/son: MARTA SAGREDO ACITORES a fecha: 2020-06-22 lun 16:13:39 CEST



Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a Susana Lucas Yagüe y Juan Carlos López Linares, mi tutor en el departamento de Ingeniería Química, por todo lo que me ha enseñado durante este tiempo, en los que ha sido un estímulo y apoyo constante, tanto en la etapa experimental como en la de escritura. Al grupo de investigación de Ingeniería Química y Tecnología de los alimentos, por la oportunidad de realizar este proyecto y por la confianza depositada en mí. Y a mi compañera de Laboratorio Cristina, por aguantarme cada uno de los días.

A Juan José Jiménez Sevilla, mi tutor en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valladolid, quien me ha ayudado a marcar pautas y me ha permitido realizar el desarrollo de éste.

A Marisol Vega Alegre la coordinadora del Máster por haberme ayudado a introducirme en este proyecto de investigación.

A mis padres, que durante todos estos años han sabido orientarme, facilitándome todos los medios para llegar a ser quién soy. Y sobre todo en esta etapa que me han animado con sus palabras de aliento. También a mi novio Rafa, por ser quién más ha sufrido los efectos de esta etapa. Y por supuesto a mis primos y tíos por vuestra confianza en mí.

A todos mis compañeros y amigos de la universidad tanto del área química como de las otras áreas químicas, por vuestros consejos y ayudas.

Y por último a mis amigos de siempre, Marina, Irene, Alba, Cristina, Edu, Esther, Teresa.

Gracias.



Glosario

- **%DER:** Desviación estándar relativa
- **%ERef:** sesgo
- **BHA:** Butil-hidroxianisol
- **BHT:** Butil-hidroxitolueno
- **CAI:** Cenizas de ácido insoluble
- **CCC:** Cromatografía a contracorriente
- **CGA:** Ácidos clorogénicos
- **ChCl:** Cloruro de colina
- **CV:** Coeficiente de variación
- **DAD:** Detector de matriz de fotodiodos
- **DES:** Solvente eutéctico profundo
- **dwt:** “*deadweight tonnage*” o tonelaje de peso muerto.
- **FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
- **F-C:** Folin-Ciocalteu
- **FD:** Folin Denis
- **g.d.l:** Grados de libertad
- **GAE:** Ácido gálico
- **Glicl:** Glicerol
- **HBA:** Aceptor de enlace de hidrógeno
- **HBD:** Donante de un átomo de hidrógeno
- **HMF:** Hidroximetilfurfural
- **HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficacia
- **ICH:** Conferencia Internacional de Armonización
- **ICO:** Organización Internacional del Café
- **LAI:** Lignina ácido insoluble
- **LAS:** Lignina ácido soluble
- **LC:** Límite de cuantificación
- **LD:** Límite de detección
- **LI:** Linealidad
- **MAE:** Extracción por microondas
- **MS:** Espectrometría de masas
- **NREL:** Laboratorio Nacional de Energía Renovable
- **PTFE-TFM:** Tubos de cerámica y resina de politetrafluoetileno modificado
- **R.T.:** Tiempo de retención



- **RAH:** Recuperación de azúcares hemicelulósicos
- **RE:** Repetibilidad
- **RG:** Recuperación de glucosa
- **RMN:** Resonancia magnética nuclear
- **RMS:** Medias cuadráticas
- **ROS:** Reactive oxygen species o especie reactiva de oxígeno
- **RP:** Fase inversa
- **RSC:** Residuo Sólido de Café "*Spent Coffee Grounds*".
- **RTG:** Recuperación Total gravimétrica.
- **SPE:** Extracción en fase sólida
- **s_r:** Desviación estándar
- **SS:** Suma de cuadrados
- **T:** Temperatura
- **t:** tiempo
- **TPC:** Contenido total de compuestos fenólicos
- **UV/VIS:** Ultravioleta visible
- **UV:** Ultravioleta



Índice

RESUMEN	II
ABSTRACT	III
AGRADECIMIENTOS	I
GLOSARIO	II
1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	4
3.1. Residuos del Café	4
3.1.1. Definición	4
3.1.2. Datos de producción	5
3.1.3. Composición físico-química	6
3.1.4. Aplicaciones	8
3.2. Compuestos antioxidantes	12
3.2.1. Tipos	12
3.2.2. Antioxidantes en el residuo del café	15
3.2.3. Propiedades y aplicaciones	16
3.3. Procesos de obtención de compuestos fenólicos del café	18
3.3.1. Extracción	18
3.3.2. Separación y purificación	23
3.4. Determinación de compuestos fenólicos	24
3.4.1. Técnicas de determinación analítica	24
4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	26
4.1. Materiales y Reactivos	26
4.2. Equipos principales	28
4.3. Acondicionamiento de la materia prima RSC	29
4.4. Recuperación de compuestos fenólicos mediante una extracción con microondas	30
4.4.1. Preparación de los DES	31
4.4.2. Diseño experimental	31



4.4.3. Optimización.....	34
4.5. Determinación analítica.....	34
4.5.1. Caracterización de la materia prima (RSC).....	34
4.5.1.1. Determinación de humedad y cenizas.....	36
4.5.1.2. Determinación de nitrógeno total y proteínas.....	37
4.5.1.3. Determinación de grasa.....	37
4.5.1.4. Determinación de carbohidratos estructurales.....	38
4.5.1.5. Determinación del contenido de lignina.....	39
4.5.2. Determinación de carbohidratos y productos de degradación en extractos líquidos.....	40
4.5.3. Determinación de compuestos fenólicos totales en extractos líquidos.....	40
4.5.4. Identificación de compuestos fenólicos individuales en extractos líquidos.....	41
4.6. Definición de variables.....	42
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
5.1. Validación del método cromatográfico. Carbohidratos.....	44
5.1.1. Linealidad de la respuesta.....	44
5.1.2. Repetibilidad.....	48
5.1.3. Sesgo.....	48
5.1.4. Límite de detección (LD) y cuantificación (LC).....	48
5.2. Separación de compuestos fenólicos individuales mediante HPLC.....	48
5.3. Validación del método Folin-Ciocalteu.....	50
5.4. Caracterización del residuo sólido de café.....	51
5.5. Efecto de la extracción DES asistida por microondas de compuestos fenólicos contenidos en el residuo sólido de café.....	53
5.6. Optimización de la extracción.....	62
6. CONCLUSIONES	67
7. BIBLIOGRAFÍA	69



Índice de Ecuaciones

Eq. 4.1	36
Eq. 4.2	37
Eq. 4.3	37
Eq. 4.4	37
Eq. 4.5	38
Eq. 4.6	39
Eq. 4.7	40
Eq. 4.8	42
Eq. 4.9	42
Eq. 4.10	43
Eq. 4.11	43
Eq. 4.12	43
Eq. 5.1	56



Índice de Tablas

Tabla 3.1. Composición química del residuo sólido del café. _____	8
Tabla 3.2. Principales ventajas e inconvenientes de las diferentes técnicas de extracción. _____	20
Tabla 3.3. Estudio de optimización de información para la producción de compuestos fenólicos. _____	22
Tabla 4.1. Sustancias patrón _____	27
Tabla 4.2. Diseño experimental de extracción DES asistida por microondas. _____	33
Tabla 4.3. Parámetros equipo de extracción _____	35
Tabla 4.4. Parámetros equipo de extracción para determinación de grasa. _____	38
Tabla 4.5. Longitudes de onda de absorción de los compuestos fenólicos _____	41
Tabla 5.1. Análisis de varianza para comprobar la validez del modelo lineal en el calibrado de la glucosa (p=0,05, n=2) _____	45
Tabla 5.2. Análisis de varianza para comprobar la validez del modelo lineal en el calibrado del xilosa (p=0,05, n=2) _____	46
Tabla 5.3. Análisis de varianza para comprobar la validez del modelo lineal en el calibrado de la Arabinosa (p=0,05, n=2) _____	47
Tabla 5.4. Análisis de repetibilidad (n=5) _____	48
Tabla 5.5. Tiempo de retención y parámetros de validación para el HPLC método azúcares _____	48
Tabla 5.6. Tiempos de retención de los compuestos fenólicos _____	49
Tabla 5.7. Asignación de las longitudes de onda. _____	50
Tabla 5.8. Análisis de varianza para comprobar la validez del modelo lineal en el calibrado del ácido gálico (p=0,05, n=3) _____	51
Tabla 5.9. Composición de RSC. _____	52
Tabla 5.10. Contenido de fenoles totales con Folin. _____	54
Tabla 5.11. Análisis de Varianza para Fenoles Totales (Folin). _____	56



Tabla 5.12. Recuperaciones sólidas (RTG). _____	59
Tabla 5.13. Composición de carbohidratos y porcentaje de oligómeros. _____	60
Tabla 5.14. Recuperaciones de azúcares hemicelulósicos y glucosa. _____	61
Tabla 5.15. Fenoles totales con F-C del punto óptimo tras MAE. _____	63
Tabla 5.16. Precisión del procedimiento de recuperación de fenoles mediante MAE a partir del subproducto de café. _____	63
Tabla 5.17. Resultados del punto óptimo tras extracción con microondas (n=3). _____	65
Tabla 5.18. Precisión del procedimiento de recuperación de carbohidratos estructurales mediante MAE a partir del subproducto de café. _____	65



Índice de Figuras

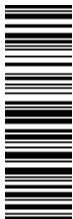
Figura 3.1. Primera etapa de producción del café, adaptado de [7].	4
Figura 3.2. Porcentaje aproximado de producción de café por continente [16].	5
Figura 3.3. Composición química del RSC, adaptado de [8].	6
Figura 3.4. Valorización del RSC, adaptado de [28].	9
Figura 3.5. Ejemplo de biorrefinería basado en RSC, adaptado de [25].	12
Figura 3.6. Estructura de los flavonoides	14
Figura 3.7. Estructura de los algunos compuestos fenólicos del RSC.	15
Figura 3.8. Estructura básica de compuestos fenólicos. A tanino, B lignina, C flavonoide	15
Figura 3.9. Estructura del ácido 5-O-cafeoil-ácido quínico (ácido clorogénico)	16
Figura 3.10. Estructura DES empleados.	21
Figura 3.11. Reacción entre el ácido gálico y el reactivo F-C.	24
Figura 4.1. Equipo de microondas	30
Figura 4.2. Tubo de presión de cerámica	
Figura 4.3. Equipo de extracción VECP SCIENTIFIC SER 148.	34
Figura 4.4. Procedimiento de análisis llevado a cabo para la caracterización de la materia prima.	36
Figura 5.1. Línea de calibrado para la glucosa (n=2).	45
Figura 5.2. Línea de calibrado para la xilosa (n=2).	46
Figura 5.3. Línea de calibrado para la Arabinosa (n=2).	47
Figura 5.4. Cromatograma de las condiciones óptimas para la separación de los compuestos fenólicos (220 nm).	50
Figura 5.5. Línea de calibrado para el ácido gálico (n=3).	51
Figura 5.6. Diagrama de Pareto para Fenoles Totales (Folin).	55



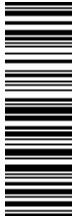
Figura 5.7. Gráfica de superficie que representa la variación de la temperatura en función % de agua en DES. _____ 57

Figura 5.8. Gráfica de superficie que representa la variación del % agua en DES en función del tiempo. _____ 58

Figura 5.9. Gráfica de superficie que representa la variación del tiempo en función de la relación molar ChCl : Glic. _____ 58



El presente documento ha sido firmado en virtud de la Ley 59/2003 de 19 de Diciembre. El C.V.D. asignado es: 0005-A8AC-B22E-0D95*00A5-7F41. Para cotejar el presente con su original electrónico acceda a la Oficina Virtual de la Universidad de Valladolid, y a través del servicio de Verificación de Firma introduzca el presente C.V.D. El documento resultante en su interfaz WEB deberá ser exactamente igual al presente. El/los firmante/s de este documento es/son: MARTA SAGREDO ACITORES a fecha: 2020-06-22 lun 16:13:39 CEST



1. Introducción

Grandes cantidades de desperdicios de alimentos se generan a nivel mundial todos los días, lo que conlleva un serio impacto económico y ambiental, además del gasto en recursos relacionados con su tratamiento. Según la Organización de Agricultura y Alimentación de las Naciones Unidas (FAO), la prevención y gestión de los residuos de alimentos son cuestiones claves para lograr un desarrollo sostenible y un equilibrio correcto entre las actividades económicas y la protección medio ambiental [1]. Un perspicaz enfoque para manejar este problema es el desarrollo de nuevos procedimientos que permitan convertir estos residuos en productos de valor añadido en el marco de la economía circular.

Para proceder a la eliminación de los residuos sólidos del café, se debe realizar un tratamiento adecuado por su alto contenido y por la presencia de compuestos tales como cafeína, taninos y polifenoles que pueden tener efectos negativos para el medio ambiente [2]. Por ello se ha centrado el interés en la valorización de estos residuos.

Además, el incremento de la demanda de los consumidores por aditivos e ingredientes de origen natural ha incentivado la búsqueda de diferentes fuentes de compuestos bioactivos. La disminución de antioxidantes de origen natural ha causado una mayor preocupación por los riesgos para la salud a largo plazo [3].

Los subproductos del café como la pulpa, cáscara, piel y los residuos sólidos del café molido contienen grandes cantidades de compuestos bioactivos como los polifenoles [4]. Los compuestos fenólicos, son un importante grupo de metabolitos vegetales secundarios que presentan efectos antioxidantes, antiproliferativos¹, antialérgicos, anticancerígenos, antimicrobianos, antitumorales, actividades antiinflamatorias y neuroprotectoras. Por lo que este subproducto representa una fuente alternativa para obtener antioxidantes naturales, considerándose seguros en comparación con los sintéticos [2 , 5].

La elevada producción de estos residuos, aumenta la probabilidad de su posible reutilización. Sin embargo, esto requiere un estudio previo y en mayor profundidad de la presencia de estos compuestos en dicho subproducto.

¹ Sustancia que impide la reproducción celular.



2. Objetivos

2.1. Objetivo general

El **objetivo principal** de este trabajo de fin de máster es realizar un estudio experimental a escala de laboratorio para la **recuperación** de los **compuestos fenólicos del residuo sólido del café (RSC)**, mediante una extracción asistida con **microondas** empleando **disolventes eutécticos**. Se plantean diferentes estrategias de extracción con el objetivo de conocer la más rentable desde un punto de vista técnico, económico y ambiental.

2.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este trabajo quedan definidos a continuación:

- I. Caracterizar el residuo.
- II. Realizar un estudio experimental basado en la optimización de la etapa de extracción con microondas empleando disolventes eutécticos.
 - a. Realizar un diseño experimental utilizando el software *Statgraphics Centurion XVII*.
 - b. Obtener las condiciones óptimas de extracción que permitan obtener la máxima recuperación de los compuestos fenólicos en el extracto líquido.
- III. Comparar su potencial de extracción con otros disolventes convencionales.
- IV. Determinar los compuestos fenólicos totales e individuales.
- V. Validar los métodos empleados estableciendo la linealidad, la repetibilidad, el sesgo, el límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) de acuerdo con las directrices de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH).



3. Antecedentes bibliográficos

3.1. Residuos del Café

3.1.1. Definición

El proceso de producción del café se puede dividir en dos grandes etapas: en la primera los frutos del café son descascarados y puestos a secar, generándose residuos como la cáscara, la pulpa y los granos defectuosos. En la Figura 3.1, se puede apreciar el proceso primario para obtener los granos verdes del café. En la segunda etapa, se producen los granos tostados y el café molido [6, 7]. El café molido una vez tratado con agua caliente o vapor para la producción de café instantáneo como bebida ya sea en locales comerciales, hogares o restaurantes genera un residuo sólido de café llamado “Spent Coffee Grounds” (RSC) [2, 8]. Es un importante subproducto del café, considerando que casi el 50% de la producción mundial se procesa para café soluble [4]. Es un residuo con tamaño fino de partículas, alta humedad (entre el 80 y el 85%) [9] y que contiene grandes cantidades de compuestos orgánicos (ácidos grasos, lignina, celulosa, hemicelulosa y otros polisacáridos) los cuales pueden ser explorados como fuente de producto de valor añadido [8].

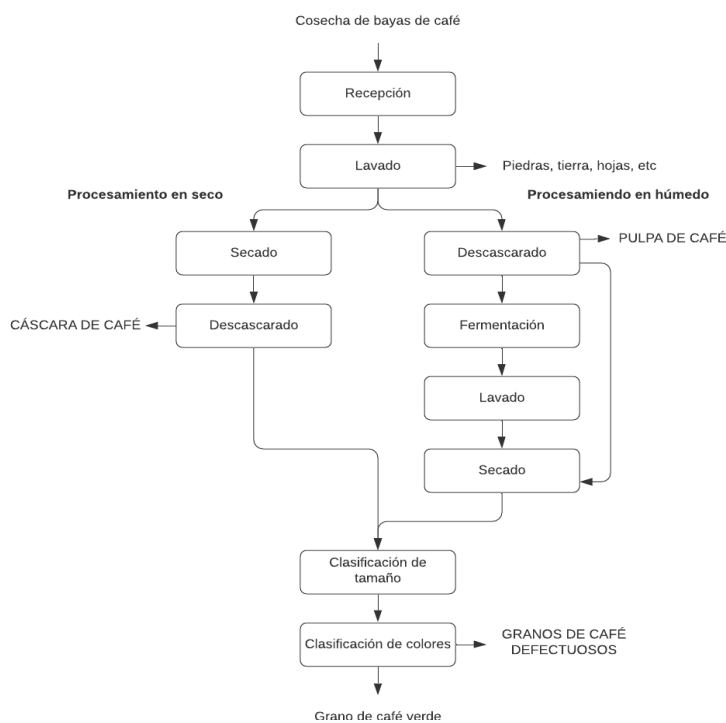


Figura 3.1. Primera etapa de producción del café, adaptado de [7].



3.1.2. Datos de producción

El café es una de las bebidas más populares y consumidas en el mundo, y lidera la segunda posición dentro de los productos más comercializados en el mundo, después del petróleo. Alrededor de 60 países tropicales y subtropicales producen café en grandes cantidades, siendo alguno de ellos el principal productor de exportación [10]. La Organización Internacional del Café (ICO) informó que la producción mundial en el año 2018/2019 habrá sido 169,79 millones de sacos [5 , 10]. Sólo se utiliza el 5% del peso del fruto fresco y el 95% queda en forma de residuo orgánico [6], produciéndose una cantidad estimada de 6 millones de toneladas de RSC [1].

En 2018, se consumieron más de 9 mil millones de kilos de café en todo el mundo [12]. El volumen diario de residuos de café inicialmente era de 1,86 kg por cada kilogramo de café soluble. Tras mejoras en el proceso productivo esta cifra cayó a 1,27 kg en 1967 y ahora es de 0,91 kg por cada kilogramo de café soluble [12 , 13].

Todos los días, se consumen más de 2,25 mil millones de tazas de café en todo el mundo, por cada tonelada de residuos de café descompuestos en un vertedero, se liberan 340 m³ de metano en el medio ambiente, es decir es equivalente a 9 millones de emisiones por automóviles [12].

Según la ICO, Estados Unidos es el mayor importador de café, y Brasil es el principal país productor y exportador del mundo. La Figura 3.2 muestra los porcentajes de producción de café por continentes.

Los finlandeses encabezan el ranking de consumo de café con 11 kilos por persona al año, en segundo lugar, Noruega con casi 10 kilos por persona y en el top 3 los suecos con 8,4 kilos. España estaría en el puesto 19 con 4,9 kilos de consumo de café por habitante/año [10 , 14].

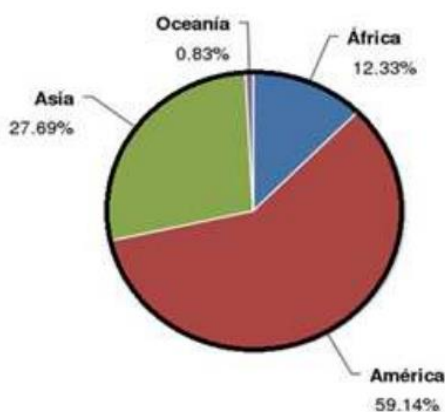


Figura 3.2. Porcentaje aproximado de producción de café por continente [16].



3.1.3. Composición físico-química

La composición química de RSC depende de los tipos de plantas de café, la ubicación geográfica donde es cultivada la planta, el clima del lugar y las condiciones del suelo [17]. Como se muestra en la Figura 3.3, su composición se basa en celulosa, hemicelulosas, proteínas, lípidos, polifenoles, minerales y diferentes productos formados por la reacción de Maillard durante el proceso de tostado, como las melanoidinas [18]. Fuentes bibliográficas revelan que casi la mitad del material son azúcares polimerizados en estructuras de celulosa y hemicelulosas [19].

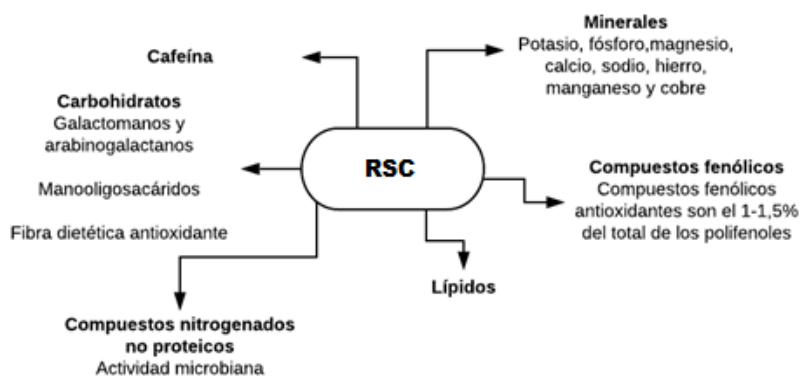


Figura 3.3. Composición química del RSC, adaptado de [8].

Las fibras de los restos del café molido exhiben propiedades antioxidantes que sugieren su uso como suplementos dietéticos [19].

- **Carbohidratos**

Los carbohidratos son los componentes más importantes de los granos de café y de manera similar en los RSC [20]. El grano de café es una rica fuente de polisacáridos que consiste principalmente de mananos o galactomananos tipo II, arabinogalactanos y celulosa. Estos galactomananos y arabinogalactanos se extraen al tostar el café durante la preparación de la bebida utilizando agua caliente a presión [8]. Sin embargo, la mayoría de estos polisacáridos permanecen como material insoluble unido a la matriz RSC.

El café molido es rico en azúcares polimerizados en estructuras de celulosa y hemicelulosa, que corresponden a casi la mitad del material.

La hemicelulosa, en el residuo del café, es el segundo polisacárido más común, son polímeros heterogéneos de pentosa (Xilosa y arabinosa), hexosas (manosa, galactosa, glucosa) y ácidos de azúcar. Siendo la manosa la más abundante (47%p/p), seguida de galactosa (30%p/p) y glucosa (19%p/p) y pocas cantidades de arabinosa(4%p/p); en cuanto a la Xilosa no se encuentra en el RSC [18, 19].



- **Proteínas**

El café tostado contiene un 3,1 % (p/p) de proteína. Durante el proceso con agua para preparar el café, se extraen muchos de los otros componentes del grano, lo que conlleva un aumento en el contenido de proteína en el RSC, hasta un 10-17% (p/p) [18, 19].

- **Lípidos**

La cantidad de lípidos extraíbles de los RSC depende del método de elaboración y extracción [22]. Los residuos del café contienen entre el 10 y 15% y a veces algo más del 20% de lípidos [8]. La composición del aceite extraído de los RSC difiere ligeramente de la extraída de los granos de café crudos, pero generalmente el aceite de café contiene alrededor del 75% de triacilglicérols, 14% de ésteres de terpeno, 5% de acilglicérols parciales, 1% de ácidos grasos libres, 1,5% de esteroides libres, 1% ésteres de esteroides y polarípidos al 1% [22]. Además de los lípidos, el café también contiene compuestos orgánicos volátiles como terpenos y terpenoides, que muestran actividad antimicrobiana [22]. La actividad antibacteriana del aceite de café puede estar vinculada también al contenido de ácidos grasos libres.

Durante el proceso de elaboración, los lípidos se adhieren a los granos del residuo sólido de café.

- **Cenizas**

Se pueden encontrar minerales como potasio, calcio, magnesio, azufre... estos minerales son micronutrientes esenciales para la salud, ya que se encargan de regular las funciones metabólicas, hormonales, enzimáticas, etc.

- **Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos que se encuentran en altas concentraciones en las plantas son los principales responsables del potencial antioxidante [8]. Los ácidos clorogénicos y p-cumárico son los polifenoles más abundantes [1].

Estos compuestos están relacionados con la salud humana, con actividades antioxidantes, antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias y anticancerígenas [19].

La lignina se encuentra en porcentajes muy altos [21], otorgando un gran poder antioxidante para la salud [23]. Es una macromolécula compuesta de una gran variedad de grupos funcionales [19, 22].

Estas sustancias se agrupan en fibras dietéticas, las cuales pueden ser clasificadas en solubles e insolubles. Las insolubles son las que destacan en relación a las otras y son beneficiosas para acelerar el



movimientos de los alimentos en el aparato digestivo [8 , 21]. Dichos compuestos serán expuestos más adelante.

Todas estas características hacen de los residuos sólidos del café una materia prima idónea para su revalorización en diferentes ambientes industriales. El conocimiento de las propiedades físicas y químicas conducirá a una mejor comprensión de la aplicación del café. En la Tabla 3.1 muestra la composición química del residuo sólido del café.

Tabla 3.1. Composición química del residuo sólido del café.

Componentes	Valor
Celulosa (mg/kg)	8,6-15,3
Hemicelulosa (mg/kg)	36,7 ± 5,0
Arabinosa (mg/kg)	1,7
Manosa (mg/kg)	21,2
Galactano (mg/kg)	13,8
Lípidos (mg/kg)	10,0-15,0
Cenizas (% dwt)	0,43-2,2
Lignina soluble (% dwt)	1,6-1,7
Lignina insoluble (% dwt)	30,9-31,9
Lignina total (% dwt)	32,5-33,6
Nitrógeno (% dwt)	1,9-2,3
Proteína (mg/kg)	6,7-13,7
Grupos acetilo (% dwt)	2,2

Adaptado de [25]; dwt: "deadweight tonnage" o tonelaje de peso muerto.

3.1.4. Aplicaciones

Actualmente, se generan grandes cantidades de residuos que deben gestionarse adecuadamente para minimizar su impacto negativo. Una gestión adecuada de los residuos ayuda a reducir no solo el impacto ambiental, sino también el económico. Hasta ahora, los mayores avances se han logrado en su utilización para fines industriales distintos de la industria alimentaria, como lo es la producción de energía, la adsorción de compuestos tóxicos y la manufactura de productos industriales, tales como obtención de etanol [26]. Todos estos procesos se llevan a cabo en biorrefinerías.

Las biorrefinerías son instalaciones que de un modo sostenible transforman biomasa en un amplio espectro de productos energéticos, alimentos, piensos, fertilizantes y bioproductos o "*bio-based products*".



En las biorrefinerías, la materia prima son recursos biológicos como los cultivos tradicionales, residuos orgánicos de origen agrícola, ganadero, forestal, industrial o urbano, o incluso microalgas, esta materia prima es la llamada biomasa.

Para conseguir esta amplia gama de productos las biorrefinerías integran en una misma instalación distintos procesos que pueden ser físicos, químicos, termo-químicos o biotecnológicos. Los productos intermedios que se generan tras las transformaciones primarias de la biomasa, se denominan “plataformas” a partir de las cuales se aplican procesos de transformación o refinado secundarios hasta alcanzar los productos finales [27].

Algunos ejemplos de valorización se muestran en la Figura 3.4.

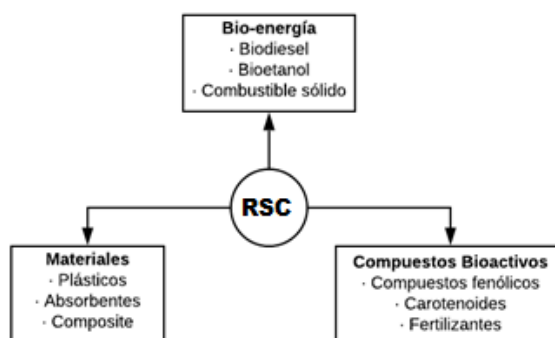


Figura 3.4. Valorización del RSC, adaptado de [28].

- **Valorización como alimento para animales.**

Debido al contenido de proteínas y minerales que presenta suele ser empleado como alimento para rumiantes, cerdos, gallinas y conejos. Pero el contenido de lignina hace que esta sea perjudicial ya que reduce la producción de leche y carne [20 , 21]. Otros estudios se refieren a que la baja ingesta de alimento, la digestibilidad de las proteínas y la retención de nitrógeno son factores limitantes en el uso de RSC como alimento para animales, explicado por la presencia de cafeína, taninos y polifenoles [25].

- **Valorización como fertilizante.**

Es el segundo uso generalizado de los RSC, debido a la presencia de minerales [22]. Se ha considerado la posibilidad de usarlo para el cultivo de hongos, como sustrato de crecimiento para varias especies. Los resultados muestran que la incorporación de RSC aumenta la disponibilidad de nutrientes importantes en el suelo, en particular carbono y micronutrientes [25].



- **Valorización energética (combustible y biocombustible).**

El valor calorífico del RSC es de 6930 kcal/kg, por lo que es una alternativa atractiva para uso como combustible [7]. Sin embargo, el alto contenido de humedad presenta problemas térmicos, por lo que debe secarse previamente antes de su uso. La presencia en el residuo sólido del café de hemicelulosa, celulosa y lignina hace del residuo un material lignocelulósico permitiendo su utilización para la producción de etanol mediante su fermentación. El bioetanol se puede emplear como sustituto de la gasolina o como aditivo.

Debido al contenido de lípidos, puede alcanzar el 15% en peso, los residuos sólidos de café son empleados para la producción de biodiesel [25]. Un estudio demostró que el contenido de ésteres metílicos del biodiesel de café es entre 47,4 y 86,0% dependiendo del solvente de extracción y las condiciones de la reacción de transesterificación [25].

También es usado industrialmente como combustible en calderas debido a su alto poder calorífico mencionado anteriormente [15, 23].

- **Valorización como bioadsorbente.**

Se han obtenido buenos resultados al usar RSC como adsorbente, después del secado, para la eliminación de fenol y colorantes de las corrientes acuosas. La presencia de minerales extractivos, polisacáridos, lignina, polifenoles y taninos condensados hace del residuo sólido de café un potente bioadsorbente, empleando su uso para la eliminación de iones de metales pesados en soluciones acuosas como puede ser el cobre [7].

- **Valorización como antioxidantes.**

Valorización como fuente de antioxidantes. La extracción de antioxidantes naturales, fenólicos, cafeína, ácido clorogénico, cafestol, trigonelina, kahweol, galactosanos, etc., es empleada como ingredientes o aditivos en las industrias alimentarias, farmacéuticas y de medicina [25].

- **Valorización como cosmético.**

Los lípidos se pueden usar para aplicaciones de alto valor cosmético, para dicha aplicación los lípidos deben ser extraídos por dióxido de carbono supercrítico para asegurar una mejor calidad y pureza del producto final, libre de compuestos tóxicos como solventes [25].



- **Valorización como materiales.**

Se considera la posibilidad de la utilización de RSC como materiales de subrasante de construcción o como espuma de poliuretano viscoelástica de base biológica para aislamiento térmico o para mejorar el aglutinante del asfalto dañado en las carreteras [25].

- **Valorización como compuestos bioactivos.**

El gran contenido de polifenoles y flavonoides lo hace un residuo esencial para la utilización de compuesto bioactivo, debido a que estos compuestos muestran varias actividades biológicas, ya mencionadas.

Se han descrito varias aplicaciones para los polifenoles en la industria alimentaria, incluso como agentes antimicrobianos y para prevenir el deterioro de los alimentos. Sin embargo, la mayor parte de la atención se presta para su aplicación en el área farmacéutica, debido a los beneficios que pueden promover para la salud humana, beneficios relacionados con su efecto antioxidante (por ejemplo, ácido clorogénico). Estos pueden actuar contra una serie de enfermedades, en términos de sus propiedades antimutagénicas (por ejemplo, la hemicelulosa de la fibra insoluble, melanoidinas y polifenoles de alto peso molecular) [9]; como la arteriosclerosis, ciertos tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas, así como contra los procesos de envejecimiento [29]. Debido a estas importantes aplicaciones, se centrará la atención en establecer un proceso de obtención de polifenoles sostenible económica y ambientalmente y óptimo desde el punto de vista técnico.

Estos son solo unos pocos ejemplos de valorizaciones que están siendo estudiadas hoy en día. Como se observa en la Figura 3.5 existe un gran abanico para el aprovechamiento de dicho residuo.



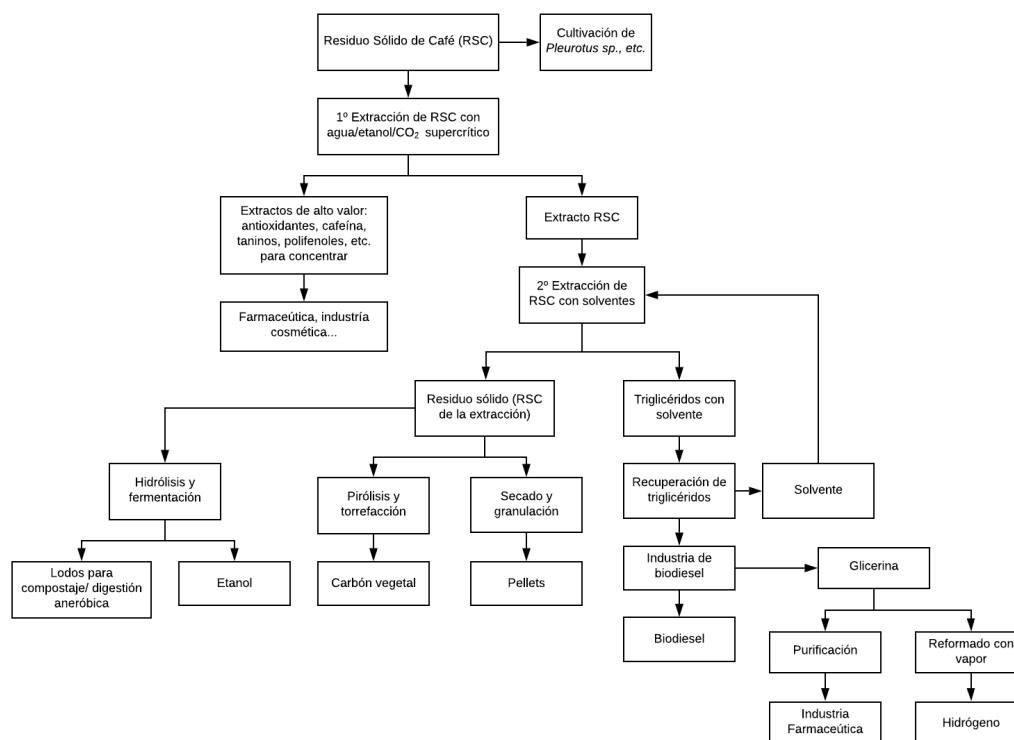


Figura 3.5. Ejemplo de biorrefinería basado en RSC, adaptado de [25].

3.2. Compuestos antioxidantes

Los antioxidantes fueron comunes en la industria química y de alimentos durante los siglos XIX y XX [30]. Son compuestos capaces de captar el electrón desapareado del orbital externo de los radicales libres y de esta forma desactivarlos, disminuyen el estrés oxidativo y actúan sobre el mismo inhibiéndolo, para evitar la oxidación de las proteínas, los lípidos y el ADN [27–29].

3.2.1. Tipos

Los antioxidantes se dividen en dos categorías principalmente, que son: sintéticos y naturales. En general los antioxidantes sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, como el BHA y BHT (Butil-hidroxianisol y Butil-hidroxitolueno). Sin embargo, se han impuesto medidas de precaución y se han restringido su uso debido a su carcinogenicidad; mientras que en los antioxidantes naturales la estructura química de tales moléculas puede ser significativamente diferente. La mayoría de los compuestos antioxidantes naturales son de origen vegetal, y la pluralidad de los que se han estudiado para su aplicación en la industria alimentaria son compuestos polifenólicos. Estos compuestos reducen el valor nutricional de los alimentos debido a su interacción con proteínas vegetales, modificando



las propiedades funcionales y nutritivas de los alimentos, contribuyendo a modificar las propiedades organolépticas y sensoriales de frutas y vegetales [33]. Entre los principales antioxidantes presentes en los alimentos es posible distinguir [31 , 32]:

- **Las vitaminas antioxidantes:** que comprenden:
 - **Ácido ascórbico (Vitamina C)**, es un compuesto hidrosoluble¹, cuya capacidad para actuar como antioxidante se debe al reaccionar con radicales libres, fundamentalmente radicales peroxilo, los neutraliza y se transforma en el radical dehidroascorbato, mucho menos reactivo que los radicales libres que existían previamente [36].
 - **Vitamina E**, comprende dos tipos de moléculas químicamente relacionadas: los tocoferoles y los tocotrienoles. Desde el punto de vista estructural, ambas incluyen un grupo hidroxilo unido a un C-6 de un anillo aromático el cual está, a su vez, unido a un heterociclo oxigenado. Desde dicho heterociclo (C-2) nace una larga cadena lateral hidrocarbonada que, en el caso de los tocoferoles está totalmente saturada (cadena fitilo), mientras que en los tocotrienoles se presentan bajo forma de isómeros alfa, beta, gamma y delta [37]. El α -tocoferol, es el componente más abundante de la vitamina E [30].
- **Compuestos Pro-Vitamina A.** Representados por el beta-caroteno, el alfa-caroteno y la beta- criptoxantina. Estos compuestos pueden ser convertidos en el organismo en Vitamina A o retinol².
- **Los carotenoides:** Son pigmentos sintetizados por las plantas, donde actúan como desactivadores del oxígeno singlete [37]. Destacan la luteína, el licopeno, la zeaxantina y la astaxantina. También se incluye los Pro-Vitamina A (arriba mencionados). Desde un punto de vista químico, la mayoría de los carotenoides están formados por una cadena de átomos de carbono con enlaces sencillos y dobles alternados y con diferentes grupos cíclicos o acíclicos [36]. Los carotenoides comprenden los carotenos (alfa-caroteno, beta-caroteno y licopeno), que no contienen átomos de oxígeno en su estructura y las xantofilas (beta-criptoxantina, luteína, astaantina y zeaxantina), que sí lo presentan, normalmente bajo la forma de hidroxilos.
Su capacidad de captación depende del número de dobles enlaces presentes en la cadena carbonada [36].

¹ Que puede disolverse en agua.

² Derivado de la vitamina A.



- Compuestos de Maillard:** La reacción de Maillard consta de tres etapas: la primera, en la que se produce la condensación entre un compuesto carbonílico y un grupo amino en medio ácido, a partir la cual se generan una serie de compuestos denominados de Amadori. En la segunda, estos compuestos se descomponen dando lugar a moléculas volátiles y no volátiles de bajo peso molecular. En la tercera, muchos de los compuestos formados durante la etapa intermedia, análogos de azúcar de bajo peso molecular y productos carbonílicos insaturados sufren reacciones de polimerización, dando lugar a compuestos conocidos como melanoidinas [38]. Están presentes en alimentos con un contenido en azúcares libres y proteínas y que son sometidos a tratamientos térmicos, como pueden ser el café o el pan [39].
- Los polifenoles:** Son los que presentan mayor riqueza antioxidante en la mayoría de los alimentos consumidos por la población. Todos los polifenoles exhiben en su estructura uno o más grupos hidroxilos (-OH) unidos a un anillo aromático, es decir, presentan algún grupo fenólico. Entre ellos es posible distinguir dos tipos mayores de compuestos:
 - Flavonoides:** Son la clase más abundante en los polifenoles, cuya estructura comprende dos anillos aromáticos (A y B) unidos a un heterociclo de tres átomos de carbono y uno de oxígeno (C), dicha estructura se observa en la Figura 3.6. Los flavonoides se pueden subdividir en los siguientes seis grupos: antocianidinas, flavanoles, flavanonas, flavonoles, flavonas e isoflavonas [27 , 37].

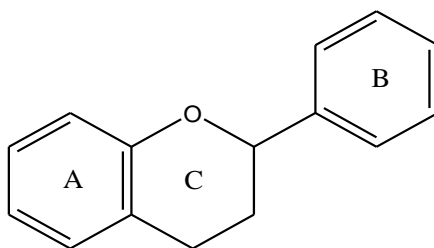


Figura 3.6. Estructura de los flavonoides

- No-Flavonoides:** Que son mayoritariamente alcoholes mono-fenólicos, ácidos fenólicos simples y estilbenos. Los ácidos fenólicos simples contribuyen a la mayor parte de los polifenoles no-flavonoides, se encuentran los derivados del ácido benzoico y los del ácido cinámico, conocidos como ácidos hidroxicinámicos, como el cafeico, el ferúlico, el p-cumárico y el sináptico [36]. Los hidroxicinamatos C6-C3 producidos como conjugados son denominados ácidos clorogénicos (CGA) [41]. La Figura 3.7 muestra algunos de los compuestos fenólicos del residuo del café.



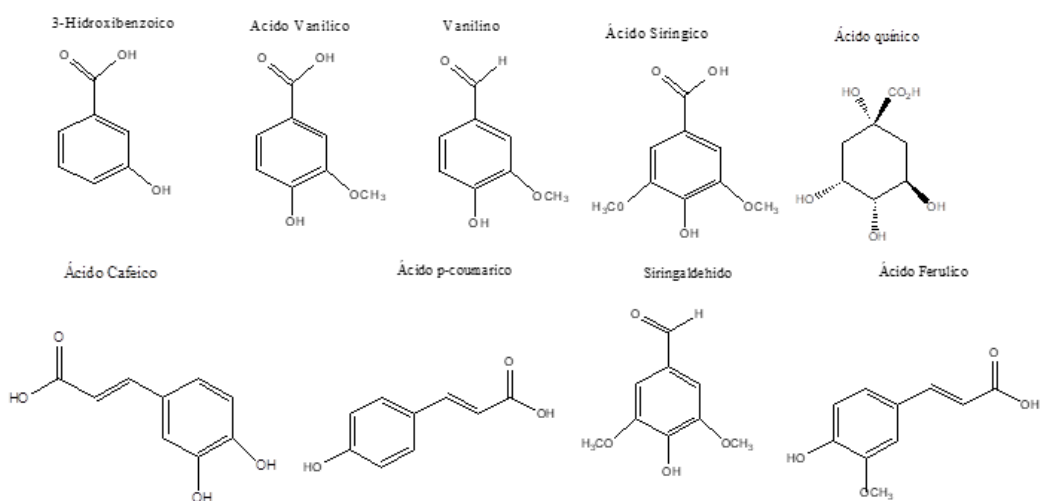


Figura 3.7. Estructura de los algunos compuestos fenólicos del RSC.

3.2.2. Antioxidantes en el residuo del café

La actividad antioxidante del café está potencialmente relacionada a su alto contenido de compuestos fenólicos [39 , 40]. Dentro de los compuestos fenólicos encontrados en el café, las clases predominantes son la de los ácidos clorogénicos (1,65 y 6,09 mg ácido clorogénico/gramo seco), y ácido cafeico [44]. Sin embargo, el contenido depende de la especie del café y la madurez del grano. Entre los fenólicos, los compuestos principales son los ácidos cafeoilquínicos, los ácidos feruloilquínicos, los ácidos p-conraroroquínicos y los diesteres mixtos de ácidos cafeico y ferúlico con ácido quínico.

Bajo el término de compuesto fenólicos se agrupa un conjunto de sustancias muy heterogéneas que, en su estructura poseen un grupo funcional de hidroxibenceno (fenol), unido a compuestos aromáticos o alifáticos, como ya se comentó anteriormente. Normalmente se dividen en: taninos, lignanos y flavonoides. La Figura 3.8 muestra la estructura de dichos compuestos [42 , 43].

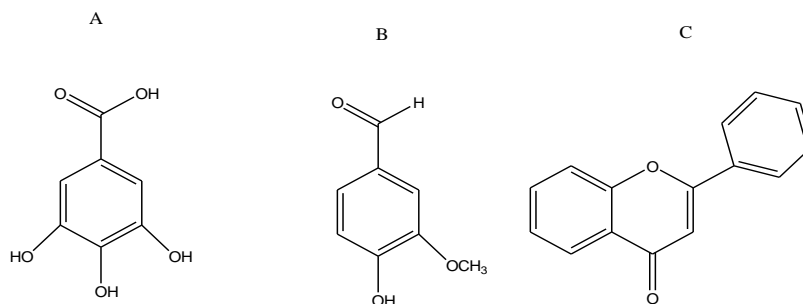


Figura 3.8. Estructura básica de compuestos fenólicos. A tanino, B lignina, C flavonoide



Uno de los grupos más importantes son los conjugados de ácido quínico, conocidos como ácidos clorogénicos (CGA), la Figura 3.9 muestra la estructura del CGA, que principalmente está formada por la esterificación de ácido quínico con ácido cafeico, ferúlico o p-cumárico [47] como ya se explicó en el apartado anterior. Estos son los compuestos principales de la fracción fenólica de la semilla de café verde. Durante el procesamiento, el CGA puede sufrir transformaciones químicas como isomerización, hidrólisis o degradación en moléculas de bajo peso molecular; la alta temperatura del tostado también conduce a una reducción de la cantidad de CGA por transformación en quinolactonas y melanoidinas [48]. Aun así, el contenido en el RSC es de gran importancia.

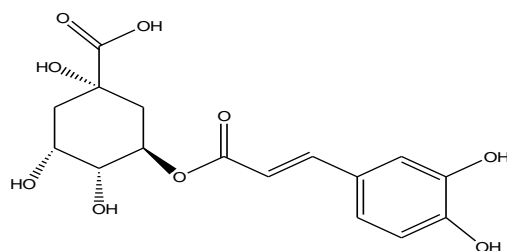


Figura 3.9. Estructura del ácido 5-O-cafeoil-ácido quínico (ácido clorogénico)

Durante el tostado se da la formación de una fracción de alto peso molecular constituido por melanoidinas de café en un proceso paralelo a la reducción de polifenoles. En este proceso, los polisacáridos contenidos en los granos de café verdes, tales como galactomananos y arabinogalactanos, polifenoles, proteínas y aminoácidos libres, están unidos covalentemente entre sí contribuyendo a la formación de melanoidinas de café. Las melanoidinas insolubles son las que permanecen en el residuo del café [9].

3.2.3. Propiedades y aplicaciones

En los últimos años se han publicado numerosos estudios acerca de los beneficios para la salud del café y sus subproductos. Los efectos beneficiosos de los compuestos presentes en estos productos dependen de multitud de factores como los de tipo genético o las condiciones de producción (propiedades del suelo, condiciones climáticas, empleo de fertilizantes, etc.), entre otros. Todos estos aspectos, junto con los métodos de recuperación de estos subproductos empleados en el proceso de valorización, tienen una incidencia directa en la concentración final de los compuestos fenólicos en los materiales y en su posterior aplicación como fuentes de compuestos bioactivos.

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante del café depende de la preparación del mismo, con valores de 46,0 y 102,3% si está preparado por filtro y de 59,2 y 86,6% por expreso [49].



El daño oxidativo es medido por especies reactivas del oxígeno conocidas como ROS (*“reactive oxygen species”*), entre ellas el peróxido de hidrógeno, el ion súper óxido y el hidroxilo. El peróxido de hidrógeno, mediante ciertas reacciones, puede generar radicales hidroxilo que tienen la capacidad de reaccionar con muchas macromoléculas, causando daño a proteínas, lípidos, mitocondrias y ADN, lo cual va a tener diferente impacto dependiendo del tejido en el cual se lleve a cabo la reacción [50].

Los compuestos antioxidantes ejercen su acción al bloquear la producción de radicales libres, inhiben la oxidación y degradación de los bioproductos derivados de la oxidación lipídica. Esta actividad antioxidante, por parte de los compuestos fenólicos, está dada mayoritariamente por mecanismos de oxidación-reducción [51]. La capacidad antioxidante descrita se puede considerar como la actividad biológica responsable del efecto preventivo que se les atribuye sobre determinadas enfermedades [35].

Relación estructura-actividad antioxidante

La actividad antioxidante está fuertemente relacionada con su estructura química y es un factor determinante en su capacidad para actuar como inhibidores de la peroxidación lipídica, atrapando directamente a los radicales libres, o bien complejando iones de metales de transición que catalizan la formación de especies radicalarias.

La capacidad antioxidante de los ácidos fenólicos depende del número y posición de los grupos hidroxilo en relación al grupo carboxilo funcional. A medida que aumenta el número de sustituyentes hidroxilo aumentará la capacidad antioxidante. Al estar unidos a un anillo bencénico, los grupos hidroxilo confieren al polifenol la habilidad para actuar, ya sea como donante de un átomo de hidrógeno (HBD) o como donante de un electrón a un radical libre (o a otras especies reactivas). Así, el ácido gálico, con tres sustituyentes –OH presenta una alta capacidad antioxidante, mientras que la sustitución de los grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 por grupos metoxilo, como ocurre en el ácido siríngico, disminuye su actividad. Los ácidos hidroxicinámicos presentan actividades mayores que los ácidos hidroxibenzoicos, esto puede deberse a que los grupos CH=CH-COOH proporcionan una mayor capacidad para donar átomos de H y estabilizar el radical –COOH [3].

Efecto antimicrobiano

Se ha reportado la actividad inhibitoria contra diversos microorganismos, esta actividad es efectiva contra bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, varias enterobacterias y *Legionella pneumophila* [45].

Algunos de los compuestos fenólicos, como los ácidos clorogénicos, han sido reportados con un importante impacto sobre la microflora intestinal. Por lo que se busca nuevos antimicrobianos naturales que tengan aplicaciones en la producción de alimentos, mediante la inhibición del crecimiento microbiano y la prolongación de la vida útil de los mismos [45].



Debido a la capacidad antibacteriana los RSC, son utilizados con éxito en la producción de hongos comestibles. Otra aplicación de estos residuos, está relacionada con el hecho que son ricos en fibra dietética, por las grandes cantidades de celulosa, hemicelulosa, lignina y otros polisacáricos que contienen [45].

Por las propiedades mencionadas anteriormente los RSC abren una gran posibilidad para su reutilización en diferentes procesos biotecnológicos como [49 , 50]:

- Su uso como aditivo para evitar el deterioro de los alimentos.
- Tomar dichos antioxidantes dentro de un alimento o producto farmacéutico, y como parte de una dieta sana, así poder combatir el exceso de radicales libres de nuestro organismo y favorecer un estado global de salud.
- Como materia prima para obtener nuevos ingredientes funcionales para la industria alimentaria.
- Fabricación de biomateriales y productos de encapsulación para diversos fines industriales [21], debido a ser termoestables en un amplio rango de temperatura.

Los compuestos antioxidantes tienen numerosas aplicaciones en áreas alimenticias, cosméticas y farmacéuticas, porque pueden proteger contra enfermedades crónicas y degenerativas como cáncer y diabetes mellitus, y disminuyen los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, entre otras [53].

3.3. Procesos de obtención de compuestos fenólicos del café

3.3.1. Extracción

Fundamento de la extracción

La extracción es el primer paso en el aislamiento de compuestos fenólicos de residuos [54].

A partir de la estructura química y la cantidad de los compuestos fenólicos en los alimentos, se elige el proceso de extracción. El método utilizado para extraer compuestos fenólicos juega un papel importante en la calidad del extracto [2 , 54]. Hoy en día no hay un único procedimiento estándar y adecuado para la extracción de dichos compuestos [56].

Tipos de extracción

La extracción sólido-líquido es una de las operaciones unitarias más usadas para la separación, por su rapidez, simplicidad y amplio alcance; se basa en el uso de un solvente que sea miscible en el compuesto deseado, transfiriendo el volumen de la solución a la superficie del sólido para que dicho solvente penetre o se difunda en el sólido transfiriendo el soluto a la solución general [6]. Sin embargo la eficacia del proceso de extracción depende de varios factores como el tipo de solvente con polaridades variables y su concentración, la relación solvente/sólido, el número de pasos de extracción, pH, tiempo de contacto,



temperatura y tamaño de partículas de la matriz sólida [54]. La solubilidad de los fenólicos se rige por la naturaleza química de la muestra, ya que puede contener fenólicos simples (ácidos fenólicos, antocianinas) hasta sustancias polimerizadas (taninos). Además los compuestos fenólicos pueden estar asociados con otros componentes como carbohidratos y proteínas [57].

Un aumento en la temperatura puede promover una mayor solubilidad del analito al aumentar tanto la solubilidad como la velocidad de transferencia de masa. Además la viscosidad y la tensión superficial de los disolventes disminuye a temperaturas más altas, lo que ayuda a que los disolventes lleguen a la muestra mejorando la extracción [58].

Sin embargo, muchos compuestos fenólicos se hidrolizan y oxidan fácilmente. Largos tiempos de extracción y altas temperaturas aumentan la posibilidad de oxidación disminuyendo el rendimiento de extractos fenólicos [57].

Para obtener los polifenoles naturales, se han estudiado métodos convencionales de extracción, como son las extracciones con disolventes [19]. Sin embargo, debido a las desventajas que presentan en cuanto a la cantidad de solvente empleado y el tiempo de extracción, han sido desarrolladas nuevas técnicas, como la extracción por ultrasonidos, por líquido a presión, por fluido supercrítico, por microondas (MAE), etc. [59].

La Tabla 3.2 muestra las ventajas e inconvenientes de diferentes técnicas de extracción. Basándonos en ellas, se considera la **extracción por microondas** óptima para la realización de la experimentación.

Esta técnica se basa en la irradiación de ondas de microondas causando el movimiento de las moléculas por migración de iones y rotación de dipolos que contribuyen a un incremento de la temperatura, lo que facilita la difusión de compuestos desde la matriz al disolvente. La principal ventaja es la reducción del tiempo de extracción y volumen de disolvente [60].



Tabla 3.2. Principales ventajas e inconvenientes de las diferentes técnicas de extracción.

Técnica	Ventajas	Inconvenientes	Referencia
Extracción con disolventes	Buena eficacia Amplia aplicabilidad Buena recuperación de compuestos fenólicos Simple de realizar	Gran cantidad de disolventes Elevado tiempo de extracción Posible degradación de los compuestos deseados Posible extracción de compuestos no fenólicos Operaciones de purificación posteriores Disolventes caros y peligrosos	[1]
Extracción por líquido a presión	Permite el uso de solventes líquidos a temperaturas superiores a su punto de ebullición Extracción rápida Menor cantidad de solvente Alta eficacia en la extracción de compuestos bioactivos	No apropiado para compuestos térmicamente lábiles Elevado coste económico Necesita limpieza posterior	[61]
Extracción asistida por microondas	Eficacia elevada debido a las altas temperaturas Tiempo de extracción corto Reducción del consumo de disolvente Bajo coste Técnica rápida y sencilla Tecnología verde	Temperaturas muy elevadas puede generar compuestos indeseados Necesita filtración posterior Baja eficiencia con disolventes o compuestos objetivo no polares o volátiles	[60]
Extracción asistida por ultrasonidos	Alta recuperación de compuestos Menor consumo de disolvente Disolventes más seguros Genera compuestos fenólicos menos degradados Reducción del tiempo y temperatura de extracción Reducción de energía	Falta de uniformidad en la distribución de la energía Disminución de la potencia con el tiempo	[62]
Extracción con fluido supercrítico	Respetuosa con el medio ambiente La alta volatilidad de estos fluidos facilita su eliminación y asegura niveles muy bajos de solvente residual en el producto final	No recomendable para productos con pequeña cantidad de compuestos fenólicos Elevado coste económico Baja disponibilidad de equipos	[60]



Tipos de solventes

La elección del solvente es uno de los parámetros predominantes, puesto que los polifenoles son solubles en solventes polares próticos, aquellos que son capaces de estabilizar las cargas formando puentes de hidrógeno; se caracterizan por la presencia de grupos hidroxilo y una parte alifática en su estructura, permitiendo la solubilización de productos naturales y disminuyendo la actividad de la enzima polifenol oxidasa [6, 58]. Debido a la polaridad de los ácidos fenólicos no se pueden extraer completamente con solventes orgánicos puros, por lo que son empleadas mezclas de alcohol-agua o solventes menos polares como cloroformo, hexano, benceno, etc. [46]. El uso de etanol ha sido citado por muchos investigadores como un buen disolvente, consiguiendo un aumento del rendimiento de compuestos fenólicos en un 50% en comparación con el uso exclusivo de agua [28].

Los solventes verdes se usan ampliamente en química para minimizar problemas ambientales asociados con el uso de solventes tradicionales, así como reducir el costo y mejorar la seguridad y la salud [64]. Para superar dichos problemas ha surgido un nuevo solvente iónico, que se conoce como **solvente eutéctico profundo (DES)**, se obtiene mezclando dos componentes de baja toxicidad para formar una mezcla eutéctica [65], entre una sal de haluro u otro aceptador de enlace de hidrógeno (HBA) y un HBD [66]. Uno de los componentes más utilizados es el **cloruro de colina (ChCl)** que es una sal de amonio cuaternario económica, biodegradable y no tóxica. ChCl puede formar un DES con otro componente seguro HBD, como la urea, el glicerol, los ácidos carboxílicos o los polifenoles [67].

La Figura 3.10 muestra la estructura de los DES empleados, unos de los más utilizados en la industria agroalimentaria [68]. E. Yuniarti et al. estudiaron como los DES pueden extraer compuestos bioactivos de los frutos y se pueden usar como solventes. Además de presentar otras ventajas como su biodegradabilidad y viscosidad ajustable [64].



Figura 3.10. Estructura DES empleados.

En la Tabla 3.3 se muestra un resumen de los diferentes tipos de extracción de compuestos fenólicos para los residuos del café encontrados tras una exhaustiva revisión bibliográfica. La extracción por microondas de compuestos fenólicos usando DES es un enfoque novedoso para extraer estos compuestos del RSC. Ya



que como se observa, la información documentada sobre el residuo sólido de café, junto con la extracción con microondas y los DES, es escasa. Motivo por el cual nos indujo a llevar a cabo dicha experimentación.

Tabla 3.3. Estudio de optimización de información para la producción de compuestos fenólicos.

Materia Prima	Tipo de extracción	Condiciones de extracción	Tipo solvente	Referencia
RSC	Extracción con fluido supercrítico	T: 160-180 °C Presión: 34-172 bar Tiempo: 38-55 min Relación Sólido-líquido: 14,1 g/L	Agua	[19]
RSC	Extracción con disolvente	Relación Sólido-líquido: 40 mL/g Tiempo: 90 min Potencia: 550W	Metanol al 60 %	[54]
RSC	Extracción con microondas	Relación Sólido-líquido: 12 mL/g Tiempo: 3 min	Etanol al 20%	[69]
RSC	Extracción asistida por ultrasonido	T: 60 °C 32,5 % p/p de agua Relación molar 7: 1 DES Relación Sólido-líquido: 2,6 mL/100 mg	1,6-hexanodiol: ChCl	[70]
RSC	Extracción líquida a presión	T: 90 °C 16% etanol Presión: 100-150 bar	Agua y etanol	[71]
RSC	Extracción por líquido a presión	T: 195 °C	Agua y etanol	[72]
RSC	Extracción por autohidrólisis	T: 200 °C Tiempo: 50 min Relación Sólido-líquido: 15 mL/g	Agua	[57]
RSC	Extracción por ultrasonidos	Potencia: 244 W T: 40 °C Tiempo: 34 min Relación Sólido-líquido: 1:17 g/mL	Etanol	[73]



3.3.2. Separación y purificación.

Los extractos de plantas pueden contener carbohidratos y/o material lipoidal.

Para concentrar y obtener fracciones de polifenoles antes del análisis, se han usado estrategias que incluyen extracción secuencial o partición líquido/líquido y/o extracción en fase sólida (SPE) basada en polaridad y acidez.

En general, la eliminación del material lipoidal se puede lograr lavando el extracto con solventes no polares como el hexano, diclorometano o cloroformo [74]. Para eliminar compuestos polares no fenólicos como azúcares, ácidos orgánicos se suele llevar a cabo un proceso SPE. Es una técnica ampliamente utilizada debido a que se pueden usar diferentes cartuchos y discos con gran variedad de sorbentes. Los cartuchos C18 han sido lo más empleados. Tras el paso de la muestra acuosa por el cartucho C18 preacondicionado, los cartuchos se lavan con agua acidificada para eliminar el azúcar, los ácidos orgánicos y otros constituyentes solubles en agua. Los polifenoles se eluyen con metanol absoluto o acetona acuosa [74].

La cromatografía en columna es también empleada para el fraccionamiento de extractos fenólicos, a pesar de que es un método que requiere mucho trabajo y consume gran cantidad de solventes, pero proporciona mayores cantidades de fracciones para el posterior aislamiento e identificación de sustancias puras. Los sorbentes habitualmente empleados son RP-C18 Toyopearl, LH-20 y, en menor medida, resina de poliamida. El etanol, metanol, acetona y agua y sus combinaciones se usan comúnmente como eluyentes [75]. La **cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)** a escala preparativa también es un buen método para la purificación de muestras de polifenoles

Como alternativa a la cromatografía líquida se ha desarrollado la cromatografía de contracorriente (CCC), es una técnica de cromatografía preparativa basada en la división entre dos fases líquidas inmiscibles, una fase líquida estacionaria y una fase móvil líquida. Los solutos se separan según sus coeficientes de reparto entre las dos fases del disolvente en función de su hidrofobicidad¹ [76].

¹ El término hidrófobo se aplica a aquellas sustancias que son repelidas por el agua o no se pueden mezclar con ella.



3.4. Determinación de compuestos fenólicos

3.4.1. Técnicas de determinación analítica

La importancia del análisis de los compuestos polifenólicos en los alimentos radica, no sólo, en encontrar el mejor método de extracción sino también en la cuantificación e identificación completa y precisa de estos compuestos. Para ello existen numerosos **métodos espectrofotométricos** basados en diferentes principios químicos por los que se pueden cuantificar desde polifenoles totales hasta determinados grupos de compuestos [77]. La cuantificación de los compuestos fenólicos está influenciada por la naturaleza química del analito, así como del método de ensayo, la selección de estándares y la presencia de sustancias inertes [78]. Debido a la heterogeneidad de los fenólicos y la posible interferencia de otras sustancias oxidadas, no es sorprendente que haya tantos métodos de determinación de fenoles totales. Entre estos métodos se encuentran el método de Folin-Ciocalteu (F-C), Folin-Denis (FD), titulación de permanganato, colorimetría con sales de hierro, y absorbancia ultravioleta para la cuantificación de polifenoles totales o el método de la vainillina para determinación de proantocianidinas entre otros [56].

El **ensayo F-C** se basa en la transferencia de electrones en medio alcalino de compuestos fenólicos a complejos de ácido fosfomolibdico/fosfotungstico para formar complejos azules que se determinan espectroscópicamente a aproximadamente 760 nm [79]. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que se mide para evaluar el contenido de fenoles [80]. La Figura 3.11 muestra la reacción entre el ácido gálico y el reactivo F-C.

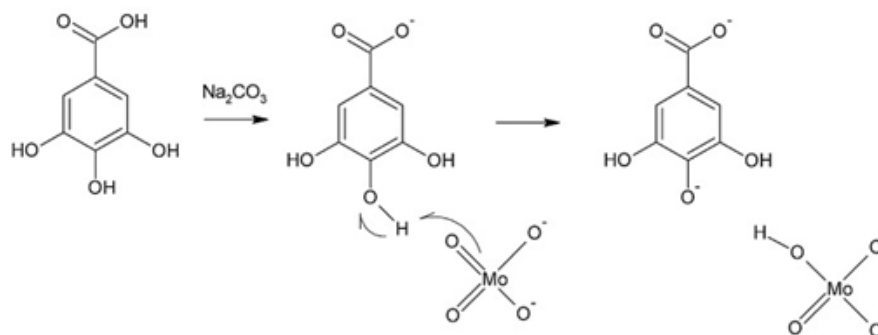


Figura 3.11. Reacción entre el ácido gálico y el reactivo F-C.

El **ácido gálico** es ampliamente utilizado como estándar de comparación y los valores normalmente se miden como miligramos de ácido gálico equivalente por kilogramos o litro de extracto [77].

HPLC es actualmente la técnica más popular y fiable para el análisis de fenólicos, ya que ofrece la oportunidad de analizar simultáneamente todos los componentes de interés junto con sus posibles



derivados o productos de degradación [77]. Se han publicado diversos artículos sobre la purificación y cuantificación de compuestos fenólicos utilizando la técnica HPLC [81]. Normalmente, se pueden separar varios compuestos fenólicos usando columnas adecuadas para trabajar en fase normal e inversa (RP-C18), siendo esta segunda mejor en presencia de fases móviles preparadas con diferentes solventes con diferentes polaridades.

J. Dai y R. J. Mumper estudiaron como la temperatura de la columna puede afectar a la separación de fenólicos, por ello, se recomienda su utilización a temperatura constante [77].

En la técnica de HPLC, la selección del detector juega un papel importante en el proceso de identificación y depende de las propiedades de los compuestos fenólicos. Los métodos de detección más empleados para compuestos fenólicos son el UV/VIS y la matriz de fotodiodos (DAD) [78]. El método HPLC-DAD es rápido, preciso y sensible, además requiere un bajo consumo de muestra [82].

Dada la existencia intrínseca de enlaces dobles y aromáticos conjugados, cada fenol exhibe una absorción mayor o menor en la región ultravioleta (UV) o ultravioleta/visible (UV/VIS), por lo que es una técnica comúnmente empleada, ya que dan mucha información de los compuestos en mezclas complejas. La selección de la longitud de onda es el punto más importante para este método, de modo que el solvente y los compuestos adicionales disponibles no deberían tener absorción en esta longitud de onda [83].

También se emplean espectrometría de masas (MS), detección de resonancia magnética nuclear (RMN), etc.

Con relación a las fases móviles en isocrático o gradiente, las más usadas son las que utilizan el metanol y/o acetonitrilo, dado el carácter ácido de los fenoles. También debe mencionarse que la fase móvil debe estabilizarse en el rango de pH entre 2 - 4 para evitar la ionización de compuestos fenólicos [83], para ello se emplean modificadores como el ácido acético o fórmico [77].



4. Metodología experimental

4.1. Materiales y Reactivos

Reactivos:

Los reactivos empleados en el trabajo experimental son:

- **Agua Ultrapura.** milli-Q
- **Carbonato de sodio** (99,8% pureza): Panreac Applichem.
- **Cloruro de colina** con pureza $\geq 98\%$: LAB-SCAN.
- **Glicerol** con pureza $\geq 99\%$: LAB-SCAN.
- **Hexano** con pureza $\geq 95\%$: LAB-SCAN.
- **Hidróxido sódico** con pureza $\geq 97\%$: LAB-SCAN.
- **Metanol** (99,8% pureza): LAB-SCAN.
- **Pastillas de 0,3% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.**
- **Reactivo Folin-Ciocalteu:** Panreac Applichem.
- **Acetonitrilo de calidad HPLC:** Panreac Applichem.

Disoluciones:

En este apartado se recogen todas las disoluciones utilizadas a lo largo del trabajo experimental

- **Disoluciones patrón fenoles:** Preparadas por pesada exacta de las cantidades de sustancia patrón necesarias para conseguir la concentración mostrada en la Tabla 4.1 y posterior disolución en agua-metanol 50 %/50 % : 4-Hidroxibenzoico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, vanilina, ácido siríngico, siringaldehído, ácido ferúlico.
- **Disoluciones patrón azúcares:** Preparadas por pesada exacta de las cantidades de sustancia patrón necesarias para conseguir la concentración mostrada en la Tabla 4.1 y posterior disolución en agua: D(-)-(-)Xilosa, D(+)-Glucosa, L-(+)-Arabinosa, D-(+)-Manosa, D-(+)-Galactosa.
- **Disoluciones patrón productos de degradación:** Preparadas por pesada exacta de las cantidades de sustancia patrón necesarias para conseguir la concentración mostrada en la Tabla 4.1 y posterior disolución en agua: ácido acético, ácido fórmico, furfural y hidroximetilfurfural (HMF).
- **Disolución patrón ácido gálico:** Preparadas por pesada exacta de las cantidades de sustancia patrón necesarias para conseguir la concentración mostrada en la Tabla 4.1 y posterior disolución en agua.



Tabla 4.1. Sustancias patrón

Patrón	Pureza (%)	Fabricante	C (mg/L)
4-Hidroxibenzoico	≥98	Merck Kgaa	1000
Ácido ferúlico	99	Sigma Alrich	1000
Ácido p-cumárico	≥98	Sigma Alrich	1000
Ácido siríngico	≥95	Sigma Alrich	1000
Ácido vanílico	≥97	Sigma Alrich	1000
Siringaldehido	98	Sigma Alrich	1000
Vanilina	99	Sigma Alrich	1000
D(-)+(-)Xilosa	≥99	Sigma Alrich	1000
D(+)- Glucosa	≥99,5	PanReac	1000
D(-)-Galactosa	≥99	PanReac	1000
D(+)-Manosa	99	PanReac	1000
L(-)-Arabinosa	≥99	PanReac	1000
Ácido acético	≥99	Sigma Alrich	1000
Ácido fórmico	≥95	Sigma Alrich	1000
Furfural	99	Sigma Alrich	1000
HMF	≥99	Sigma Alrich	1000
Ácido Gálico	≥98	LAB-SCAN	1000

- **Disolución de ácido sulfúrico 0,01 N.** Preparada por dilución de 10 mL de ácido sulfúrico en 1000 mL de agua.
- **Disolución de acetonitrilo al 20 % en agua.** Preparada por dilución de 200 mL de acetonitrilo en 1000mL de agua.
- **Disolución de ácido fórmico al 0,1 % en agua.** Preparada por dilución de 0,5 mL de ácido fórmico en 500 mL de agua.
- **Disolución de metanol al 50 % en agua.** Preparada para realizar las diluciones de los patrones por 250 mL de metanol en 250 mL de agua.
- **Ácido sulfúrico** al 72%: Panreac Applichem.
- **Ácido sulfúrico** al 96%: Panreac Applichem.
- **Etanol** al 96%: Panreac Applichem.

Material:

Para el desarrollo de todo el trabajo experimental, se utilizó el siguiente material:

- **Agitadores magnéticos.**
- **Autoclave:** RAYPA AE-DRY.
- **Balanza analítica** Sartorius con precisión de 0.01 mg.
- **Baño de agua.**



- **Biorreactores** de 500 mL.
- **Bomba de vacío.**
- **Cápsulas de porcelana.**
- **Centrífuga** de alta velocidad: PLASMA 22 Biotech.
- **Desecador.**
- **Destilador BUCHI.**
- **Digestor:** SpeedDigester K-439.
- **Estufa a 100 °C:** Memert.
- **Estufa a 60 °C:** P-Selecta.
- **Equipo de multifiltración a vacío.**
- **Filtros de jeringa** de Polivinilideno fluoruro (PVDF) de 0,45 µm.
- **Horno mufla:** Tander, S.A
- **Material de vidrio de laboratorio** de uso general.
- **Membranas de filtración 0.45 µm de nylon**, empleadas para la filtración de disolventes orgánicos.
- **Micropipeta** de 0,5 – 10 µL, 10 - 50 µL, 50 - 200 µL, 0,2 – 1,0 mL y 1 – 10 mL.
- **Molinillo de café** marca MOULINEX.
- **Placa agitadora-calefactora** Heildoph Modelo 2002.
- **Tubos de destilación NKT.**
- **Unidad de destilación K-360.**
- **Viales de vidrio** (de 2 mL de capacidad) de para inyección cromatográfica.
- **Viales Eppendorf** de 2 mL de capacidad.

4.2. Equipos principales

1. Reactor Microondas (Anton Paar GmbH, Austria, Europe):

Equipo empleado para llevar a cabo el proceso de extracción asistida con microondas para la recuperación de compuestos fenólicos a partir del residuo sólido de café empleando DES como disolvente.

- Tubos de cerámica y resina de politetrafluoretileno modificado (PTFE-TFM).
- Rotor tipo 16HF100.
- Sonda de presión/temperatura interna.



2. **Equipo de extracción sólido-líquido (VECP SCIENTIFIC SER 148):**

Equipo empleado para llevar a cabo el proceso de extracción para la caracterización de la materia prima RSC.

- Cartuchos de extracción.
- Algodón desengrasado.
- Matraces de base plana adaptable al extractor.
- Anillos metálicos.

3. **Equipos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)** equipados con una bomba cuaternaria, sistema de desgasificación en línea, un inyector automático, un horno (en cuyo interior se encuentra una columna cromatográfica) y detectores de matriz de fotodiodos DAD (280 nm, Waters 996), de longitud de onda variable (Agilent) e índice de refracción (Waters 2414).

Equipo empleado para la determinación de azúcares y compuestos de degradación de la materia prima RSC. Y para la identificación de compuestos fenólicos individuales

Se han usado diferentes columnas cromatográficas:

- Columna Aminex HPX-87H (BIO-RAD); 300 mm x 7,8 mm con un tamaño de partícula de 9 μm para la determinación de carbohidratos
- Columna Bondapak C18 (Waters, Ireland): 300 mm x 3,9 mm con un tamaño de partícula de 10 μm para la identificación de compuestos fenólicos individuales.

4. **Espectrofotómetro UV/VIS (UVmini-1240 Shimadzu).**

Equipo empleado para la caracterización y determinación de compuestos fenólicos totales de la materia prima RSC.

- Cubetas de plástico, vidrio y cuarzo.

4.3. Acondicionamiento de la materia prima RSC

El residuo sólido de café (RSC) se almacena a 5 °C hasta su uso. Antes de las pruebas experimentales, el RSC, se seca en un horno a 60 °C, se muele utilizando un molinillo de café (Moulinex, A505, Francia) con un tamaño de partícula inferior a 1 mm y se homogeneiza.



4.4. Recuperación de compuestos fenólicos mediante una extracción con microondas

En este estudio se propone la utilización de una extracción DES asistida por microondas con objeto de extraer los compuestos fenólicos presentes en RSC. Se realiza en un reactor microondas, modelo Multiwave PRO SOLV (Anton Paar GmbH, Austria, Europa) de 50 Hz con rotor tipo 16HF100 (Figura 4.1.). El reactor está compuesto por dos magnetrones de 1000 W, siendo 1800 W la potencia máxima del microondas. Se utilizan tubos de presión de PTFE-TFM, equipados con imanes de agitación y con un volumen de capacidad de 100 mL. Estos tubos son introducidos dentro de tubos de cerámica (Figura 4.2.).

El reactor puede usarse con hasta 16 tubos de muestra, y uno de ellos contiene un sensor de presión/temperatura interna. Este sensor se utiliza para controlar permanentemente la energía de microondas aplicada por el reactor. Además, el reactor cuenta con un sensor IR para registrar la temperatura de todos los tubos constantemente.



Figura 4.1. Equipo de microondas



Figura 4.2. Tubo de presión de cerámica

Concretamente, se mezclan 5 g del residuo del café y 50 mL de disolución DES requerida para cada experimento, siendo empleado por tanto una relación sólido: líquido del 10 % (p/v). La solución DES empleada fue cloruro de colina (ChCl): Glicerol (Glic). El reactor se calienta, pudiendo alcanzar la temperatura seleccionada ajustando la potencia de entrada. Se usan también diferentes rampas de calentamiento dependiendo de la temperatura de trabajo establecida en cada experimento. Después de alcanzar la temperatura deseada, ésta se mantiene el tiempo estipulado. Una vez que el experimento termina, los tubos se enfrían a aproximadamente 55 °C. La suspensión se filtra a vacío y la fase sólida se separa de la fracción líquida, se lava con agua destilada, se seca a 60 °C durante unas 24 horas y se pesa para determinar la recuperación total gravimétrica (g fracción sólida/100 g de RSC). Además, los extractos



líquidos son analizados con objeto de determinar su contenido en monosacáridos, productos de degradación y compuestos fenólicos (tanto totales, como los diferentes compuestos fenólicos individuales identificados).

4.4.1. Preparación de los DES

Para realizar la mezcla se añaden las cantidades correspondientes de ChCl y glicerol en los reactores cerrados conectados a un baño de agua a 80 °C y se deja con agitación continua durante al menos 90 min. En la Tabla 4.2 se pueden ver las relaciones empleadas en cada experimento.

Una vez homogenizada la mezcla se vierte en botellas de vidrio previamente identificadas y se añade el % de agua correspondiente a cada experimento (Ver Tabla 4.2).

4.4.2. Diseño experimental

Teniendo en cuenta distintas investigaciones [60 , 89 , 90] donde se comparan diferentes procesos de extracción por microondas modificando el tiempo de extracción, tipo de solvente y temperatura, es necesario preparar un diseño experimental para conseguir maximizar la recuperación de compuestos fenólicos.

Obtener un contenido alto de polifenoles en el extracto beneficia su posterior purificación e impacta en la economía del proceso, ya que a alta concentración del producto, menor consumo de energía a la hora de purificar [57].

El factor más investigado en la extracción por microondas es la temperatura de extracción, ya que contribuye al aumento de las recuperaciones. Cuando la extracción se realiza en recipientes cerrados la temperatura puede alcanzar valores por encima del punto de ebullición del disolvente, lo que da como resultado mejores eficiencias debido al aumento de la desorción de analitos de los sitios activos de la matriz. Además, hace que los solventes tengan una mayor capacidad para solubilizar el analito a temperaturas más elevadas, mientras que la tensión superficial y la viscosidad del solvente disminuyen con la temperatura, lo que supone una mejora de la humectación de la muestra y penetración de la matriz, respectivamente. Sin embargo, unas temperaturas muy elevadas pueden conllevar a una degradación del analito [60].

Los tiempos de extracción en comparación con las técnicas convencionales son muy cortos. A menudo, 10 min son suficientes [85].

La elección del solvente es fundamental para obtener un proceso óptimo, para ello se deben tener en cuenta las propiedades de absorción y la solubilidad del analito. Por ello, se han sintetizado diferentes relaciones molares de ChCl:Glic para determinar la influencia de la relación molar HBA:HBD en la eficiencia de la extracción.



El efecto del agua, depende del disolvente de extracción empleado, sin embargo, esta siempre tendrá un efecto sobre la capacidad de absorción del microondas y, por lo tanto, facilitará el proceso de calentamiento. También puede tener un efecto de hinchamiento en la matriz y/o influir en las interacciones analito-matriz, haciendo que los analitos estén más disponibles para el disolvente de extracción [86].

El rango de composición cubierto entre la relación molar y el % de agua, se selecciona con el requisito de que el DES preparado tenga que ser un líquido estable en condiciones ambientales.

Hay otros factores que se podrían tener en cuenta como son la presión y la potencia. Debido a la correlación que hay entre la temperatura y la presión este factor no es a menudo investigado. La potencia se suele elegir en caso de ser necesario minimizar el tiempo para alcanzar la temperatura establecida. El proceso de extracción podría verse influenciado por el pH o la cantidad de muestra. Sin embargo, son factores de menos efecto en el analito [60].

Para seleccionar las condiciones óptimas para la extracción DES asistida por microondas de compuestos fenólicos en RSC, se planifica un **diseño central compuesto rotatable** [87]. El diseño cuenta con un total de 30 experimentos, incluyendo un punto y cinco réplicas en el centro del dominio seleccionado para cada factor en estudio y ocho puntos estrella, dos para cada factor. La temperatura (T) (30 - 150 °C), el tiempo (t) (0 - 20 min), el % de agua en DES (0 - 95%) y la relación ChCl:Glic (0 - 2) fueron los factores o variables independientes seleccionadas. La Tabla 4.2 recoge los factores y niveles empleados. Los datos experimentales se analizan con el software comercial *Statgraphics Centurion XVII*.



Tabla 4.2. Diseño experimental de extracción DES asistida por microondas.

	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>%Agua en DES</i>	<i>ChCl:Glic</i>
1	60	5	70	1,5
2	120	5	20	0,5
3	60	5	20	0,5
4	60	15	70	1,5
5	60	15	20	1,5
6	90	10	45	1
7	90	10	45	0
8	120	5	70	1,5
9	120	15	20	0,5
10	60	5	20	1,5
11	90	10	45	1
12	120	5	70	0,5
13	60	15	70	0,5
14	120	15	20	1,5
15	90	10	45	1
16	90	10	45	1
17	90	10	45	1
18	60	5	20	0,5
19	90	10	45	1
20	120	15	70	0,5
21	150	10	45	1
22	30	10	45	1
23	120	15	70	1,5
24	90	0	45	1
25	90	20	45	1
26	90	10	45	2
27	120	5	20	1,5
28	60	5	70	0,5
29	90	10	0	1
30	90	10	95	1

Adicionalmente se hace una extracción con 25% etanol (p/v) con el fin de comprobar la eficacia de los DES respecto al disolvente convencional. La extracción se realiza a una temperatura de 60 °C durante 15 minutos.



4.4.3. Optimización

Una vez realizado el diseño, se ha maximizado la variable respuesta contenido de fenoles totales con la finalidad de obtener el valor óptimo de la misma. Para ello, se usa el mismo programa con el que se ha determinado el diseño experimental, *Statgraphics Centurion XVII*.

4.5. Determinación analítica

En este apartado se describen los métodos empleados para la caracterización de la materia prima, así como los métodos de análisis para la determinación de la composición en azúcares, productos de degradación y compuestos fenólicos de los extractos líquidos originados tras la extracción DES asistida por microondas.

4.5.1. Caracterización de la materia prima (RSC).

De acuerdo con la naturaleza de la muestra, se procede a una extracción secuencial con agua y etanol, usando el equipo de extracción VECP SCIENTIFIC SER 148 (Figura 4.3). Las extracciones fueron llevadas a cabo por triplicado.

El proceso de extracción completo fue el siguiente: se pesan 3 g de muestra seca en el cartucho previamente metido en estufa a 105 °C durante 24 horas para asegurarnos de que no contaba con humedad previa. Se cierra el cartucho con algodón desengrasado para evitar arrastrar sólidos durante la extracción, y a continuación, se coloca el anillo metálico con ayuda de unas pinzas (este anillo está imantado y sirve para fijar el cartucho al equipo).



Figura 4.3. Equipo de extracción VECP SCIENTIFIC SER 148.



En la primera extracción se llena el vaso con 60 mL de agua. Se coloca el cartucho y el vaso en el equipo y se selecciona el programa predeterminado con los siguientes parámetros (Tabla 4.3.):

Tabla 4.3. Parámetros equipo de extracción

Disolvente	Temperatura (°C)	Tiempo inversión (min)	Tiempo de lavado (min)	Tiempo de recuperación (min)
Agua	200	30	60	40
Etanol	210	30	60	40

Una vez terminada la extracción con agua, se procede a una extracción secuencial con etanol (usando los cartuchos de RSC previamente extraídos con agua) de igual forma a como se ha mencionado para el caso de la extracción con agua, con la variación de que en los nuevos vasos de extracción se usan 80 mL de etanol y las condiciones de temperatura varían ligeramente (Tabla 4.3.)

Completada la extracción, se retira el anillo metálico y el algodón con ayuda de unas pinzas y se lleva el cartucho a la estufa a 60 °C durante 24 h. Posteriormente se usa la muestra para los análisis de caracterización.

Los vasos de extracción se llevan a la estufa a 100 °C durante 24 horas con objeto de calcular el % en masa de extractos.

Determinación de parámetros básicos

En este estudio, se parte de la caracterización de RSC, lo que incluye composición elemental (N, elementos mayores y menores), propiedades bromatológicas (cenizas, grasas, humedad y volátiles). La caracterización de las muestras se realiza tras el tratamiento previo de extracción agua-etanol, explicado arriba. La Figura 4.4 muestra el procedimiento de análisis llevado a cabo para la caracterización de la materia prima.

Estas determinaciones se basan en la metodología analítica del Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL, “*National Renewable Energy Laboratory*”) del instituto de investigación del medio oeste de U.S. [88].



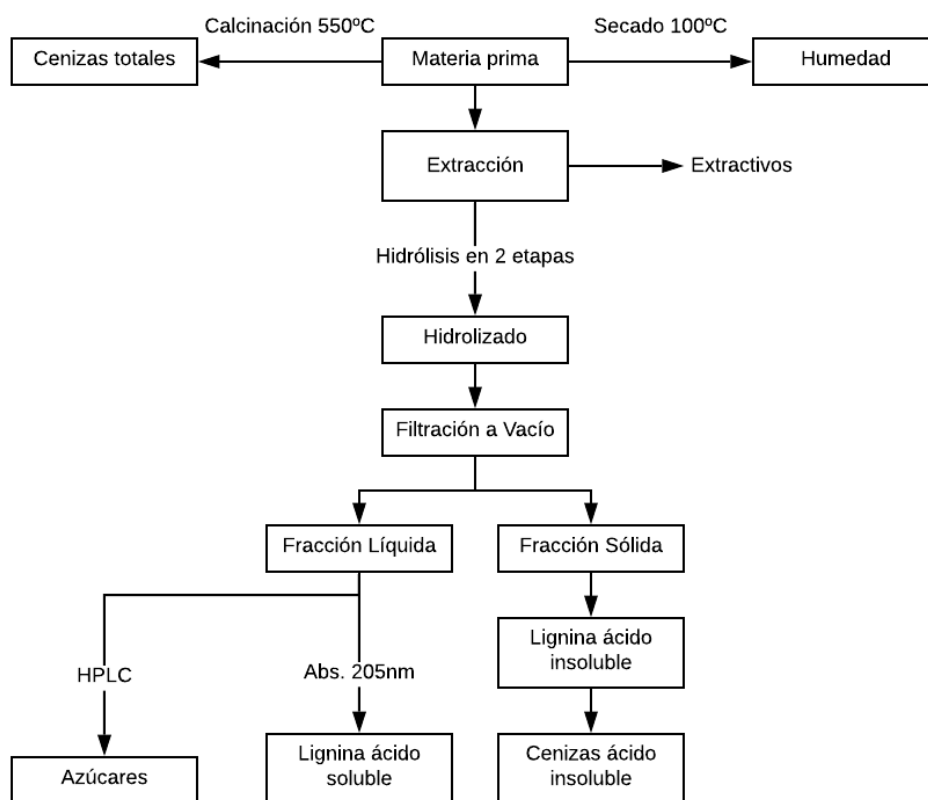


Figura 4.4. Procedimiento de análisis llevado a cabo para la caracterización de la materia prima.

Las determinaciones se realizaron por triplicado y se muestran los resultados promedio.

4.5.1.1. Determinación de humedad y cenizas.

Se pesan las cápsulas vacías después de mantenerlas 24 horas en la mufla a 550 °C e introducir las en el desecador para que se enfríen.

Se deposita 1 g de muestra y se mantiene en la estufa de 100 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se introduce en el desecador, cuando se enfrían (alrededor de 15 minutos) se pesan.

El **contenido en agua** de la muestra se calcula Eq. 4.1:

$$\%Humedad = \left(1 - \frac{M}{m}\right) * 100 \quad \text{Eq. 4.1}$$

Donde M es la masa inicial de la muestra y m es la masa del producto seco.



Una vez calculada la humedad, las cápsulas se introducen en la mufla a 500 °C durante 3 horas. Transcurrido este tiempo se introducen en la estufa de 100 °C durante 24 horas, se enfría la muestra en el desecador y después se pesan las cápsulas que contienen las cenizas.

El porcentaje de **cenizas** se obtiene de la siguiente manera (Eq. 4.2):

$$\% \text{Cenizas} = \left(\frac{C}{m} \right) * 100 \quad \text{Eq. 4.2}$$

Donde C es el peso de las cenizas y m la masa del producto seco.

4.5.1.2. Determinación de nitrógeno total y proteínas

El **contenido de proteínas** es el resultado de multiplicar el contenido de nitrógeno, determinado por el procedimiento Kjeldahl, por un factor de transformación del nitrógeno en proteínas.

Se pesan 0,1 g de muestra en los tubos Nkt, se adiciona 25 mL de agua miliQ, 6 ml de ácido sulfúrico concentrado, una pastilla Nkt (0,3% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y un trozo de cerámica y se comienza la digestión mediante calentamiento de la mezcla.

Una vez concluida la digestión, se deja enfriar y se procede al destilado en medio alcalino con hidróxido sódico y bórico. El líquido destilado se recoge en un matraz Erlenmeyer y se valora con ácido sulfúrico 0.02N. De esta manera se calculan los miliequivalentes de H_2SO_4 añadidos.

El porcentaje de nitrógeno es el siguiente Eq. 4.3:

$$\%N = \frac{N * V * 14}{10 * m} \quad \text{Eq. 4.3}$$

Siendo N la normalidad de H_2SO_4 usado para valorar, V el volumen de H_2SO_4 consumido en la valoración y m los gramos de muestra.

El porcentaje de **proteínas** (Eq. 4.4)

$$\% \text{Proteínas} = \%N * F \quad \text{Eq. 4.4}$$

Donde F es el factor de transformación de nitrógeno en proteínas (6,25).

4.5.1.3. Determinación de grasa

Se introducen los vasos de extracción con los cartuchos en la estufa a 100 °C durante 24 horas. Tras ser enfriados en el desecador se introducen 3 g de muestras en los cartuchos y se procede al pesado. A continuación, se tapan con algodón desengrasado, para evitar que la materia suba y se pone el anillo



imantado. En los vasos de extracción se añaden 80 mL de hexano y tras esta operación se ponen en el equipo. La Tabla 4.4 muestra los parámetros introducidos en el equipo para la determinación de grasa.

Tabla 4.4. Parámetros equipo de extracción para determinación de grasa.

Disolvente	Temperatura (°C)	Tiempo inversión (min)	Tiempo de lavado (min)	Tiempo de recuperación (min)
Hexano	140	60	50	30

Pasado el tiempo necesario se introduce el matraz en la estufa de 100 °C durante 24 horas y se pesa tras ser enfriado en el desecador.

El porcentaje de **grasa** se calcula con la Eq. 4.5:

$$\%Grasa = \frac{(P_1 - P_2)}{m} * 100 \quad \text{Eq. 4.5}$$

Donde P_1 es el peso del vaso con el extracto, P_2 es el peso del matraz vacío y m es el peso de muestra empleada.

4.5.1.4. Determinación de carbohidratos estructurales

Para ello, se pesan 0,3 g de la muestra libre de extractivos (RSC inicial) y se introduce en un tubo de ensayo. Se añaden 3 mL de H_2SO_4 y se agita con una varilla hasta que esté completamente impregnado. Se sumerge el tubo en un baño durante 1 hora a 30 °C procediendo a la agitación de la muestra cada 15 min para asegurar una mezcla completa. Se realiza por triplicado.

Adicionalmente, se pesan 0,3 g de glucosa, xilosa y arabinosa y se introduce en un tubo de ensayo. Se añade 3 mL de H_2SO_4 y se procede como se ha descrito anteriormente. Estas muestras (estándar de recuperación de azúcares) son los patrones y se hace en paralelo con el resto de las muestras. Los resultados de recuperación de azúcares de esta muestra se utilizan para corregir las pérdidas por degradación de azúcares durante la hidrólisis. Dicho procedimiento se realiza por triplicado.

Una vez transcurrida la hora de hidrólisis se transfieren los hidrolizados a una botella y se diluye al 3% la concentración del ácido añadiendo 84 mL de agua desionizada. Se pesan las botellas para registrar si hubiera pérdidas durante el proceso de autoclavado.

Se introducen en el autoclave las muestras con las botellas cerradas durante 1h a 120°C. Tras la finalización del proceso de autoclavado, se dejan enfriar 20 min a temperatura ambiente y seguidamente se pesan.

Finalmente, se filtra a vacío la solución de hidrólisis (mediante un filtro de 0,45 μm previamente desecado y pesado) y a continuación se filtra el líquido neutralizado directamente sobre un vial, utilizando una jeringa con un filtro de 0,2 μm .



Las concentraciones de azúcares (glucosa, xilosa y arabinosa) fueron medidos por HPLC usando una columna Aminex HPX-87H. Se usa un detector de índice de refracción (Waters 2414) para la medición de ellos.

Preparación línea de calibrado

Para la preparación de la línea de calibrado, a partir de la disolución madre realizada previamente, explicada en el apartado 4.1. Se procede a la dilución con agua de la disolución madre para obtener la línea de calibrado de concentraciones entre 0,25 y 12 g/L.

Condiciones cromatográficas.

Tras un estudio bibliográfico y una serie de estudios previos realizados, las condiciones cromatográficas seleccionadas fueron las siguientes:

- Flujo: 0,6 mL/min.
- Volumen de inyección: 20 μ L.
- Temperatura de la columna cromatográfica: 60 °C.
- Columna: Aminex HPX-87H; 300 mm x 7,8mm con un tamaño de partícula de 9 μ m.
- Fase móvil: 0,01 N H₂SO₄.

4.5.1.5. Determinación del contenido de lignina

Para el cálculo de la **lignina ácido soluble (LAS)**, tras la hidrólisis ácida se procede a la medición de la absorbancia a 205 nm realizando una dilución 1:10 con ácido sulfúrico 72% y utilizando una solución de ácido sulfúrico al 4% como blanco. La absorbancia entre la que deben estar las muestras es entre 200-700 nm.

Para la **lignina ácido insoluble (LAI)** y las **cenizas de ácido insoluble (CAI)** se coloca el sólido obtenido tras el filtrado de la hidrólisis en dos etapas en un crisol previamente mufleado a 550 °C durante 24 horas y pesado tras su enfriamiento. Se introduce el crisol con el sólido en la estufa de 100 °C durante 24 horas y se procede a su pesada tras su enfriamiento (W_1).

Finalmente, se lleva a la mufla a 550 °C durante 3 horas. Tras el enfriamiento se pesa (W_2) obteniendo así el contenido de cenizas ácido insoluble.

El porcentaje de **cenizas de ácido insoluble** se calcula (Eq. 4.6):

$$\% \text{cenizas ácido insoluble} = \frac{(W_2 - W_1)}{m} * 100 \quad \text{Eq. 4.6}$$



Donde m es el peso inicial de muestra, W_1 el peso del crisol y W_2 el peso del crisol con el sólido tras la mufla.

El porcentaje de **lignina insoluble** se calcula (Eq. 4.7):

$$\% \text{lignina insoluble (LAI)} = \frac{(W_3 - W_1)}{m} * 100 - \% \text{cenizas ácido insoluble} \quad \text{Eq. 4.7}$$

Donde m es el peso inicial de muestra, W_1 el peso del crisol y W_3 el peso del crisol con el sólido seco.

4.5.2. Determinación de carbohidratos y productos de degradación en extractos líquidos

Se analiza el contenido de carbohidratos estructurales y productos de degradación (ácido acético, ácido fórmico, furfural y hidroximetilfurfural (HMF) de los extractos líquidos obtenidos en la extracción asistida por microondas del RSC. Para la determinación de ellos, tras la extracción y posterior filtración, se miden por HPLC tal y como se explica en el apartado 4.5.1.4.

Por otro lado, los productos de degradación se miden igual que el contenido de carbohidratos estructurales.

Para determinar el contenido de azúcares oligoméricos en los extractos líquidos, se lleva a cabo un proceso de hidrólisis ácida (120 ° C, 3% p/v H₂SO₄, 30 min), que se calcula como la diferencia entre los azúcares libres totales antes y después de la hidrólisis ácida.

4.5.3. Determinación de compuestos fenólicos totales en extractos líquidos

Se emplea la metodología de F-C para la determinación total de compuestos fenólicos.

Preparación muestras

Con la fracción líquida obtenida tras el microondas se centrifuga y filtra, y se procede a hacer una dilución 1:10 de las muestras.

Preparación línea de calibrado del ácido gálico

Para la línea de calibrado se realiza con diversas diluciones de la disolución madre de ácido gálico de 1 g/L. Todas se realizan con agua.

Se construye una curva de calibración con 9 puntos con concentraciones entre 0,01 y 0,3 g/L.

Procedimiento método F-C

Para determinar el contenido total de compuestos fenólicos (TPC), se utiliza el método Folin-Ciocalteu [73]. Alícuotas de extractos (40 µL) se mezclan con el reactivo Folin-Ciocalteu (100 µL) y agua destilada (1560 µL) durante 1 minuto. A la mezcla completa se adiciona carbonato de sodio 20% (p/v) (300 µL), se homogeniza



y se incuba durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo se procede a centrifugar 3000 rpm durante 5 min, debido a que los DES precipitan, y se determina la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (UVmini-1240). Todos los análisis se realizan al menos por triplicado y se presentan en base de materia seca. Los resultados se calculan a través de la curva estándar de ácido gálico, y se expresan como mg GAE/g.

Para la medición en el espectrofotómetro primero se procede a hacer un blanco, a continuación, se mide la recta patrón y posteriormente se procede a la medición de las muestras. Todas ellas se miden a una longitud de onda de 765 nm.

4.5.4. Identificación de compuestos fenólicos individuales en extractos líquidos

Para la identificación individual de los siguientes compuestos fenólicos: ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido siríngico, siringaldehído, vanilina, ácido vanílico y 4-hidroxibenzoico, se utiliza el método HPLC con gradiente de fase móvil. Para ello, se puso a punto la separación cromatográfica.

Condiciones cromatográficas

Para obtener un método analítico que permitiera la correcta determinación de 7 compuestos fenólicos en RSC, fue necesario realizar una serie de ensayos previos con el fin de seleccionar el valor de todos aquellos factores que puedan afectar a la determinación cromatográfica.

Una vez consultada la bibliografía [89], se llevan a cabo una serie de estudios previos donde quedan fijados algunos de los parámetros que afectan a la retención del analito (flujo, rango del detector, volumen de inyección y temperatura). Fueron realizadas algunas experiencias en las que se modificó la composición de la fase móvil y el gradiente, con el fin de obtener una separación óptima de los picos. En la Tabla 4.5 se muestran las longitudes de ondas de absorción de los compuestos a medir.

Tabla 4.5 Longitudes de onda de absorción de los compuestos fenólicos

Compuesto fenólico	λ (nm)
4-hidroxibenzoico	254
ácido vanílico	254
ácido siríngico	276
vanilina	276
ácido p-cumarico	320
siringaldehído	320
ácido ferúlico	320



Las condiciones cromatográficas de partida fueron las siguientes:

- Flujo: 1 mL/min
- Volumen de inyección: 20 µL
- Temperatura de la columna cromatográfica: 35 °C
- Rango del detector: 220 nm.

La fase móvil consiste de dos disolventes. El disolvente A, agua ajustada con ácido fórmico al 0,1 % y el disolvente B, acetonitrilo. Se emplea según la bibliografía estudiada un gradiente tiempo - % de acetonitrilo de:

Tiempo(min)	% Acetonitrilo
0	0,5 %
10	5 %
20	35 %
22	0,5 %

Más 3 minutos de post time, antes de la siguiente inyección.

Este gradiente fue posteriormente modificado dado que no se consiguió la separación de los compuestos con él.

4.6. Definición de variables

Las ecuaciones empleadas para la obtención de los datos de este trabajo se exponen a continuación.

Se realizó el cálculo del porcentaje de **oligómeros** utilizando la xilosa y arabinosa mediante la Eq. 4.8. Ya que los oligómeros son la resta de los azúcares antes y después de la hidrólisis:

$$\%Olig = \frac{\text{azúcares potHidrólisis} - \text{azúcares preHidólisis}}{\text{azúcares potHidrólisis}} * 100 \quad \text{Eq. 4.8}$$

Las recuperaciones mediante las condiciones de extracción propuestas se evalúan mediante el porcentaje de **recuperación total gravimétrica (RTG) (recuperación de sólidos insolubles, recuperación de sólidos extraídos)**. Para ello se calcula el porcentaje de recuperación (Eq. 4.9)

$$\%RTG = \frac{g \text{ sólido después MAE} * (1 - \%humedad \text{ del sólido})}{g \text{ sólido antes MAE (mat. prima)}} * 100 \quad \text{Eq. 4.9}$$

También se calculan las **recuperaciones de los carbohidratos en el líquido extraído**, se calculan como un porcentaje del contenido de azúcar en el RSC no extraído.



A continuación, se puede observar las ecuaciones para la **recuperación de glucosa (RG)** (Eq. 4.10) (g glucosa en líquido tras MAE/100g glucosa en la materia prima) y la **recuperación de azúcares hemicelulósicos** (Eq. 4.11) (xilosa y arabinosa) (RAH) (g azúcares hemicelulósicos en líquido tras MAE/100g azúcares hemicelulósicos en la materia prima):

$$\%RG = \frac{\% \text{ glucosa después MAE}}{\% \text{ glucosa antes MAE (mat. prima)}} * 100 \quad \text{Eq. 4.10}$$

$$\%RAH = \frac{\% (\text{XGM} + \text{arabinosa}) \text{ después MAE}}{\% (\text{XGM} + \text{arabinosa}) \text{ antes MAE (mat. prima)}} * 100 \quad \text{Eq. 4.11}$$

Para la evaluación de la precisión, una vez obtenido el punto óptimo se repite el experimento por triplicado y se calcula la **Desviación Estándar (s_r)** tanto de los porcentajes de recuperación, como del TPC y la desviación estándar relativa (%DER_r) mediante la siguiente fórmula.

$$\%DER_r = \frac{s_r}{|\bar{X}|} * 100 \quad \text{Eq. 4.12}$$



5. Resultados y discusión

5.1. Validación del método cromatográfico. Carbohidratos

Para validar el sistema cromatográfico, se evalúan la linealidad, la repetibilidad, el sesgo, el límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) de acuerdo con las directrices de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH).

5.1.1. Linealidad de la respuesta

Se realiza a partir de las correspondientes líneas de calibrado construidas para cada método. Para verificar la linealidad del modelo de calibración escogido se emplea un análisis de varianza (ANOVA), una herramienta estadística que estima la varianza de la falta de ajuste al modelo lineal y la varianza residual (causada por la incertidumbre asociada a la obtención de respuestas). Ambas varianzas se comparan mediante una **prueba F de Fisher-Snedecor**.

De acuerdo con la hipótesis nula, las varianzas son homogéneas, con lo que el modelo lineal es adecuado y no hay falta de ajuste. La hipótesis alternativa, por su parte, establece que las varianzas no son comparables, así que el modelo lineal no es el adecuado y sí que hay falta de ajuste.

La prueba se hace por comparación entre el estadístico F, calculado como cociente de las varianzas, y el F crítico de una cola (para nivel de significación $\alpha = 0,05$ y los grados de libertad adecuados). Si **F experimental < F crítico**, se acepta la hipótesis nula. En caso contrario, ha de rechazarse la hipótesis nula y aceptarse la alternativa.

Línea de calibrado de los azúcares

- Glucosa

En la Figura 5.5 se muestra la línea de calibración obtenida para la glucosa a partir de patrones disueltos en agua con un intervalo de concentraciones entre 0,24 y 18 g/L.

Como se puede observar el coeficiente de correlación obtenido es de $R^2 = 0,99994$ ($R \geq 0,99$ valor habitual especificado en protocolos de métodos de validación), por lo que la linealidad del método es buena.



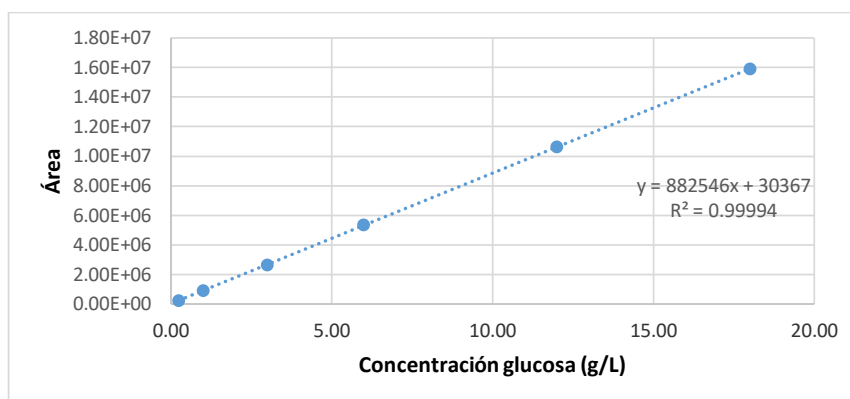


Figura 5.1. Línea de calibrado para la glucosa (n=2).

En la Tabla 5.1 se recogen los resultados obtenidos para el ANOVA. Se comprueba que para el analito estudiado el F experimental de la falta de ajuste es menor que el F crítico, con lo que se acepta la hipótesis nula; hay homogeneidad de varianzas, con lo que se acepta como válido el modelo lineal propuesto, con un nivel de confianza del 95%.

Como se observa la $F_{exp} (2,72) < F_{crit} (4,53)$ por lo que se puede concluir que el método presenta linealidad.

Tabla 5.1. Análisis de varianza para comprobar la validez del modelo lineal en el calibrado de la glucosa ($p=0,05$, $n=2$)

FUENTE	g.d.l.	FUENTE SS	SS	RMS	Fexp
Regresión	1	SSREG	$3,80 \cdot 10^{14}$	$3,80 \cdot 10^4$	$3,99 \cdot 10^5$
Residual	10	SSRESID	$9,51 \cdot 10^9$	$9,51 \cdot 10^8$	-
Falta de ajuste	4	SSFDA	$6,13 \cdot 10^9$	$1,53 \cdot 10^9$	2,72
Puro error	6	SSPE	$3,38 \cdot 10^9$	$5,63 \cdot 10^8$	-
Total	11	SSTOTAL	$3,80 \cdot 10^{14}$	-	-

g.d.l: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; RMS: medias cuadráticas;

$$F_{crit}=4,53$$

- **Xilosa**

En la Figura 5.2 se muestra la línea de calibración obtenida para la xilosa a partir de patrones disueltos en agua con un intervalo de concentraciones entre 0,24 y 18 g/L.

Como se puede observar el coeficiente de correlación obtenido es de $R^2 = 0,99991$ ($R \geq 0,99$ valor habitual especificado en protocolos de métodos de validación), por lo que la linealidad del método es buena.



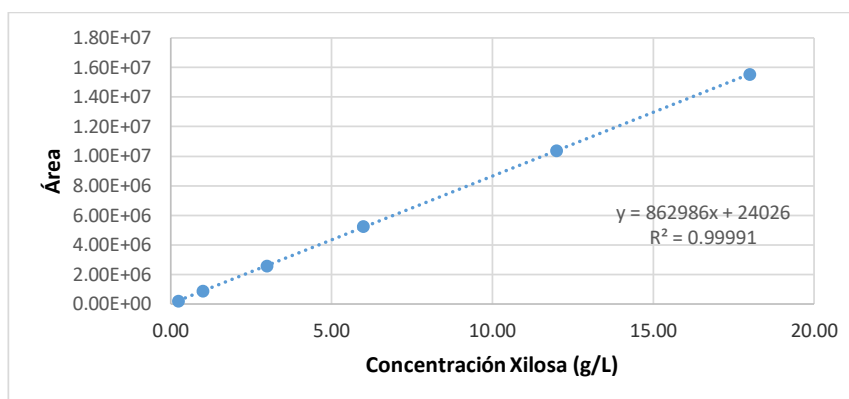


Figura 5.2. Línea de calibrado para la xilosa (n=2).

En la Tabla 5.2 se recogen los resultados obtenidos para el ANOVA. Se comprueba que para el analito estudiado el F experimental de la falta de ajuste es menor que el F crítico, con lo que se acepta la hipótesis nula; hay homogeneidad de varianzas, con lo que se acepta como válido el modelo lineal propuesto, con un nivel de confianza del 95%.

Como se observa en la tabla la $F_{exp} (3,35) < F_{crit} (4,53)$ por lo que se puede concluir que el método presenta linealidad.

Tabla 5.2 Análisis de varianza para comprobar la validez del modelo lineal en el calibrado del xilosa ($p=0,05$, $n=2$)

FUENTE	g.d.l.	FUENTE SS	SS	RMS	Fexp
Regresión	1	SSREG	$3,64 \cdot 10^{14}$	$3,64 \cdot 10^{14}$	$4,01 \cdot 10^5$
Residual	10	SSRESID	$9,08 \cdot 10^9$	$9,08 \cdot 10^8$	-
Falta de ajuste	4	SSFDA	$6,27 \cdot 10^9$	$1,57 \cdot 10^9$	3,35
Puro error	6	SSPE	$2,81 \cdot 10^9$	$4,68 \cdot 10^8$	-
Total	11	SSTOTAL	$3,64 \cdot 10^{14}$	-	-

g.d.l.: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; RMS: medias cuadráticas; $F_{crit}=4,53$

- **Arabinosa**

En la Figura 5.3 se muestra la línea de calibración obtenida para la Arabinosa a partir de patrones disueltos en agua con un intervalo de concentraciones entre 0,24 y 18 g/L.

Como se puede observar el coeficiente de correlación obtenido es de $R^2 = 0,99994$ ($R \geq 0,99$ valor habitual especificado en protocolos de métodos de validación), por lo que la linealidad del método es buena.



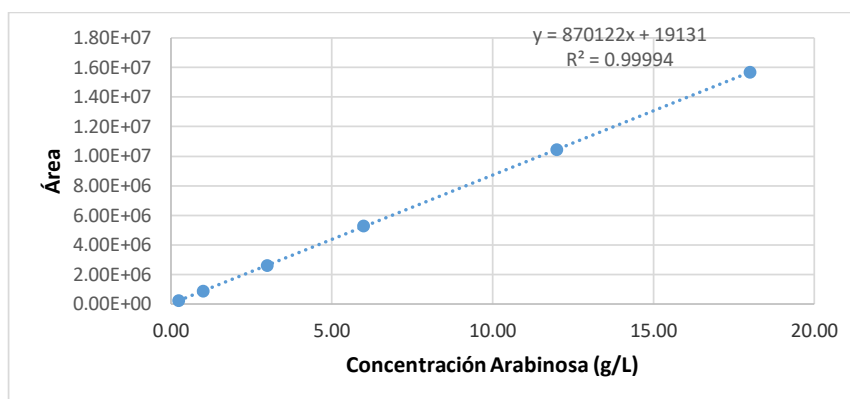


Figura 5.3. Línea de calibrado para la Arabinosa (n=2).

En la Tabla 5.3 se recogen los resultados obtenidos para el ANOVA. Se comprueba que para el analito estudiado el F experimental de la falta de ajuste es menor que el F crítico, con lo que se acepta la hipótesis nula; hay homogeneidad de varianzas, con lo que se acepta como válido el modelo lineal propuesto, con un nivel de confianza del 95%.

Como se observa en la tabla la $F_{exp} (1,95) < F_{crit} (4,53)$ por lo que se puede concluir que el método presenta linealidad.

Tabla 5.3 Análisis de varianza para comprobar la validez del modelo lineal en el calibrado de la Arabinosa ($p=0,05$, $n=2$)

FUENTE	g.d.l.	FUENTE SS	SS	RMS	Fexp
Regresión	1	SSREG	$3,70 \cdot 10^{14}$	$3,70 \cdot 10^{14}$	$3,68 \cdot 10^5$
Residual	10	SSRESID	$1,00 \cdot 10^{10}$	$1,00 \cdot 10^{10}$	-
Falta de ajuste	4	SSFDA	$5,69 \cdot 10^9$	$1,42 \cdot 10^9$	1,95
Puro error	6	SSPE	$4,36 \cdot 10^9$	$7,27 \cdot 10^8$	-
Total	11	SSTOTAL	$3,70 \cdot 10^{14}$	-	-

g.d.l.: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; RMS: medias cuadráticas; $F_{crit}=4,53$



5.1.2. Repetibilidad

Para evaluar la repetibilidad, se analiza 5 veces un patrón. Esta se expresa con el cálculo del porcentaje de **Desviación Estándar Relativa (%DERr)**, aceptándose imprecisiones máximas del 5%.

Como se puede observar en la Tabla 5.4, todas aceptan el criterio de repetibilidad.

Tabla 5.4. Análisis de repetibilidad (n=5)

AZUCÁRES	Glucosa	Xilosa	Arabinosa
Sr	0,08	0,07	0,07
Concentración Media	6,37	6,32	6,41
%DERr	1,23	1,06	1,14

sr: desviación estándar

5.1.3. Sesgo

El sesgo o veracidad se expresa como el **error relativo (%Eref)**. Se calcula la concentración de los estándares de la curva de calibración utilizando la ecuación obtenida por regresión lineal. Utilizando el método de mínimos cuadrados se obtiene la ecuación de la recta para la concentración calculada en función de la concentración teórica. Se establece un sesgo máximo del 10%.

Para los tres compuestos estudiados el error relativo resulto ser del orden del 7%, inferior al 10%.

5.1.4. Límite de detección (LD) y cuantificación (LC)

El LD se determina considerando una relación señal/ruido de 3 y el LC una relación señal/ruido de 10.

En la Tabla 5.5 se puede encontrar un resumen de los datos anteriores.

Tabla 5.5 Tiempo de retención y parámetros de validación para el HPLC método azúcares

Compuesto	R.T (min)	LI (R ²)	RE (%DERr)	Eref (%)	LD (mg/L)	LC (mg/L)
Glucosa	9,16	0,99994	1,23	7,27	0,039	0,2
Xilosa	9,8	0,99991	1,06	8,6	0,09	0,3
Arabinosa	10,7	0,99994	1,14	6,5	0,08	0,3

R.T. tiempo de retención, LI linealidad, RE: repetibilidad, Eref: Sesgo, LD: Límite de detección, LC: Límite de cuantificación.

5.2. Separación de compuestos fenólicos individuales mediante HPLC

Se identifican los compuestos fenólicos individuales (como el ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, vanilina, ácido siríngico, siríngaldehído, ácido cumárico y ácido ferúlico,) siguiendo el método descrito por Ana I. Paniagua-García et al. [89].



Al ensayar el primer gradiente propuesto en el apartado 4.5.3, se observa cómo los compuestos que eluyen en la zona media del cromatograma se solapan entre ellos. Por tanto, se procede a la modificación de las condiciones incluyendo el gradiente tras una fase isocrática. Las nuevas condiciones son:

Tiempo(min)	% Acetonitrilo
0	2 %
20	2 %
60	30
63	2

Con estas condiciones, se observa el comienzo de la separación de los picos, por lo que se procede al ajuste de la mezcla del disolvente B con acetonitrilo, sustituyéndolo por una mezcla acetonitrilo: agua hasta la obtención de las condiciones óptimas de separación. Los tiempos de retención de los compuestos son los mostrados en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6 Tiempos de retención de los compuestos fenólicos

Compuesto fenólico	Tiempo (min)
4-hidroxibenzoico	12,7
ácido vanílico	20,8
ácido siríngico	28,5
vanilina	30,8
ácido p-cumarico	34,6
siringaldehído	35,4
ácido ferúlico	39,1

De este modo el programa de gradiente final es el siguiente. El disolvente B fue acetonitrilo: agua (80:20) y se emplea un gradiente tras 20 minutos en isocrático como se describe a continuación:

Tiempo(min)	(80:20%) Acetonitrilo:Agua
0	2%
20	2%
40	16%
43	50%
45	2%

Más 3 minutos de post time, para equilibrar el sistema antes de la siguiente inyección. El otro componente de la fase móvil era agua acidificada con ácido fórmico.

Con dichas condiciones se consigue una buena separación, como se observa en la Figura 5.4.



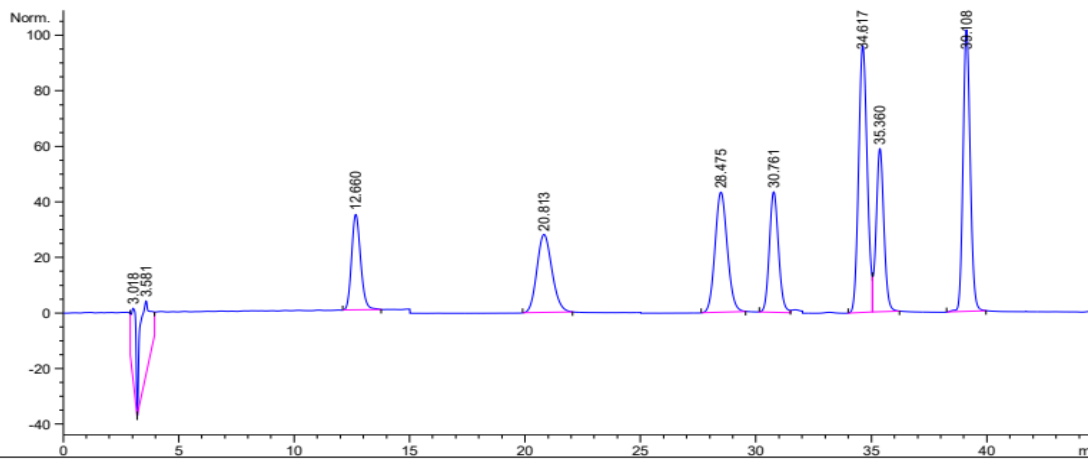


Figura 5.4. Cromatograma de las condiciones óptimas para la separación de los compuestos fenólicos (220 nm).

Con el fin de mejorar la selectividad y la sensibilidad, sería recomendable la realización del análisis a diferentes longitudes de onda como muestra en la Tabla 5.7

Tabla 5.7. Asignación de las longitudes de onda.

Tiempo	λ (nm)
0	235
15	254
25	276
32	320

5.3. Validación del método Folin-Ciocalteu

Se valoró el método de F-C mediante el coeficiente de correlación y la linealidad.

Línea de calibrado de Folin-Ciocalteu

En la Figura 5.5 se muestra la línea de calibración obtenida para el ácido gálico a partir de patrones disueltos en agua con un intervalo de concentraciones entre 0,01 y 0,2 g/L.



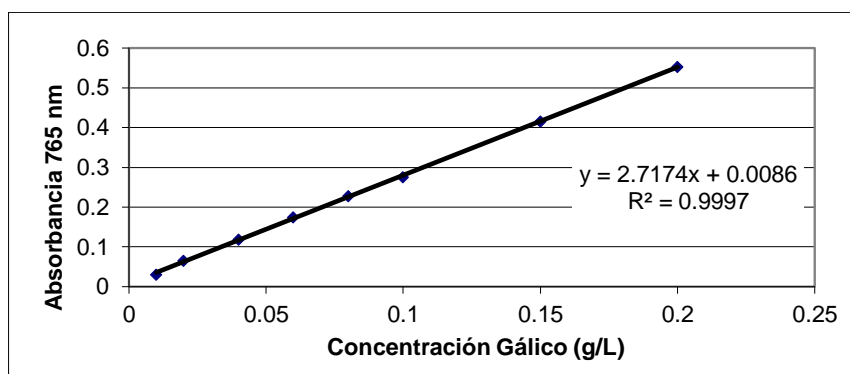


Figura 5.5. Línea de calibrado para el ácido gálico (n=3).

Como se puede observar el **coeficiente de correlación** obtenido es de $R^2 = 0,9997$ ($R \geq 0,99$ valor habitual especificado en protocolos de métodos de validación), por lo que la linealidad del método es buena.

En la Tabla 5.8 se recogen los resultados obtenidos para el ANOVA. Se comprueba que para el analito estudiado el F experimental de la falta de ajuste es menor que el F crítico, con lo que se acepta la hipótesis nula; hay homogeneidad de varianzas, con lo que se acepta como válido el modelo lineal propuesto, con un nivel de confianza del 95%.

Como se observa en la tabla la $F_{exp} (0,39) < F_{crit} (2,74)$ por lo que se puede concluir que el método presenta linealidad.

Linealidad

Tabla 5.8. Análisis de varianza para comprobar la validez del modelo lineal en el calibrado del ácido gálico ($p=0,05$, $n=3$)

FUENTE	g.d.l.	FUENTE SS	SS	RMS	F_{exp}
Regresión	1	SSREG	0,67	0,67	8828
Residual	22	SSRESID	$1,66 \cdot 10^{-3}$	$7,57 \cdot 10^{-5}$	-
Falta de ajuste	6	SSFDA	$2,11 \cdot 10^{-4}$	$3,52 \cdot 10^{-5}$	0,39
Puro error	16	SSPE	$1,45 \cdot 10^{-3}$	$9,08 \cdot 10^{-5}$	-
Total	23	SSTOTAL	0,67	-	-

g.d.l.: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; RMS: medias cuadráticas;

$F_{crit}=2,74$

5.4. Caracterización del residuo sólido de café

Antes de iniciar la extracción para el tratamiento de la muestra, se determina el porcentaje de humedad del residuo de café tras su secado a 60 °C. El porcentaje de humedad del café obtenido es del 0.51% con una incertidumbre de $\pm 0.07\%$.



Tras el tratamiento de la muestra, se procede a la caracterización del residuo, de acuerdo con los procedimientos descritos en el apartado 4.5.1. La composición del RSC se muestra en la Tabla 5.9 (% p/p materia seca).

Tabla 5.9. Composición de RSC.

Análisis	(%p/p) Resultado
Glucosa	17,90 ± 0,09
Xilosa	31,28 ± 0,79
Arabinosa	---
Celulosa	16,27 ± 0,08
Hemicelulosa	27,68 ± 0,70
LAI	38,46 ± 0,71
LAS	0,71 ± 0,06
Lignina total	39,17 ± 0,71
CAI	---
Cenizas totales	0,13 ± 0,04
Grupos acetilo	0,42 ± 0,01
Extractos*	12,43 ± 0,39*
Glucosa en extractos	0,01 ± 0,01
Grasa	9,85 ± 0,16
Nitrógeno	1,51 ± 0,11
Proteínas	9,42 ± 0,67

*Extracto en agua 0,94 ± 0,09, extractos en etanol 11,48 ± 0,33. Los resultados son expresados (n=3); ---: no detectado

Por lo tanto, como se puede observar en la Tabla 5.9 este residuo contiene un alto contenido en proteínas, 9,42%. Este valor se encuentra dentro del rango encontrado para el residuo 6,70-13,70% [71, 72]. En algunas ocasiones, el contenido de proteínas a veces puede ser sobreestimado debido a la presencia de otros compuestos que contienen nitrógeno como la cafeína, ácidos amino y aminos libres [8]. Cabe mencionar que el contenido de proteínas es mayor en RSC que en el café tostado debido a la concentración de nitrógenos no extraídos durante la preparación de la bebida [90].

El contenido de cenizas es 0,13 %, el cuál es más bajo comparado con los valores encontrados en la literatura para esta materia prima (0,19 - 1,60 %) [92]. Esta variación podría estar relacionada con la calidad del suelo donde se encuentra la planta.

Los azúcares están presentes en RSC en diferentes estructuras de cadena polimérica, celulosa (glucosa) y hemicelulosa (arabinosa, galactosa, manosa y xilosa). De esta forma, el contenido de carbohidratos totales (celulosa y hemicelulosa) es del 43,95 %. El contenido de carbohidratos encontrados en la



bibliografía para dicha biomasa son algo superiores de 51,50 % [28]. Estos altos valores en azúcares dan la oportunidad de ser extraídos de RSC y utilizados para la producción de productos fermentados. Vale la pena mencionar que el contenido de arabinosa es nulo en RSC. Sin embargo, un valor de entre 1,7 % ha sido encontrado para esta materia prima por otros autores [25]

Por otro lado, el contenido de lignina es significativo con un valor de 39,17 %. Este valor es algo más alto que los reportados para esta biomasa con valores entre 32,50 – 33,60 % [25]. La lignina es una macromolécula compuesta de una gran variedad de grupos funcionales que incluyen hidroxilos fenólicos, hidroxilos alifáticos, metoxilos, carbonilos y sulfonatos y su estructura varía de una materia prima a otra [24]. Los ácidos clorogénicos, cafeico y cumárico son los componentes más relevantes en la lignina del café y juegan un papel importante en la salud debido a sus propiedades antioxidantes.

El contenido de grasas recogido en la bibliografía para esta materia prima es de entre 10 - 15 % y a veces hasta 20%. En este caso nuestro contenido es algo inferior (9,85 %). Esta cantidad de grasa es considerable teniendo en cuenta que es un residuo que se produce en abundancia y podría extraerse para algunas aplicaciones. Las variaciones de contenido están relacionadas con el método de extracción y variedad de café.

En resumen, si lo comparamos con trabajos previos, el residuo estudiado tiene un contenido de lignina total relativamente más alto, mientras que un contenido de cenizas, carbohidratos, grupos acetilo, proteínas y lípidos algo más bajos de acuerdo con lo reportado por Teresa M. Mataa et al. [25].

5.5. Efecto de la extracción DES asistida por microondas de compuestos fenólicos contenidos en el residuo sólido de café

En la Tabla 5.10 se muestra la variable respuesta del contenido de fenoles totales obtenidos por el método de F-C en las diferentes experimentos llevados a cabo. Para ello se seleccionan las condiciones que proporcionan valores máximos de fenoles. Dichos resultados permitirán establecer el rango óptimo de temperatura (T), tiempo de extracción (t), porcentaje de agua en DES (% agua en DES) y relación molar ChCl:Glic, que son los factores empleados.



Tabla 5.10. Contenido de fenoles totales con Folin.

	<i>T</i> (°C)	<i>t</i> (min)	%Agua en DES	ChCl:Glic	Fenoles totales (mg GAE/g m.p)
1	60	5	70	1,5	0,75
2	120	5	20	0,5	1,82
3	60	5	20	0,5	0,87
4	60	15	70	1,5	1,14
5	60	15	20	1,5	2,70
6	90	10	45	1	3,31
7	90	10	45	0	0,64
8	120	5	70	1,5	0,94
9	120	15	20	0,5	1,63
10	60	5	20	1,5	0,52
11	90	10	45	1	1,71
12	120	5	70	0,5	1,02
13	60	15	70	0,5	0,68
14	120	15	20	1,5	1,52
15	90	10	45	1	0,98
16	90	10	45	1	0,79
17	90	10	45	1	1,59
18	60	5	20	0,5	2,24
19	90	10	45	1	1,56
20	120	15	70	0,5	1,06
21	150	10	45	1	2,01
22	30	10	45	1	0,45
23	120	15	70	1,5	1,36
24	90	0	45	1	1,25
25	90	20	45	1	1,21
26	90	10	45	2	0,98
27	120	5	20	1,5	0,68
28	60	5	70	0,5	1,02
29	90	10	0	1	0,45
30	90	10	95	1	0,60

El contenido de fenoles totales varía entre 0,45 mg GAE/g m.p (experimento 29) y 3,31 mg GAE/g m.p (experimento 6). Alrededor del punto central (90 °C, 10 min, 45% de agua en DES y 1 relación molar ChCl:Glic), se mide un contenido de fenoles totales promedio de 1,66 mg GAE/g m.p.

El contenido de fenoles totales obtenido empleando 25% EtOH (0,62 mgGAE/g m.p) como disolvente convencional es menor (a excepción del experimento 10, 22, 29 y 30), por lo que el empleo de DES parece favorecer la obtención de compuestos fenólicos.



Mediante el programa Statgraphics Cesturion XVII, se ha obtenido una ecuación polinomial de segundo grado (con una $R^2 = 0.9580$), la tabla del ANOVA, el diagrama de Pareto y cuatro superficies de respuesta que muestran la influencia de cada factor.

La Tabla 5.11 nos muestran la variabilidad de los fenoles totales para cada uno de los efectos. En este caso como se puede observar, 6 efectos tienen un p-valor menor que 0,05, indicando que son efectos significativos para un nivel de confianza del 95%. Esto se puede apreciar de forma más visual en la Figura 5.6, siendo la barra de temperatura la que mayor efecto tiene, como ya se comentó anteriormente es el que mayor efecto tiene en la extracción [60].

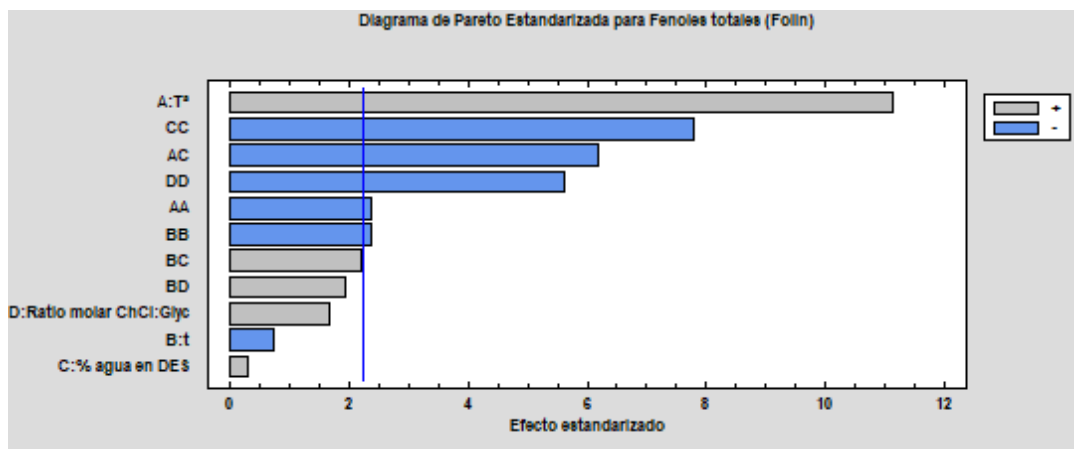


Figura 5.6. Diagrama de Pareto para Fenoles Totales (Folin).



Tabla 5.11. Análisis de Varianza para Fenoles Totales (Folin).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor (Prob > F)	Observaciones
Modelo	4,17	11	0,38	20,76	< 0,0001	Significativo
A-T	2,26	1	2,26	123,46	< 0,0001	
B-t	0,010	1	0,010	0,56	0,4703	
C-% agua en DES	$1,76 \cdot 10^{-3}$	1	$1,76 \cdot 10^{-3}$	0,095	0,7643	
D- Relación molar ChCl:Glic	0,050	1	0,050	2,76	0,1278	
AC	0,70	1	0,70	38,16	0,0001	
BC	0,090	1	0,090	4,95	0,0500	
BD	0,069	1	0,069	3,79	0,0801	
A²	0,10	1	0,10	5,67	0,0385	
B²	0,10	1	0,10	5,67	0,0385	
C²	1,11	1	1,11	60,64	< 0,0001	
D²	0,57	1	0,57	31,38	0,0002	
Residual	0,18	10	0,018			
Falta de ajuste	0,18	9	0,020	45,00	0,1152	No significativo
Error Puro	$4,5 \cdot 10^{-4}$	1	$4,5 \cdot 10^{-4}$			
Cor Total	4,36	21				

A: Temperatura (°C), B: Tiempo (min), C: % agua en DES (%), D- Molar Ratio ChCl:Glic,

R-cuadrada	0,9580	Adj R-cuadrado^a	0,9119	Std. Dev^e	0,14
Media	1,10	Pred R-cuadrado^b	0,8098		
C.V. %^c	12,29	Adec Precisión^d	16,509		

a: Ajuste R2, b: Predicción R2, c: Coeficiente de variación, d: Precisión adecuada, e: Desviación estandar.

En la Eq. 5.1 se aprecian las mismas interacciones significativas que han sido observadas anteriormente. El parámetro que más influye es la temperatura, además afecta positivamente, es decir a mayor temperatura mayor contenido de fenoles totales. Respecto a los otros parámetros influyen de forma menos significativa, sobre todo el porcentaje de agua en DES. Además, cabe mencionar que el factor del tiempo es el único factor que influye de forma negativa.

$$\begin{aligned} \text{Fenoles totales Folin} = & 1,57 + 0,39 \cdot A - 0,025 \cdot B + 9,868 \cdot 10^{-3} \cdot C + \\ & 0,051 \cdot D - 0,29 \cdot AC + 0,096 \cdot BC + 0,079 \cdot BD - 0,078 \cdot A^2 \\ & - 0,078 \cdot B^2 - 0,25 \cdot C^2 - 0,18 \cdot D^2 \end{aligned} \quad \text{Eq. 5.1}$$

A: Temperatura (°C)

B: Tiempo (min)

C: %agua en DES

D: Relación molar ChCl:Glic



Como se ha comentado anteriormente el aumento de la temperatura produce una mejora en la solubilidad, produciendo una mejor penetración en la matriz [60].

Al igual que reportan Ballesteros et al., la temperatura es el efecto más significativo seguido de la relación molar del solvente [57].

En cuanto al % de agua en los DES también produce un efecto positivo para la obtención de compuestos fenólicos, sin embargo, este es muy pequeño. Esto puede ser debido a que los DES son moléculas grandes con enlaces de hidrógeno, por lo que, las interacciones se desestabilizan cuando se agrega agua y lo harán desaparecer si el porcentaje de agua excede el 50% (v/v) [64].

En la Figura 5.7, 5.8 y 5.9 se muestran las superficie respuestas para las interacciones del porcentaje de agua en DES - temperatura, porcentaje de agua en DES - tiempo, y tiempo - Relación molar, respectivamente. Como puede observarse, la interacción porcentaje de agua en DES – temperatura influyó negativamente en la extracción de compuestos fenólicos desde RSC, mientras que las interacciones porcentaje de agua en DES - tiempo, y tiempo - Relación molar influyeron positivamente. Además, la interacción porcentaje de agua en DES – temperatura fue la más importante

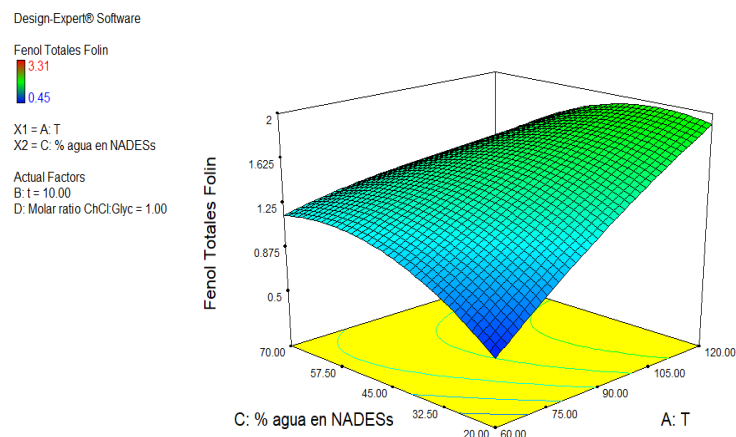


Figura 5.7. Gráfica de superficie que representa la variación de la temperatura en función % de agua en DES.



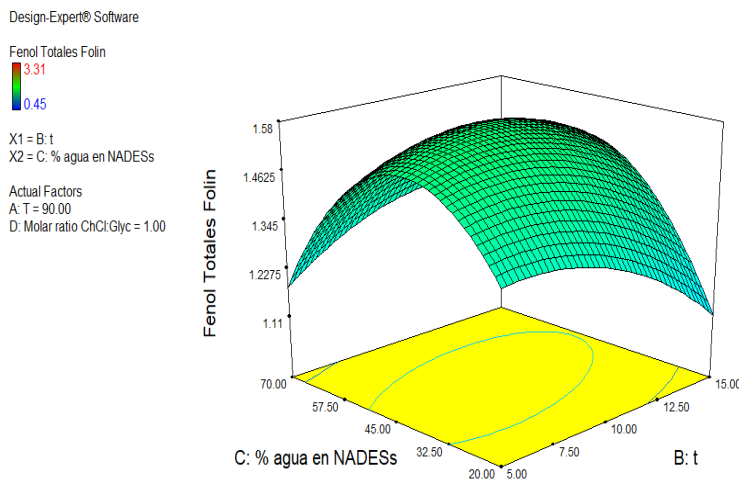


Figura 5.8. Gráfica de superficie que representa la variación del % agua en DES en función del tiempo.

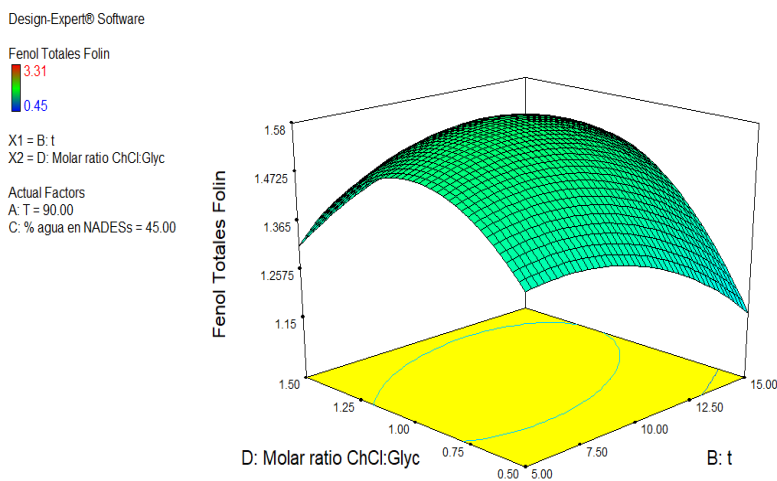


Figura 5.9. Gráfica de superficie que representa la variación del tiempo en función de la relación molar ChCl : Glic.

Por otra parte, con el fin de medir la recuperación de sólidos obtenida en método de extracción DES se evalúan el parámetro **recuperación total gravimétrica (RTG)**. En la Tabla 5.12 se muestran las recuperaciones gravimétricas (RTG) obtenidas en los diferentes experimentos. Como se puede apreciar, las recuperaciones sólidas con los DES son elevadas (superiores al 90%), en comparación con la recuperación del etanol (94%) mucho menor que en las diferentes combinaciones de DES, a excepción del experimento 29 el cual contiene 0% de agua. Las recuperaciones sólidas varían del 90% al 100%.



Tabla 5.12. Recuperaciones sólidas (RTG).

	<i>T (°C)</i>	<i>t (min)</i>	<i>%Agua en DES</i>	<i>ChCl : Glic</i>	<i>RTG (%)</i>
1	60	5	70	1,5	98
2	120	5	20	0,5	97
3	60	5	20	0,5	97
4	60	15	70	1,5	98
5	60	15	20	1,5	98
6	90	10	45	1	99
7	90	10	45	0	98
8	120	5	70	1,5	98
9	120	15	20	0,5	99
10	60	5	20	1,5	98
11	90	10	45	1	99
12	120	5	70	0,5	99
13	60	15	70	0,5	99
14	120	15	20	1,5	97
15	90	10	45	1	100
16	90	10	45	1	100
17	90	10	45	1	98
18	60	5	20	0,5	98
19	90	10	45	1	99
20	120	15	70	0,5	97
21	150	10	45	1	99
22	30	10	45	1	100
23	120	15	70	1,5	98
24	90	0	45	1	100
25	90	20	45	1	98
26	90	10	45	2	100
27	120	5	20	1,5	96
28	60	5	70	0,5	100
29	90	10	0	1	90
30	90	10	95	1	97

La Tabla 5.13 muestra la composición de carbohidratos de las fracciones líquidas de la extracción, los componentes de degradación y el porcentaje de oligómeros.

Respecto a las concentraciones de azúcar tras la extracción varían de 0,04 g/L (experimento 22) hasta 0,30 g/L (experimento 30), teniendo 9 experimentos con concentraciones que no son posibles de detectar (2, 3, 5, 9, 10, 14, 18, 27 y 29). Así, en general, se puede observar en la Tabla 5.13 cómo el contenido de azúcares extraídos es muy bajo en este residuo. Además, aunque un contenido en oligómeros de entre 7 - 66 % fue observado, el contenido de azúcares antes y después de hidrólisis ácida fue bastante similar y muy bajo. Estos contenidos tan bajos en las fracciones líquidas coinciden con lo reportado por Q. A. Nguyen et al.[94].



Tabla 5.13. Composición de carbohidratos y porcentaje de oligómeros.

	Parámetros			Azúcares antes de hidrólisis (g/L)			Productos de degradación (g/L)				Azúcares después hidrólisis (g/L)			Olig (%)	
	T (°C)	t (min)	%Agua en DES	ChCl:Glic	Glucosa	Xilosa	Arabinosa	Fórmico	Acético	HMF	Furfural	Glucosa	Xilosa		Arabinosa
1	60	5	70	1,5	0,03	0,07	---	---	0,03	---	---	0,05	0,14	---	48
2	120	5	20	0,5	---	---	---	---	0,04	---	---	---	---	---	---
3	60	5	20	0,5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4	60	15	70	1,5	0,03	0,07	---	---	0,04	---	---	0,04	0,13	---	41
5	60	15	20	1,5	---	---	---	---	0,03	---	---	---	---	---	---
6	90	10	45	1	0,02	0,05	---	---	0,11	---	---	0,02	0,05	---	5
7	90	10	45	0	0,01	0,02	---	---	0,08	---	---	0,06	0,02	---	66
8	120	5	70	1,5	0,03	0,08	---	---	0,04	---	---	0,04	0,14	---	38
9	120	15	20	0,5	---	---	---	---	0,03	---	---	---	---	---	---
10	60	5	20	1,5	---	---	---	---	0,03	---	---	---	---	---	---
11	90	10	45	1	0,02	0,04	---	---	0,03	---	---	0,03	0,04	---	12
12	120	5	70	0,5	0,03	0,08	---	---	0,04	---	---	0,09	0,16	---	58
13	60	15	70	0,5	0,03	0,06	---	---	0,04	---	---	0,05	0,10	---	37
14	120	15	20	1,5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
15	90	10	45	1	0,01	0,03	---	---	0,04	---	---	0,02	0,03	---	23
16	90	10	45	1	0,01	0,03	---	---	0,03	---	---	0,02	0,03	---	33
17	90	10	45	1	0,01	0,03	---	---	0,03	---	---	0,02	0,03	---	22
18	60	5	20	0,5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
19	90	10	45	1	0,01	0,03	---	---	0,03	---	---	0,02	0,03	---	32
20	120	15	70	0,5	0,03	0,08	---	---	0,36	---	---	0,10	0,17	---	59
21	150	10	45	1	0,01	0,07	---	---	0,24	---	---	0,08	0,11	---	59
22	30	10	45	1	0,01	0,02	---	---	0,30	---	---	0,02	0,02	---	30
23	120	15	70	1,5	0,03	0,08	---	---	0,04	---	---	0,06	0,19	---	55
24	90	0	45	1	0,01	0,03	---	---	0,32	---	---	0,03	0,04	---	33
25	90	20	45	1	0,01	0,03	---	---	0,03	---	---	0,03	0,04	---	37
26	90	10	45	2	0,03	0,07	---	---	0,18	---	---	0,03	0,07	---	7
27	120	5	20	1,5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
28	60	5	70	0,5	0,03	0,06	---	---	0,38	---	---	0,07	0,13	---	55
29	90	10	0	1	---	---	---	---	0,14	---	---	---	---	---	---
30	90	10	95	1	0,04	0,08	---	---	0,04	---	---	0,06	0,24	---	58



En la Tabla 5.14 se muestran las **recuperaciones de glucosa (RG)** y **de azúcares hemicelulósicos (RAH)** (xilosa y arabinosa). Como puede observarse, las recuperaciones de azúcares hemicelulósicos y glucosa fueron muy bajas (inferiores a 0,76 y 0,54 % respectivamente) en todos los ensayos realizados, lo cual es lógico ya que el objetivo de este trabajo era obtener alta recuperación de compuestos fenólicos y no una alta recuperación de azúcares. Las recuperaciones obtenidas con EtOH son de 0,25 % para RG y 0,73 % para RAH.

Así, se podría decir que nuestro método es óptimo para conseguir nuestro objetivo.

Tabla 5.14. Recuperaciones de azúcares hemicelulósicos y glucosa.

	<i>Parámetros</i>				<i>Recuperación azúcares</i>	
	T (°C)	t (min)	%Agua en DES	ChCl:Glic	RG _i (%)	RAH _i (%)
1	60	5	70	1,5	0,29	0,46
2	120	5	20	0,5	0,00	0,00
3	60	5	20	0,5	0,00	0,00
4	60	15	70	1,5	0,22	0,40
5	60	15	20	1,5	0,00	0,00
6	90	10	45	1	0,13	0,16
7	90	10	45	0	0,31	0,07
8	120	5	70	1,5	0,23	0,46
9	120	15	20	0,5	0,00	0,00
10	60	5	20	1,5	0,00	0,00
11	90	10	45	1	0,14	0,14
12	120	5	70	0,5	0,50	0,52
13	60	15	70	0,5	0,26	0,31
14	120	15	20	1,5	0,00	0,00
15	90	10	45	1	0,13	0,09
16	90	10	45	1	0,13	0,10
17	90	10	45	1	0,12	0,09
18	60	5	20	0,5	0,00	0,00
19	90	10	45	1	0,13	0,10
20	120	15	70	0,5	0,54	0,55
21	150	10	45	1	0,47	0,34
22	30	10	45	1	0,09	0,07
23	120	15	70	1,5	0,36	0,59
24	90	0	45	1	0,17	0,11
25	90	20	45	1	0,17	0,12
26	90	10	45	2	0,15	0,23
27	120	5	20	1,5	0,00	0,00
28	60	5	70	0,5	0,40	0,41
29	90	10	0	1	0,00	0,00
30	90	10	95	1	0,35	0,76

Por tanto, observando los resultados obtenidos, se puede concluir que los azúcares quedan mayoritariamente en el extracto sólido, por lo que el RSC extraído mediante DES podría utilizarse en una biorrefinería para la obtención, por ejemplo, de biocombustibles, tal y como reportan Solange I.



Mussatto [20] y Sanjib Kumar Karmee [17]; mientras que un extracto líquido rico en compuestos fenólicos es obtenido.

En cuanto a los compuestos de degradación, son generados como consecuencia de la extracción asistida por microondas. Como se puede observar, no es posible su detección en las extracciones a excepción del ácido acético con un máximo valor de 0,38 g/L (experimento 28) y el ácido fórmico en la extracción con EtOH (0,09 g/L). Merece la pena mencionar que el ácido acético se genera a partir de los grupos acetilo de la fracción de hemicelulosa [93].

5.6. Optimización de la extracción

Para llevar a cabo la optimización es necesario el cálculo de fenoles totales con el método Folin.

Como ya hemos mencionado anteriormente la etapa de extracción asistida con microondas y los DES se ha realizado con el fin de obtener una mayor recuperación de compuestos fenólicos. Por consiguiente, se ha optimizado la extracción maximizando la concentración de ellos.

La optimización de la extracción DES asistida por microondas se realiza maximizando el contenido de compuestos fenólicos totales obtenidos en los extractos líquidos. Así, las condiciones experimentales óptimas encontradas por el modelo son: 120 °C, 7,27 min, 28,78% agua en DES y 1,01 de relación molar ChCl:Glic. Bajo estas condiciones de operación, el modelo predice un contenido de compuestos fenólicos totales en extracto líquido de 1,98 mg GAE/g m.p.

Las condiciones óptimas cumplen las especificaciones expuestas anteriormente sobre los diferentes parámetros, como son una elevada temperatura y un porcentaje de agua y tiempo no elevados. Un tiempo elevado podría provocar un aumento de la viscosidad, lo que hace que la matriz encapsule el analito objetivo [60].

Asimismo, se ha realizado un experimento confirmatorio del punto óptimo obtenido. Dicho experimento se realiza por triplicado para evaluar la precisión (Tabla 5.16), en la cual se puede comprobar, como tanto la desviación estándar como la desviación estándar relativa tienen valores menores al 1% con lo que se puede concluir que es un método preciso. Como se puede ver, el contenido global en fenoles totales obtenidos (Tabla 5.15) es de 1,94 mg GAE/g m.p., siendo por tanto un buen ajuste entre los valores experimentales y predichos.

Bravo et al. [95] lograron un resultado similar (TPC, 1,36 mg GAE/g m.p.) en la extracción de fenólico de Arabica RSC, utilizando éter de petróleo (1:11, p/v) durante 3 horas a 60 °C en un sistema de extracción Soxhlet, seguido de extracción de agua a 90 °C durante 6 min. En este contexto, vale la pena mencionar que, a pesar de que los solventes orgánicos han sido reportados en la literatura como



buenos solventes para la extracción de compuestos bioactivos, debido a su alta toxicidad, sus aplicaciones en los campos de alimentos y farmacéuticos son muy limitadas [57]. Sin embargo, los DES utilizados en este trabajo tienen una toxicidad muy baja, y además los compuestos bioactivos extraídos pueden emplearse en las industrias de alimentos y de la salud [96, 97].

Sin embargo, Yoo et al. [70] informaron de valores más altos para TPC (TPC, 17,0 mg GAE/g m.p) en la extracción de DES asistida por ultrasonido de RSC (a 60 °C, relación molar 7: 1 DES, 32,5 % p/p de agua y 2,6 mL de solvente por 100 mg de RSC), utilizando 1,6-hexanodiol: ChCl como DES, que los logrados en este trabajo. Este hecho puede estar relacionado con la diferente composición de RSC debido a diversos factores, como el método de preparación, las condiciones de cultivo y el tipo de café [28].

Tabla 5.15. Fenoles totales con F-C del punto óptimo tras MAE.

<i>Optimo</i>	<i>T (°C)</i>	<i>t (min)</i>	<i>%Agua en DES</i>	<i>ChCl:Glic</i>	<i>Fenoles totales (mg GAE/g m.p)</i>
1					1,93
2	120	7,27	28,78	1,01	1,94
3					1,94

Tabla 5.16. Precisión del procedimiento de recuperación de fenoles mediante MAE a partir del subproducto de café.

\bar{X}	1,94
s_r	0,01
$\%DER_r$	0,30

En la Tabla 5.17 se muestran las **recuperaciones gravimétricas (RTG)** obtenidas en el experimento sobre el punto óptimo. Como se puede apreciar, las recuperaciones sólidas con los DES son elevadas (superiores al 97%) y de valores semejantes, por lo que conlleva a una baja desviación.

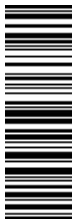
Respecto a las **concentraciones de azúcar** (Tabla 5.17) tras la extracción varían de 0,04 g/L (1 y 2) hasta 0,05 g/L (3). Así, en general, se puede observar como la variación es casi inapreciable. Al igual que sucede con el **contenido en oligómeros** con una variación del 1 %.

También se muestran las **recuperaciones de glucosa (RG)** y **de azúcares hemicelulósicos (RAH)** (xilosa y arabinosa) (Tabla 5.17). Como se puede ver, las recuperaciones de azúcares hemicelulósicos y glucosa fueron muy bajas (inferiores a 0,10 y 0,09 % respectivamente) menores que los mostrados en los experimentos (inferiores a 0,76 y 0,54 % respectivamente), lo que sugiere que el punto óptimo es el indicado para conseguir nuestro objetivo, recuperación de compuestos fenólicos.

En cuanto a los **compuestos de degradación**, no es posible su detección en las extracciones a excepción del ácido acético con un valor de 0,09 g/L para las tres repeticiones.



Al igual que con el diseño experimental, se mide la recuperación del método añadiendo la evaluación de la precisión (Tabla 5.18.). En cuanto a la precisión de los resultados de las recuperaciones, la desviación estándar no es superior al 2%, por lo que se puede decir que los datos tienden a estar agrupados. En cuanto a la desviación estándar relativa varía entre 1 y 14%, por lo que al igual que hemos mencionado antes no existe gran dispersión de datos, se puede concluir que es un método preciso.



Recuperación

Tabla 5.17. Resultados del punto óptimo tras extracción con microondas (n=3).

Óptimo	Parámetros				RTG (%)	Azúcares antes hidrólisis (g/L)			Productos de degradación (g/L)				Azúcares después hidrólisis (g/L)			Olig (%)	Recuperaciones azúcares	
	T (°C)	t (min)	%Agua en DES	ChCl:Glic		Gluc	Xilosa	Arab	Fórmic	Acético	HMF	Furfural	Gluc	Xilosa	Arab		RG(%)	RAH(%)
1					97	$3,45 \cdot 10^{-3}$	0,02	---	---	0,09	---	---	0,02	0,02	---	33	0,09	0,07
2	120	7.27	28.78	1.01	98	$3,00 \cdot 10^{-3}$	0,03	---	---	0,09	---	---	0,02	0,03	---	32	0,10	0,09
3					100	$3,50 \cdot 10^{-3}$	0,03	---	---	0,09	---	---	0,02	0,03	---	32	0,10	0,09

---: no detectado

Precisión

Tabla 5.18. Precisión del procedimiento de recuperación de carbohidratos estructurales mediante MAE a partir del subproducto de café.

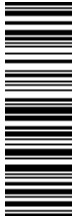
	RTG (%)	Azúcares antes hidrólisis (g/L)			Productos de degradación (g/L)				Azúcares después hidrólisis (g/L)			Olig (%)	Recuperaciones azúcares	
		Gluc	Xilosa	Arab	Fórmic	Acético	HMF	Furfural	Gluc	Xilosa	Arab		RG (%)	RAH (%)
\bar{X}	99,10	$3,32 \cdot 10^{-3}$	0,025	---	---	0,089	---	---	0,017	0,025	---	32,10	---	---
s_r	1,27	$2,75 \cdot 10^{-4}$	0,0034	---	---	0,0033	---	---	0,0015	0,0035	---	0,58	---	---
%DER _r	1,28	8,30	13,57	---	---	3,71	---	---	9,05	13,57	---	1,80	---	---

---: no detectado



El presente documento ha sido firmado en virtud de la Ley 59/2003 de 19 de Diciembre. El C.V.D. asignado es: 0005-A8AC-B22E-0D95*00A5-7F41. Para cotejar el presente con su original electrónico acceda a la Oficina Virtual de la Universidad de Valladolid, y a través del servicio de Verificación de Firma introduzca el presente C.V.D. El documento resultante en su interfaz WEB deberá ser exactamente igual al presente. El/los firmante/s de este documento es/son: MARTA SAGREDO ACITORES a fecha: 2020-06-22 lun 16:13:39 CEST

Memoria



6. Conclusiones

En el presente TFM se ha realizado un estudio experimental a escala laboratorio del proceso de recuperación de compuestos fenólicos a partir del residuo del café sólido mediante la optimización de la etapa de extracción con disolventes eutécticos asistida por microondas. Las principales conclusiones del trabajo, de acuerdo con los objetivos establecidos, se presentan a continuación.

La **caracterización** de este residuo, referida a composición de carbohidratos, lignina, proteína, compuestos fenólicos, grasa, etc., muestra valores muy similares a los reportados en la bibliografía para residuos de características similares. Sin embargo, hay que recordar que el contenido de los compuestos fenólicos en el RSC puede verse afectado por la localización del cultivo, clima, etc... por lo que se debería hacer un estudio más profundo para observar la influencia de ellos.

La **extracción por microondas** es efectiva para la **recuperación de compuestos fenólicos** en el residuo **RSC** usando disolventes con un impacto ambiental menor, como son los **DES**. Los resultados muestran que estos disolventes permiten la extracción selectiva de fenoles y no de azúcares, ya que las concentraciones de éstos últimos son muy bajas en los extractos líquidos de la extracción.

El **diseño experimental** empleado con la variación de los factores de la temperatura, tiempo, porcentaje de agua en DES y la relación molar ChCl:Glic, nos muestra como hay **6 efectos significativos**, siendo la **temperatura** el factor que más influye para la recuperación de compuestos fenólicos, además de observar como el tiempo no afecta al mismo.

Las condiciones óptimas encontradas para la extracción de compuestos fenólicos fueron **120 °C, 7,27 min, 28,78 % agua en DES y 1,01 relación molar ChCl:Glic**. En estas condiciones, la recuperación de compuestos fenólicos contenidos en el RSC fue de **1,98 mg GAE/g m.p.** En comparación con el solvente convencional empleado (25 % EtOH) se consigue un 68% más de recuperación, por lo que el empleo de DES se presenta como un adecuado disolvente alternativo.

Tras la **validación del análisis cromatográfico de carbohidratos** se puede concluir que el método es fiable debido a que permite obtener valores de linealidad superiores al 0,99 %, no presentar falta de ajuste, y tener valores de repetibilidad y sesgo menores a los criterios acordados del 5 y 10% respectivamente.

El RSC mostró gran cantidad de **compuestos fenólicos totales**, que se confirma con el análisis de validación del punto óptimo obteniendo así unos valores de desviación no superiores al 2 %, por lo que podría tener características de **antioxidante natural** y podría ser empleado en alimentación, o en industria como posible sustitutivo de antioxidante sintético.



La **separación de los antioxidantes** ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, vanilina, ácido siríngico, siringaldehído, ácido cumárico y ácido ferúlico, es posible trabajando en fase inversa (35°C) con una fase móvil compuesta de ácido fórmico al 0,1 % y una mezcla acetonitrilo: agua 80:20 (solvente B), con un programa de gradiente de la siguiente manera: 2 % B isocrático (20 min), 2-16 % B (20 min), 16-50 % B (3 min), 50-2 % B (2min).



7. Bibliografía

- [1] M. Ramón-gonçalves, E. Gómez-mejía, N. Rosales-conrado, M. E. León-gonzález, and Y. Madrid, "Extraction , identification and quantification of polyphenols from spent coffee grounds by chromatographic methods and chemometric analyses," *Waste Manag.*, vol. 96, pp. 15–24, 2019, doi: 10.1016/j.wasman.2019.07.009.
- [2] Marcelo-Díaz.R, L-G. V., and R. L., "Fenólicos a partir de residuos de café : Optimización del proceso de extracción Phenolic from residues of coffee : optimization of the process of extraction," *Rev. Investig. Altoandin*, vol. 19, pp. 405–410, 2017, doi: 10.18271/ria.2017.315.
- [3] B. D. Reinoso, "Recuperación de antioxidantes por tecnologías emergentes a partir de efluentes industriales y residuos forestales," Universidad de Vigo, 2015.
- [4] P. Esquivel and V. M. Jiménez, "Functional properties of coffee and coffee by-products ☆," *Food Res. Int.*, vol. 46, no. 2, pp. 488–495, 2012, doi: 10.1016/j.foodres.2011.05.028.
- [5] R. N. M. J. Páscoa, L. M. Magalhães, and J. A. Lopes, "FT-NIR spectroscopy as a tool for valorization of spent coffee grounds : Application to assessment of antioxidant properties," *Food Res. Int.*, vol. 51, no. 2, pp. 579–586, 2013, doi: 10.1016/j.foodres.2013.01.035.
- [6] D. C. MOJICA and M. A. R. MARTÍNEZ, "Evaluación de polifenoles extraídos a partir de residuos de Coffea arabica, para la producción de un coagulante natural," Universidad de américa, 2018.
- [7] A. S. Franca and L. S. Oliveira, "Coffee processing solid wastes: Current uses and future perspectives," *Agric. Wastes*, no. January, pp. 155–190, 2009, doi: 31270-901.
- [8] R. Campos-vega and B. D. Oomah, "Spent coffee grounds : A review on current research and future prospects," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 45, pp. 24–36, 2015, doi: 10.1016/j.tifs.2015.04.012.
- [9] D. M. L. Barrera, "Composición química y nutracéutica del residuo sólido del café (Coffea arabica L) utilizado y la actividad de los productos de su fermentación colónica in vitro en un modelo de inflamación," Universidad autónoma de querétaro, 2014.
- [10] P. Esquivel and V. M. Jiménez, "Functional properties of coffee and coffee by-products ☆," *FRIN*, vol. 46, no. 2, pp. 488–495, 2012, doi: 10.1016/j.foodres.2011.05.028.
- [11] "Crecimiento sostenido en junio de los precios mundiales del café," 2019.
- [12] Kaffe Bueno, "Why Recycled Coffee?" [Online]. Available: <https://www.kaffebueno.com/why-recycled-coffee>. [Accessed: 27-Oct-2019].
- [13] W. J. Yen, B. Sen Wang, L. W. Chang, and P. Der Duh, "Antioxidant properties of roasted coffee residues," *Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 7, pp. 2658–2663, 2005, doi: 10.1021/jf0402429.
- [14] M. A. Silva, S. A. Nebra, M. J. Machado Silva, and C. G. Sanchez, "The use of biomass residues in the Brazilian soluble coffee industry," *Biomass and Bioenergy*, vol. 14, no. 5–6, pp. 457–467,



- 1998, doi: 10.1016/S0961-9534(97)10034-4.
- [15] El Auténtico café, “Datos de consumo de café en el mundo y España |.” [Online]. Available: <https://elautenticocafe.es/datos-de-consumo-de-cafe-en-el-mundo/>. [Accessed: 28-Oct-2019].
- [16] J. E. W. Paz *et al.*, “Alternativas Actuales para el Manejo Sustentable de los Residuos de la Industria del Café en México,” *Rev. Científica la Univ. Autónoma Coahuila Altern.*, vol. 5, no. June, 2015.
- [17] S. K. Karmee, “A spent coffee grounds based biorefinery for the production of biofuels , biopolymers , antioxidants and biocomposites,” *Waste Manag.*, vol. 72, pp. 240–254, 2018, doi: 10.1016/j.wasman.2017.10.042.
- [18] Carmenrosa Monente Ramos, “Spent coffee as a new source of bioaccessible and bioactive compounds with antimutagenic and antimicrobial activity,” Universidad de Navarra, 2015.
- [19] A. Zabaniotou and P. Kamaterou, “Food Waste valorization advocating Circular Bioeconomy -A critical review of potentialities and perspectives of Spent Coffee Grounds Biorefinery,” *J. Clean. Prod.*, 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.11.230.
- [20] S. I. Mussatto, L. M. Carneiro, J. P. A. Silva, I. C. Roberto, and J. A. Teixeira, “A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 83, no. 2, pp. 368–374, 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.07.063.
- [21] L. F. Ballesteros, J. A. Teixeira, and S. I. Mussatto, “Chemical , Functional , and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin,” *Food Bioprocess Technol.*, pp. 3493–3503, 2014, doi: 10.1007/s11947-014-1349-z.
- [22] A. Kovalcik, S. Obruca, and I. Marova, “Food and Bioproducts Processing Valorization of spent coffee grounds : A review,” *Food Bioprod. Process.*, vol. 110, pp. 104–119, 2018, doi: 10.1016/j.fbp.2018.05.002.
- [23] V. Manuel, “Planta de producción de nutracéuticos a partir de residuos agroalimentarios,” Universidad de Granada, 2015.
- [24] D. Stewart, “Lignin as a base material for materials applications : Chemistry , application and economics,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 7, pp. 202–207, 2007, doi: 10.1016/j.indcrop.2007.07.008.
- [25] T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, “Bio-refinery approach for spent coffee grounds valorization,” *Bioresour. Technol.*, vol. 247, no. September 2017, pp. 1077–1084, 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2017.09.106.
- [26] J. BECERRIL ERASO, “Efecto de la temperatura en la clarificación de vinos tintos con proteína de patata,” Universidad pública de Navarra, 2015.
- [27] BioPlat., SusChem., Ministerio de Economía., and I. y Competitividad, “Manual sobre Biorrefinerías en España,” *Minist. Econ. Ind. Y Compet.*, pp. 1–92, 2017.
- [28] J. McNutt and Q. (Sophia) He, “Spent coffee grounds: A review on current utilization,” *J. Ind.*



- Eng. Chem.*, vol. 71, pp. 78–88, 2019, doi: 10.1016/j.jiec.2018.11.054.
- [29] T. Conde and S. I. Mussatto, "Isolation of polyphenols from spent coffee grounds and silverskin by mild hydrothermal pretreatment," *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 46, no. 4, pp. 406–409, 2016, doi: 10.1080/10826068.2015.1084514.
- [30] J. L. Londoño, "Antioxidantes : importancia biológica y métodos para medir su actividad," Universitaria Lasallista, 2010.
- [31] M. J. M. A and D. G. D. M, "Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol," Universidad Autónoma de Querétaro RESUMEN:, 2004.
- [32] C. Huet Breña, "Métodos Analíticos para la Determinación de Antioxidantes en Muestras Biológicas," Universidad Complutense, 2017.
- [33] L. Soto, "Extracción y purificación de compuestos fenólicos a partir de subproductos de destilería de vino," Universidad de Vigo, 2015.
- [34] A. y S. en el M. de H. H. Antioxidantes Portal Antioxidantes Primer Portal de Antioxidantes, "Análisis de antioxidantes: ¿Qué y cómo medir? |." [Online]. Available: <http://www.portalantioxidantes.com/analisis-de-antioxidantes/>. [Accessed: 27-Oct-2019].
- [35] J. Zavaleta, A. M. Muñoz, and B. L. Teresa Blanco, Carlos Alvarado-Ortiz, "Antioxidant capacity and main phenolic acids and flavonoids of some foods.," *Red Rev. Científicas América Lat. el Caribe, España y Port.*, vol. 5, no. 2, 2005.
- [36] J. P. Jiménez, "methodology for the evaluation of antioxidant functional ingredients.," Universidad autonoma de Madrid, 2009.
- [37] A. y S. en el M. de H. H. Antioxidantes Portal Antioxidantes Primer Portal de Antioxidantes, "Antioxidantes en alimentos: principales fuentes y sus contenidos." [Online]. Available: <http://www.portalantioxidantes.com/antioxidantes-en-alimentos/# principales fuentes>. [Accessed: 27-Oct-2019].
- [38] V. V. Bell, P. Codo, L. Gonz, and P. Mu, "Biodisponibilidad de los flavonoides de la cerveza . Efecto antioxidante 'in vivo,'" Universidad de Burgos, 2005.
- [39] R. C. Borrelli, F. Esposito, A. Napolitano, A. Ritieni, and V. Fogliano, "Characterization of a New Potential Functional Ingredient: Coffee Silverskin," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 5, pp. 1338–1343, 2004, doi: 10.1021/jf034974x.
- [40] A. K. Tiwari, "Imbalance in antioxidant defence and human diseases : Multiple approach of natural antioxidants therapy," *Curr. Sci.*, vol. 81, no. 9, p. 10, 2016.
- [41] E. Valencia, I. Ignacio, E. Aviles, M. Bartolomé, H. Martínez, and M. García, "Polyphenols: antioxidant and toxicological properties," *Rev. la Fac. Ciencias Químicas Cuenca*, vol. 16, pp. 15–29, 2017, doi: 1390-1869.
- [42] B. Cammerer and L. W. Kroh, "Antioxidant activity of coffee brews," *Eur Food Res Technol*, pp. 469–474, 2006, doi: 10.1007/s00217-005-0226-4.



- [43] M. Henrique *et al.*, "Influencia do processamento e da torrefacao sobre a actividade antioxidante do café," vol. 30, no. 3, pp. 604–610, 2007.
- [44] A. Farah and C. M. Donangelo, "Phenolic compounds in coffee," *Brazilian J. Plant Physiol.*, no. 18, 2014, doi: 10.1590/S1677-04202006000100003.
- [45] E. C. Chaves-Ulate and P. Esquivel-Rodríguez, "Ácidos Clorogénicos Presentes En El Café: Capacidad Antimicrobiana Y Antioxidante," *Agron. Mesoam.*, vol. 30, no. 1, pp. 299–311, 2019, doi: 10.15517/am.v30i1.32974.
- [46] C. D. Stalikas, "Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids," *J. Sep. Sci.*, vol. 30, no. 18, pp. 3268–3295, 2007, doi: 10.1002/jssc.200700261.
- [47] P. V. Pontes, R. F. A. Moreira, L. C. Trugo, and C. A. B. De Maria, "The content of chlorogenic acids in tropical fruits," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 82, no. 10, pp. 1177–1181, 2002, doi: 10.1002/jsfa.1163.
- [48] A. Panusa, A. Zuurro, R. Lavecchia, G. Marrosu, and R. Petrucci, "Recovery of natural antioxidants from spent coffee grounds," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 17, pp. 4162–4168, 2013, doi: 10.1021/jf4005719.
- [49] K.Y. Oseguera-Castro, O. P. García-Obregón, G. Loarca-Piña, S. O. Mendoza-Díaz, and R. Campos-Vega, "Impacto de la fibra dietaria antioxidante de café (*Coffea arabica* L .) usado sobre la actividad locomotora circadiana de adultos sanos . RESUMEN : ABSTRACT ;," *Investig. y Desarro. en Cienc. y Tecnol. Aliment.*, vol. 3, pp. 285–295, 2018.
- [50] J. Kim *et al.*, "Caffeinated coffee, decaffeinated coffee, and the phenolic phytochemical chlorogenic acid up-regulate NQO1 expression and prevent H₂O₂-induced apoptosis in primary cortical neurons," *Neurochem. Int.*, vol. 60, no. 5, pp. 466–474, 2012, doi: 10.1016/j.neuint.2012.02.004.
- [51] A. R. Cho, K. W. Park, K. M. Kim, S. Y. Kim, and J. Han, "Influence of roasting conditions on the antioxidant characteristics of colombian coffee (*Coffea Arabica* L.) beans," *J. Food Biochem.*, vol. 38, no. 3, pp. 271–280, 2014, doi: 10.1111/jfbc.12045.
- [52] O. Auroma, "Antioxidantes y alimentos," Universidad de La Rioja, 2013.
- [53] C. Ao, T. Higa, T. D. Khanh, A. Upadhyay, and S. Tawata, "Antioxidant phenolic compounds from *Smilax sebeana* Miq.," *Food Sci. Technol.*, vol. 44, no. 7, pp. 1681–1686, 2011, doi: 10.1016/j.lwt.2011.02.001.
- [54] S. I. Mussatto, L. F. Ballesteros, S. Martins, and J. A. Teixeira, "Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 83, no. 1, pp. 173–179, 2011, doi: 10.1016/j.seppur.2011.09.036.
- [55] D. M. Cuesta-parra and F. C. Mahecha, "Extraction phenols from green coffee grains," *Ion*, vol. 31, no. 1, pp. 31–35, 2018, doi: 10.18273/revion.v31n1-2018005.
- [56] S. Arranz Martínez, "Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española," Universidad complutense de Madrid, 2010.



- [57] L. F. Ballesteros, M. J. Ramirez, C. E. Orrego, J. A. Teixeira, and S. I. Mussatto, "Optimization of autohydrolysis conditions to extract antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds," *J. Food Eng.*, vol. 199, pp. 1–8, 2017, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2016.11.014.
- [58] K. Robards, "Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables," *J. Chromatogr. A*, vol. 1000, no. 1–2, pp. 657–691, 2003, doi: 10.1016/S0021-9673(03)00058-X.
- [59] B. Ahangari and J. Sargolzaei, "Extraction of lipids from spent coffee grounds using organic solvents and supercritical carbon dioxide," *J. Food Process. Preserv.*, vol. 37, no. 5, pp. 1014–1021, 2013, doi: 10.1111/j.1745-4549.2012.00757.x.
- [60] C. Sparr Eskilsson and E. Björklund, "Analytical-scale microwave-assisted extraction," *J. Chromatogr. A*, vol. 902, no. 1, pp. 227–250, 2000, doi: 10.1016/S0021-9673(00)00921-3.
- [61] S. Lee, C. Hahn, M. Rhee, J. E. Oh, and J. Song, "Compressed fluids," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, no. 9, pp. 1689–1699, 2012, doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- [62] N. Medina-Torres, T. Ayora-Talavera, H. Espinosa-Andrews, A. Sánchez-Contreras, and N. Pacheco, "Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources," *Agronomy*, vol. 7, no. 3, 2017, doi: 10.3390/agronomy7030047.
- [63] B. Abad-García, L. A. Berrueta, D. M. López-Márquez, I. Crespo-Ferrer, B. Gallo, and F. Vicente, "Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices," *J. Chromatogr. A*, vol. 1154, no. 1–2, pp. 87–96, 2007, doi: 10.1016/j.chroma.2007.03.023.
- [64] E. Yuniarti, F. C. Saputri, and A. Mun'im, "Application of the natural deep eutectic solvent choline chloridesorbitol to extract chlorogenic acid and caffeine from green coffee beans (*Coffea canephora*)," *J. Appl. Pharm. Sci.*, vol. 9, no. 3, pp. 82–90, 2019, doi: 10.7324/JAPS.2019.90312.
- [65] W. Bi, M. Tian, and K. H. Row, "Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization," *J. Chromatogr. A*, vol. 1285, pp. 22–30, 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2013.02.041.
- [66] M. Ruesgas-Ramón, M. C. Figueroa-Espinoza, and E. Durand, "Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 65, no. 18, pp. 3591–3601, 2017, doi: 10.1021/acs.jafc.7b01054.
- [67] D. Skarpalezos and A. Detsi, "Deep eutectic solvents as extraction media for valuable flavonoids from natural sources," *Appl. Sci.*, vol. 9, no. 19, 2019, doi: 10.3390/app9194169.
- [68] A. Procentese, F. Raganati, G. Olivieri, M. E. Russo, L. Rehmann, and A. Marzocchella, "Deep Eutectic Solvents pretreatment of agro-industrial food waste," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 11, no. 1, pp. 1–12, 2018, doi: 10.1186/s13068-018-1034-y.
- [69] M. Ranic, M. Nikolic, M. Pavlovic, A. Buntic, S. Siler-Marinkovic, and S. Dimitrijevic-Brankovic, "Optimization of microwave-assisted extraction of natural antioxidants from spent espresso



- coffee grounds by response surface methodology," *J. Clean. Prod.*, vol. 80, pp. 69–79, 2014, doi: 10.1016/j.jclepro.2014.05.060.
- [70] D. E. Yoo, K. M. Jeong, S. Y. Han, E. M. Kim, Y. Jin, and J. Lee, "Deep eutectic solvent-based valorization of spent coffee grounds," *Food Chem.*, vol. 255, pp. 357–364, 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.02.096.
- [71] M. S. Mariotti-Celis, M. Martínez-Cifuentes, N. Huamán-Castilla, M. Vargas-González, F. Pedreschi, and J. R. Pérez-Correa, "The antioxidant and safety properties of spent coffee ground extracts impacted by the combined hot pressurized liquid extraction–resin purification process," *Molecules*, vol. 23, no. 1, pp. 1–11, 2018, doi: 10.3390/molecules23010021.
- [72] Y. F. Shang, J. L. Xu, W. J. Lee, and B. H. Um, "Antioxidative polyphenolics obtained from spent coffee grounds by pressurized liquid extraction," *South African J. Bot.*, vol. 109, pp. 75–80, 2017, doi: 10.1016/j.sajb.2016.12.011.
- [73] N. A. Al-Dhabi, K. Ponmurugan, and P. Maran Jeganathan, "Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 34, pp. 206–213, 2017, doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.05.005.
- [74] M. A. Ramirez-Coronel, N. Marnet, V. S. K. Kolli, S. Roussos, S. Guyot, and C. Augur, "Characterization and Estimation of Proanthocyanidins and Other Phenolics in Coffee Pulp (*Coffea arabica*) by Thiolysis-High-Performance Liquid Chromatography," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 5, pp. 1344–1349, 2004, doi: 10.1021/jf035208t.
- [75] L. G. Ranilla, M. I. Genovese, and F. M. Lajolo, "Polyphenols and antioxidant capacity of seed coat and cotyledon from Brazilian and Peruvian bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 1, pp. 90–98, 2007, doi: 10.1021/jf062785j.
- [76] A. Berthod, B. Billardello, and S. Geoffroy, "Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation," *Analisis*, vol. 27, no. 9, pp. 750–757, 1999, doi: 10.1051/analisis:1999140.
- [77] J. Dai and R. J. Mumper, "Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties," *Molecules*, vol. 15, no. 10, pp. 7313–7352, 2010, doi: 10.3390/molecules15107313.
- [78] M. Naczk and F. Shahidi, "Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 41, no. 5, pp. 1523–1542, 2006, doi: 10.1016/j.jpba.2006.04.002.
- [79] L. M. Libbey and J. P. Walradt, "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent," *METHODS Enzymol.*, vol. 3, no. 6, p. 561, 1968, doi: 10.1007/BF02530903.
- [80] F. Herrera, "Obtención de antioxidantes a partir del epicarpio de café (*Coffea arabica* L.) empleando fluidos presurizados , una alternativa de aprovechamiento para este residuo agroindustrial," Universidad Libre, 2016.



- [81] A. Taamalli, D. Arráez-Román, E. Ibañez, M. Zarrouk, A. Segura-Carretero, and A. Fernández-Gutiérrez, "Optimization of microwave-assisted extraction for the characterization of olive leaf phenolic compounds by using HPLC-ESI-TOF-MS/IT-MS2," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 3, pp. 791–798, 2012, doi: 10.1021/jf204233u.
- [82] K. De La Torre-Carbot, O. Jauregui, E. Gimeno, A. I. Castellote, R. M. Lamuela-Raventós, and M. C. López-Sabater, "Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 11, pp. 4331–4340, 2005, doi: 10.1021/jf0501948.
- [83] S. Fajardo, García-Galvan, F. R., V. Barranco, J. C. Galvan, and S. F. Batlle, "Extraction Techniques of Phenolic Compounds from Plants," *Intech*, vol. i, no. tourism, p. 13, 2016, doi: <http://dx.doi.org/10.5772/57353>.
- [84] M. Pettinato, A. A. Casazza, P. F. Ferrari, D. Palombo, and P. Perego, "Eco-sustainable recovery of antioxidants from spent coffee grounds by microwave-assisted extraction: Process optimization, kinetic modeling and biological validation," *Food Bioprod. Process.*, vol. 114, pp. 31–42, 2019, doi: 10.1016/j.fbp.2018.11.004.
- [85] V. Lopez-Avila and J. Benedicto, "Microwave-assisted extraction combined with gas chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay," *Trends Anal. Chem.*, vol. 15, no. 8, pp. 334–341, 1996, doi: 10.1016/0165-9936(96)00038-6.
- [86] F. I. Onuska and K. A. Terry, "Extraction of pesticides from sediments using a microwave technique," *Chromatographia*, vol. 36, no. 1, pp. 191–194, 1993, doi: 10.1007/BF02263861.
- [87] M. P. Llompарт, R. A. Lorenzo, R. Cela, and J. R. J. Paré, "Optimization of a microwave-assisted extraction method for phenol and methylphenol isomers in Soil samples using a central composite design," *Analyst*, vol. 122, no. 2, pp. 133–137, 1997, doi: 10.1039/a605447a.
- [88] A. Sluiter, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, and D. Templeton, "Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 7/17/2005," 2008.
- [89] A. I. Paniagua-García, M. Hijosa-Valsero, J. Garita-Cambronero, M. Coca, and R. Díez-Antolínez, "Development and validation of a HPLC-DAD method for simultaneous determination of main potential ABE fermentation inhibitors identified in agro-food waste hydrolysates," *Microchem. J.*, vol. 150, no. August, 2019, doi: 10.1016/j.microc.2019.104147.
- [90] J. P. Silva *et al.*, "Physicochemical Characterization of Spent Coffee Ground (Coffea Arabica L) and its Antioxidant Evaluation Antioxidant Evaluation," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 16, pp. 220–225, 2018, doi: 10.19026/ajfst.16.5958.
- [91] N. Martinez-Saez *et al.*, "Use of spent coffee grounds as food ingredient in bakery products," *Food Chem.*, vol. 216, pp. 114–122, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.173.
- [92] D. Pujol *et al.*, "The chemical composition of exhausted coffee waste," *Ind. Crops Prod.*, vol. 50, pp. 423–429, 2013, doi: 10.1016/j.indcrop.2013.07.056.
- [93] D. Kim, "Physico-chemical conversion of lignocellulose: Inhibitor effects and detoxification strategies: A mini review," *Molecules*, vol. 23, no. 2, 2018, doi: 10.3390/molecules23020309.



- [94] Q. A. Nguyen, E. J. Cho, D. S. Lee, and H. J. Bae, "Development of an advanced integrative process to create valuable biosugars including manno-oligosaccharides and mannose from spent coffee grounds," *Bioresour. Technol.*, vol. 272, no. August 2018, pp. 209–216, 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2018.10.018.
- [95] J. Bravo *et al.*, "Evaluation Of Spent Coffee Obtained From The Most Common Coffeemakers As A Source Of Hydrophilic Bioactive Compounds AUTHORS:," *Agric. Food Chem.*, vol. 60, pp. 12565–12573, 2012.
- [96] Y. Chen and T. Mu, "Application of deep eutectic solvents in biomass pretreatment and conversion," *Green Energy Environ.*, vol. 4, no. 2, pp. 95–115, 2019, doi: 10.1016/j.gee.2019.01.012.
- [97] J. B. Barbieri, C. Goltz, F. B. Cavalheiro, A. T. Toci, L. Igarashi-Mafra, and M. R. Mafra, "Deep eutectic solvents applied in the extraction and stabilization of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.," *Ind. Crop. Prod.*, vol. 144, 2020.

