



Universitat de Lleida

Obtención de productos de interés industrial a partir de residuos agroalimentarios mediante procesos quimioenzimáticos

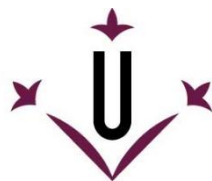
Johanna Aguilera Oviedo

<http://hdl.handle.net/10803/687600>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida

TESIS DOCTORAL

OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE INTERÉS INDUSTRIAL A PARTIR DE RESIDUOS AGROALIMENTARIOS MEDIANTE PROCESOS QUIMIOENZIMÁTICOS

Johanna Aguilera Oviedo

Memoria presentada para optar al título de Doctor por la Universitat de Lleida
Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología Agraria y Alimentaria

Director:

Mercè Balcells

Codirector:

Edinson Yara Varón

“Quiero compartir con ustedes el secreto que me ha llevado a alcanzar todas mis metas: mi fuerza reside únicamente en mi tenacidad”– Louis Pasteur

...Y mi tenacidad nace de ustedes Nubia Stella Oviedo Álvarez, Cristian Julian Aguilera Oviedo y Lucila Álvarez... esto es Por Y Para Ustedes, los amo con toda mi alma. -JAO

“El nitrógeno presente en nuestro ADN, el calcio de nuestros dientes, el hierro de nuestra sangre, el carbono en las tartas de manzana... todos fueron creados en el interior de estrellas que chocaron entre sí. Estamos hechos del material de las estrellas”. -Carl Sagan

Y como tal debemos brillar en la vida que nos ha tocado... Una vida solo para valientes -JAO

Agradecimientos

Culminar esta etapa de mi vida trae implícito un largo camino recorrido que no hubiera sido posible sin apoyo. Primero quiero agradecer a Dios, a la vida y al universo por brindarme las fuerzas suficientes para lograr este sueño que tuve desde muy joven: “ser doctora”, una doctora de verdad.

Quiero agradecer a la Universidad de Lleida (UdL) por ser la institución que me ha acogido para realizar este postgrado. Así mismo debo agradecer por el financiamiento aportado, a el proyecto Interreg POCTEFA (EFA253/16 BIOPLAST) y el programa de ayudas a estudiantes de doctorado "Programa Jade Plus UdL" del Banco Santander. Al Campus Iberus, Erasmus mundus y a Inocure s.r.o. por la oportunidad de estancia en Praga cuyas enseñanzas han sido infinitas.

De igual manera mi más sincero agradecimiento al Director de Departamento de Química, el Dr. Ramon Canela Garayoa por su apoyo, guía y su valioso tiempo. A mi Directora de tesis, la Dra. Mercè Balcells por la confianza que depositó en mi para el desarrollo de este trabajo y por sus orientaciones e indicaciones que han sido determinantes culminar esta etapa. A mi Codirector, el Dr. Edinson Yara Varón por sus enseñanzas, su paciencia, tiempo y guía, mil gracias por estar ahí. También he de agradecer a los evaluadores externos de esta tesis y a los distinguidos miembros del tribunal de defensa, los doctores Antoni Rius, Alexis Marxol y John Jairo Méndez Arteaga. Quiero agradecer a mis compañeros del Departamento de Química (Profesores, técnicos de laboratorio, etc.) como Berta Singla, Gemma Villorbina, Mireia Oromi, Montserrat Llovera, Carme, Dolors, Silvia, Bego, Clara y todos los demás que no alcanzo a nombrar por que no me alcanzaría el papel. Del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos quiero agradecer a Mercè Torres y especialmente a los técnicos Jordi Vidal y a Montserrat Prim por su enorme disposición y su ayuda, siempre con la mejor actitud. A los colegas doctorandos y posdoctorandos de otros departamentos y a profesores de otras áreas y lugares como Teresa, que de una u otra manera aportaron a mejorar mi trabajo y a mis vivencias durante este camino. Por su apoyo técnico, personal y humano, quiero dar un especialmente agradecimiento a mis compañeros de química orgánica, al Dr. Enrique Cequier, a Albert Tomàs, a mis paisanos Edinson, Wilmar, Erika y Nancy, con quienes compartí dudas, proyectos, ilusiones, desilusiones, consejos y cafés durante estos años, pesé a que hoy estemos un poco distantes, les recuerdo con cariño y gratitud. A los que estuvieron de pasada por el laboratorio como Roser y a los que he conocido al final del camino como Lucía y Oriol, quienes también le han aportado valor a mi paso por la UdL. A todos quienes me han brindado su buena vibra, bondad y su luz solo puedo darles las gracias. Pero también quiero agradecer a quienes pusieron a prueba mi paciencia y resistencia, gracias por los enojos y estrés, dentro y fuera del laboratorio, todo eso me ha llevado a donde estoy hoy, así que solo me queda agradecer.

Mi corazón esta lleno de gratitud por mi familia, quienes me vieron partir un día de mi amada Ibagué, con un saco lleno de sueños y quienes conmigo han soportado el peso enorme de la distancia. Les agradezco, porque a pesar de ese sacrificio siempre han estado ahí para apoyarme en los buenos, malos, regulares, mejor dicho, en todos los momentos. A mi madre Nubia Stella Oviedo, le agradezco la templanza que me enseñó con su ejemplo, su fortaleza y su amor incondicional, nuestras charlas que son el mejor vínculo. A mi hermano Cristian Julián Aguilera Oviedo, le agradezco el ser y estar, siempre hemos sido los dos incondicionales para nosotros (pesé a cualquier cosa), le agradezco todo el amor y sobre todo el estar allá, por darme esa tranquilidad de saber que mi madre esta en las mejores manos. A mi abuela Lucila Álvarez, por

su amor y cada una de sus oraciones por mí, porque sé que sin eso no estaría donde estoy. También agradezco a mis tías, tíos y sus familias, a Argenis, Lucila, Miriam y Lázaro por su soporte para mi mamá y por estar ahí. A mi tío Kilmer y su familia, por siempre estar pendiente de mí con sus mensajes, pero, sobre todo, por su ejemplo de fortaleza que para mí siempre ha resultado inspirador. A mi papá Alirio Aguilera Sierra, quien a su manera también ha estado ahí apoyándome desde la distancia. A mis primas y primos, a Amadeo, a mi familia política, al resto de mi enorme familia de primer, segundo grado, etc., con los que, pese a no comunicarnos tanto, estuvieron ahí con sus mensajes especiales de cumpleaños, navidades y demás fechas, para sentirme más en familia, pese a la distancia y darme esa fuerza necesaria para seguir por el sueño. Quiero agradecer infinitamente por el apoyo en la última etapa, que ha sido dura, una de las más por los cambios e incertidumbre, el escribir... En este espacio, debo agradecer a Luis, quien a pesar de los altibajos siempre ha estado ahí, siendo mi familia junto con Mafo, aportándome y soportándome, dándome ese puntito que me faltaba para seguir cuando faltaba, gracias por ser y estar, juntos es mejor. A todos ustedes Gracias, los llevo en mi corazón siempre.

Mis agradecimientos no estarían completos sin recordar a mis amigos, esos amigos que son familia los que están aquí, allá (en mi patria querida) o en cualquier lugar del mundo. Mil gracias a Angela, Margarita, Yira y María Claudia, con quienes siempre he contado, así no hablemos a diario, siempre hemos estado para compartir nuestras felicidades y tristezas, su apoyo me ha soportado en momentos en que lo necesitaba. A Jhoncito y Jorgito, gracias por su amistad, por sus palabras, ustedes saben lo mucho que valieron nuestras video reuniones. A Edna, Cova, Andrea, Arturo, Yazmín, Gian, Gilber y en general todos esos amigos, que no nos olvidamos y se reportaban con un saludo, broma o hasta meme. Sin duda alguna, debo agradecer a la gente que se ha convertido en mi familia aquí, puesto que esas pocas y valiosas personas han hecho más fácil este camino en un país ajeno que también he querido hacer mío. A Nancy por la amistad que hemos cultivado y su evolución, porque creo que nos ha servido y hemos crecido como personas. A Lucía por los ratos de “chisme” y los “viernes!”, definitivamente han sido un desahogo y a Kevin por las deliciosas comidas de los fines de semana. A Eunice por las noches de esparcimiento post depresión doctoral. Finalmente, debo agradecer a esas personas que me han apoyado aquí en esta ciudad mágica, mi hermosa Granada, mil gracias.

Hoy es hora de cerrar un capítulo importante en la historia de mi vida y a todos ustedes debo agradecerles su apoyo, aliento y constancia, los cuales han sido tan necesarios en los momentos difíciles de este proyecto. Sin ustedes esto no sería posible, así que gracias totales.

INDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIACIONES | 11 |
| RESUMEN | 14 |
| ABSTRACT | 16 |
| RESUM..... | 18 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 20 |
| 1.1. BIOECONOMÍA Y ECONOMÍA CIRCULAR | 20 |
| 1.2. OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE (ODS) | 22 |
| 1.3. IMPORTANCIA DE LOS PROCESOS BIOCATALÍTICOS | 24 |
| 1.4. NUEVAS TECNOLOGÍAS INFORMATICAS APLICADAS A LA INVESTIGACIÓN | 25 |
| 1.5. RESIDUOS Y SUBPRODUCTOS | 26 |
| 1.5.1. Definiciones y generalidades. | 26 |
| 1.5.2. Residuos de origen vegetal y subproductos | 28 |
| 1.5.3. Subproductos y residuos de origen animal | 33 |
| 1.5.4. Usos industriales de subproductos agroalimentarios y perspectivas | 37 |
| 1.6. SOLVENTES | 42 |
| 1.6.1. Solventes orgánicos..... | 42 |
| 1.6.2. Solventes Eutécticos (DES's)..... | 47 |
| 1.6.3. Aplicaciones de los DES's..... | 56 |
| 2. OBJETIVOS..... | 60 |
| 2.1. OBJETIVO GENERAL | 60 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 60 |
| 3. APROVECHAMIENTO DEL HÍGADO DE RAPE | 61 |
| 3.1. ANTECEDENTES..... | 61 |
| 3.2. MATERIALES..... | 62 |
| 3.2.1. Reactivos | 62 |
| 3.2.2. Equipos..... | 63 |
| 3.3. MÉTODOS..... | 63 |
| 3.3.1. Estudio Teórico de solubilidad con programa COSMO-RS | 63 |
| 3.3.2. Extracción de aceite de hígado de rape (AHR) | 65 |
| 3.3.3. Preparación de los biocatalizadores | 67 |
| 3.3.4. Esterificación por biocatálisis del aceite de hígado de rape (AHR)..... | 68 |
| 3.3.5. Resonancia magnética nuclear (RMN)..... | 71 |
| 3.3.6. Cromatografía en capa fina (CCF)..... | 71 |
| 3.3.7. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas CG-MS y Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)..... | 71 |

| | | |
|-------------|--|-----|
| 3.4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 72 |
| 3.4.1. | Extracción y caracterización del aceite de hígado de rape (AHR)..... | 72 |
| 3.4.2. | Simulación teórica de extracción mediante el programa COSMO-RS | 76 |
| 3.4.3. | Extracción de aceite de hígado de rape utilizando el mezclador-agitador rotatorio (RM) o el Ultra-Turrax®(UT). | 79 |
| 3.4.4. | Producción de biocatalizadores | 84 |
| 3.4.5. | Síntesis de ésteres etílicos de AHR mediante biocatálisis. | 85 |
| 3.5. | CONCLUSIONES | 94 |
| 4. | SÍNTESIS DE NUEVOS PRODUCTOS: ESPECIES ACEPTORAS DE HIDRÓGENO (HBA's) Y SOLVENTES EUTÉCTICOS (DES's) | 96 |
| 4.1. | ANTECEDENTES..... | 96 |
| 4.2. | MATERIALES..... | 96 |
| 4.2.1. | Reactivos..... | 96 |
| 4.2.2. | Equipos..... | 97 |
| 4.3. | MÉTODOS..... | 97 |
| 4.3.1. | Síntesis Disal 1: Cloruro de 1,3 (bis)trietilamonio-2-propanol..... | 97 |
| 4.3.2. | Síntesis Disal 2: Cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol..... | 98 |
| 4.3.3. | Caracterización de Disales..... | 98 |
| 4.3.3.1. | Resonancia Magnética nuclear (RMN)..... | 98 |
| 4.3.3.2. | Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). | 99 |
| 4.3.3.3. | Punto de fusión (pf)..... | 99 |
| 4.3.4. | Escalado de la producción de las disales..... | 99 |
| 4.3.5. | Síntesis de solventes eutécticos (DES's) y escalado. | 100 |
| 4.4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 101 |
| 4.4.1. | Síntesis y caracterización de especiesceptoras de hidrógeno (HBA). | 101 |
| 4.4.2. | Síntesis de DES..... | 118 |
| 4.4.2.1. | DES a partir de disal 1..... | 119 |
| 4.5. | CONCLUSIONES | 127 |
| 5. | CARACTERIZACIÓN DE LOS SOLVENTES EUTÉCTICOS (DES's) | 128 |
| 5.1. | ANTECEDENTES | 128 |
| 5.2. | MATERIALES | 128 |
| 5.2.1. | Reactivos..... | 128 |
| 5.2.2. | Equipos..... | 128 |
| 5.3. | MÉTODOS..... | 129 |
| 5.3.1. | Resonancia Magnética Nuclear (RMN) | 129 |
| 5.3.2. | Punto de fusión (pf)..... | 129 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 5.3.3. | Capacidad de absorción de agua (CAA) | 129 |
| 5.3.4. | Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). | 129 |
| 5.3.5. | Densidad (δ) | 129 |
| 5.3.6. | pH | 130 |
| 5.3.7. | Viscosidad cinemática (μ) | 130 |
| 5.3.8. | Conductividad (σ) | 130 |
| 5.3.9. | Determinación de actividad antimicrobiana de los compuestos. | 130 |
| 5.4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 134 |
| 5.4.1. | Propiedades de los DES's | 134 |
| 5.4.2. | Punto de fusión | 135 |
| 5.4.3. | Densidad (δ) | 136 |
| 5.4.4. | pH | 137 |
| 5.4.5. | Viscosidad (μ) | 137 |
| 5.4.6. | Conductividad (σ) | 139 |
| 5.4.7. | Capacidad de Absorción de Agua (CCA) | 140 |
| 5.4.8. | FT-IR | 142 |
| 5.4.9. | RMN | 149 |
| 5.4.10. | Actividad antimicrobiana | 151 |
| 5.5. | CONCLUSIONES | 154 |
| 6. | FRACCIONAMIENTO DE BIOMASA LIGNOCELULOSICA (BML) CON NUEVOS DES's | 156 |
| 6.1. | ANTECEDENTES | 156 |
| 6.2. | MATERIALES | 157 |
| 6.2.1. | Reactivos | 157 |
| 6.2.2. | Equipos | 157 |
| 6.3. | MÉTODOS | 157 |
| 6.3.1. | Resonancia Magnética Nuclear (RMN) | 157 |
| 6.3.2. | Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). | 158 |
| 6.3.3. | Método computacional COSMO-RS | 158 |
| 6.3.4. | Fraccionamiento de BML | 159 |
| 6.4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 162 |
| 6.4.1. | Predicción de la solubilidad con el programa COMOS-RS | 162 |
| 6.4.2. | Ensayos experimentales de fraccionamiento con los DES's seleccionados. | 166 |
| 6.5. | CONCLUSIONES | 181 |
| 7. | DISCUSIÓN GENERAL | 182 |

| | |
|---|-----|
| 8. CONCLUSIONES GENERALES | 188 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 191 |
| ANEXOS | 218 |

ABREVIACIONES

| Termino | Abreviatura |
|---|-------------------|
| Objetivos de Desarrollo Sostenible | ODS |
| Organización de las Naciones Unidas | ONU |
| <i>Conductor-like Screening Model for Real Solvents</i> | COSMO-RS |
| Biomasa Lignocelulósica | BML |
| Grado de polimerización | GP |
| Celulosa microcristalina | CM |
| Celulosa nano cristalina | CN |
| Encefalopatía Espongiforme bovina | EEB |
| Proteínas Animales Transformadas | PAT |
| Ácidos grasos | AG |
| Ácidos grasos saturados | AGS |
| Ácidos grasos libres | AGL |
| Ácidos grasos monoinsaturados | AGMI |
| Ácidos grasos poliinsaturados | AGPI |
| Ácido α -linolénico | ALA |
| Ácido eicosapentaenoico | EPA |
| Ácido docosahexaenoico | DHA |
| Enfermedades cardiovasculares | ECV |
| Trastorno del espectro autista | TEA |
| Dimetil sulfóxido | DMSO |
| Dimetil carbonato | DMC |
| Cloroformo | CCl ₃ |
| Cloroformo deuterado | CDCl ₃ |
| Ciclopentilmetil eter | CPME |
| 2-Metiltetrahidrofurano | 2-MeTHF |
| compuestos orgánicos volátiles | COV's |
| "GlaxoSmithKline" | GKS |
| <i>Deep eutectic solvents</i> | DES |
| <i>Ionic Liquids</i> | IL |
| Dióxido de carbono supercrítico | scCO ₂ |
| <i>Gas-Expanded Liquid</i> | GXL |
| Punto supercrítico | PSC |
| Temperatura crítica | Tc |
| Presión crítica | Pc |
| Cloruro de colina | ChCl |
| <i>Natural Deep Eutectic Solvent</i> | NADES |
| <i>Amino Acid DES</i> | ADDES |
| <i>Therapeutic DES</i> | THEDES |
| <i>Hydrogen Bond Aceptor</i> | HBA |
| <i>Hydrogen Bond Donnor</i> | HBD |
| Centipoises | cP |
| Siemens por centímetro | S/cm |
| Aceite de hígado de rape | AHR |
| Cloruro de 1,3 (bis)trietilamonio-2-propanol | Disal 1 |

| | |
|--|---------------------------------|
| Cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol | Disal 2 |
| Método Folch | MF |
| Reactivo Folch | RF |
| Limoneno | LMN |
| Sulfato de sodio anhidro | Na ₂ SO ₄ |
| Hidrógeno fosfato de potasio | K ₂ HPO ₄ |
| Sulfato de magnesio | MgSO ₄ |
| Agar patata dextrosa | PDA |
| Extracto de levadura | EY |
| Colección Española de Cultivos Tipo | CECT |
| <i>Rhizopus oryzae</i> | <i>R. oryzae</i> |
| <i>Aspergillus flavus</i> | <i>A. flavus</i> |
| Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas "Gas Chromatography-Mass Spectrometry" | GC-MS |
| Cromatografía de gases con detector de ionización de llama "Gas Chromatography- Flame Ionization Detector" | CG-FID, |
| Ésteres metílicos de ácidos grasos "Fatty Acid Metil" | FAMES |
| Éster etílico | EE |
| Éster etílico del ácido oleico | EE-AO |
| Éster etílico del ácido docosahexaenoico | EE-DHA |
| Cromatográfica en capa fina | CCF |
| Resonancia Magnética Nuclear | RMN |
| Éster etílico de aceite de hígado de rape | EE-AHR |
| Material hidrolizado de hígado de rape | MHHR |
| Diacilglicerido | DAG |
| Monoacilglicerido | MAG |
| Triacilglicerol | TAG |
| Ácido graso | AG |
| Mezclador-agitador rotatorio | RM |
| Ultra-Turrax® | UT |
| Actividad enzimática | U |
| Desarrollos Biotecnológicos Agroalimentarios | DBA |
| Politetrafluoroetileno | PTFE |
| Solución de trietilamina etanólica | E-Et ₃ N |
| Solución de trimetilamina etanólica | E-TMA |
| Capacidad de absorción de agua | CAA |
| Reflectancia total atenuada | ATR |
| Metanol deuterado | MeOD |
| Dimetil sufoxido | d-DMSO |
| Agua deuterada | D ₂ O |
| Punto de fusión | pf |
| Vibración | υ |
| Vibraciones de flexión | υf |
| Vibraciones de estiramiento | υe |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>S. aureus</i> |
| <i>Lysteria monocytogenes</i> | <i>L. monocytogenes</i> |
| <i>Bacillus cereus</i> | <i>B. cereus</i> |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>E. coli</i> |

| | |
|----------------------------------|----------------------|
| <i>Proteus mirabilis</i> | <i>P. mirabilis</i> |
| <i>Salmonella entérica</i> | <i>S. enterica</i> |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| <i>Aspergillus niger</i> | <i>A. niger</i> |
| Concentración Inhibitoria Mínima | CIM |
| Ácido láctico | AL |
| Glicerol | Gli |
| Dietilenglicol | Die |
| Urea | Ur |
| Etilenglicol | Eti |
| Ácido oxálico | AO |

RESUMEN

El aprovechamiento de los residuos agroalimentarios es un tema que cada vez toma más importancia por parte de muchos investigadores debido a su aplicación en la economía circular; donde lo que se busca es generar la mínima cantidad de residuos posible y al mismo tiempo producir un valor añadido de subproductos con potencial uso industrial. En este contexto, el proyecto de investigación que se presenta titulado: “Obtención de productos de interés industrial a partir de residuos agroalimentarios mediante procesos quimioenzimáticos” se enmarca en el campo de esta actividad científica. La exposición de la Memoria se ha organizado en siete secciones, donde el primer capítulo es introductorio, en el segundo se describen los objetivos, en los cuatro siguientes se desarrolla el cuerpo de la investigación y en el último capítulo se exponen las conclusiones generales.

La metodología y resultados se describe a partir del tercer apartado. En el capítulo 3 (Aprovechamiento del hígado de rape) se detallan las actividades, donde se extrajo hasta 100 % de aceite del hígado del rape (AHR), ensayando cuatro solventes verdes y uno de referencia. Se realizó una modelización teórica con el programa COSMO-RS (herramienta utilizada para predecir las probabilidades de solubilidad entre solutos y solventes). Con el aceite de hígado de rape (AHR) se sintetizaron ésteres etílicos usando como biocatalizadores *resting cells* (propios) y una enzima comercial. El efecto de variables como número etapas de esterificación, tiempo de reacción y tipo de biocatalizador, fueron analizadas en el perfil de los ésteres sintetizados.

En el capítulo 4 (Síntesis de nuevos productos como especies aceptoras de hidrógeno (HBA's) y solventes eutécticos (DES's)) se describen los procesos de síntesis química. A partir de un derivado del glicerol se han sintetizado dos compuestos: Cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol (Disal 1) y Cloruro de 1,3 (bis)triethylamonio-2-propanol (Disal 2), con porcentajes de rendimiento del 83 y 100 % respectivamente. Las nuevas Disales consideradas como HBA's, han sido estandarizadas, escaladas y caracterizadas con resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia infrarroja (FT-IR), determinación de capacidad de absorción de agua y punto de fusión. Estos nuevos HBA's han sido usados en la síntesis de nuevos DES's y se han obtenido 22 nuevos solventes, cuyas condiciones de síntesis también fueron escaladas.

En el quinto Capítulo (Caracterización de los DES's) se describen los ensayos realizados para medir las propiedades físico-químicas de los nuevos 22 DES's. Se les determino, analizó y discutió su punto de fusión, densidad, pH, viscosidad, conductividad, capacidad de absorción de agua (CAA) y la actividad antimicrobiana de sus compuestos precursores. También se han caracterizado los DES's con las técnicas de RMN y FT-IR identificando algunos de los

desplazamientos en las señales causados por los enlaces de hidrógeno característicos de la formación de los DES's.

En el sexto y último capítulo metodológico (Fraccionamiento de biomasa lignocelulósica (BML) con nuevos DES's), partiendo de una modelización teórica (usando el programa COSMO-RS) y los DES's sintetizados, se han seleccionado los DES's que tenían mayor probabilidad de extracción para celulosa y lignina. Con los DES's seleccionados se han tratado diferentes residuos de cultivo, obteniéndose dos fracciones: una rica en celulosa (F1) y la otra en lignina (F2). Posteriormente, se han determinado los porcentajes de rendimiento de extracción para evaluar la concordancia con las predicciones de la modelización teórica. Los extractos obtenidos se han analizado mediante FT-IR para verificar la composición de acuerdo a las señales características. Los resultados arrojan que solo uno de los DES's ensayados aporta resultados acordes a la referencia (en porcentaje de rendimiento y composición), los demás no son muy efectivos en el fraccionamiento de los residuos tratados.

La memoria finaliza con la presentación de una discusión general (apartado 7) y las conclusiones generales del estudio. A través de los distintos ítems presentados y valorados, se muestra la potencialidad de los residuos de agroalimentarios, la importancia del desarrollo de técnicas sostenibles y la búsqueda de procesos novedosos enmarcados dentro de la química verde y la economía circular.

ABSTRACT

The use of agri-food waste is a topic that is becoming increasingly important for many researchers due to its application in the circular economy; where the aim is to generate the minimum amount of waste possible and at the same time produce added value from by-products with potential industrial use. In this context, the research project presented here entitled: "Obtaining products of industrial interest from agri-food waste by means of chemoenzymatic processes" is part of this scientific activity. The report is organised in seven sections, where the first chapter is introductory, the second describes the objectives, the next four describe the body of the research and the last chapter presents the general conclusions.

The methodology and results are described in the third section. Chapter 3 (Monkfish liver utilisation) details the activities, where up to 100 % oil was extracted from monkfish liver (AHR), testing four green solvents and one reference solvent. Theoretical modelling was performed with the COSMO-RS programme (a tool used to predict solubility probabilities between solutes and solvents). With monkfish liver oil (AHR), ethyl esters were synthesised using resting cells and a commercial enzyme as biocatalysts. The effect of variables such as number of esterification steps, reaction time and type of biocatalyst were analysed on the profile of the synthesised esters.

In chapter 4 (Synthesis of new products as hydrogen acceptor species (HBA's) and eutectic solvents (DES's)) the chemical synthesis processes are described. Two compounds have been synthesised from a glycerol derivative: 1,3-(bis)trimethylammonium-2-propanol chloride (Disal 1) and 1,3-(bis)triethylammonium-2-propanol chloride (Disal 2), with yield percentages of 83 and 100 % respectively. The new Disals considered as HBAs have been standardised, scaled up and characterised with nuclear magnetic resonance (NMR), infrared spectroscopy (FT-IR), determination of water absorption capacity and melting point. These new HBA's have been used in the synthesis of new eutectic solvents (DES's) and 22 new solvents have been obtained, whose synthesis conditions were also scaled up.

In the fifth chapter (Characterisation of the DES's), the tests carried out to measure the physicochemical properties of the 22 new DES's are described. Their melting point, density, pH, viscosity, conductivity, water absorption capacity (WAC) and the antimicrobial activity of their precursor compounds were determined, analysed and discussed. The DESs have also been

characterised with NMR and FT-IR techniques, identifying some of the signal shifts caused by the hydrogen bonds characteristic of DES formation.

In the sixth and last methodological chapter (Fractionation of lignocellulosic biomass (BML) with new DES's), starting from a theoretical modelling (using the COSMO-RS program) and the synthesised DES's, the DES's with the highest extraction probability for cellulose and lignin have been selected. With the selected DES's, different crop residues were treated, obtaining two fractions: one rich in cellulose (F1) and the other in lignin (F2). Subsequently, the extraction yield percentages were determined to evaluate the agreement with the predictions of the theoretical modelling. The extracts obtained were analysed by FT-IR to verify the composition according to the characteristic signals. The results show that only one of the DES's tested gives results in accordance with the reference (in percentage yield and composition), the others are not very effective in the fractionation of the treated waste.

The report ends with the presentation of a general discussion (section 7) and the general conclusions of the study. Through the different items presented and assessed, it shows the potential of agri-food waste, the importance of developing sustainable techniques and the search for novel processes within the framework of green chemistry and the circular economy.

RESUM

L'aprofitament dels residus agroalimentaris és un tema que cada cop pren més importància per part de molts investigadors a causa de la seva aplicació a l'economia circular; on el que es cerca és generar la mínima quantitat de residus possible i alhora produir un valor afegit de subproductes amb potencial ús industrial. En aquest context, el projecte de recerca que es presenta titulat: Obtenció de productes d'interès industrial a partir de residus agroalimentaris mitjançant processos quimioenzimàtics s'emmarca en el camp d'aquesta activitat científica. L'exposició de la Memòria s'ha organitzat en set seccions, on el primer capítol és introductori, al segon es descriuen els objectius, als quatre següents es desenvolupa el cos de la investigació i al darrer capítol s'exposen les conclusions generals.

La metodologia i els resultats es descriu a partir del tercer apartat. Al capítol 3 (Aprofitament del fetge de rap) es detallen les activitats, on es va extreure fins a 100 % d'oli del fetge del rap (AHR), assajant quatre solvents verds i un de referència. Es va realitzar una modelització teòrica amb el programa COSMO-RS (eina utilitzada per predir les probabilitats de solubilitat entre soluts i solvents). Amb l'oli de fetge de rap (AHR) es van sintetitzar èsters etílics usant com a biocatalitzadors resting cells (propis) i un enzim comercial. L'efecte de variables com a nombre etapes d'esterificació, temps de reacció i tipus de biocatalitzador, van ser analitzades al perfil dels èsters sintetitzats.

Al capítol 4 (Síntesi de nous productes com a espècies acceptores d'hidrogen (HBA's) i solvents eutèctics (DES's)) es descriuen els processos de síntesi química. A partir d'un derivat del glicerol s'han sintetitzat dos compostos: Clorur de 1,3(bis)trimetilamoni-2-propanol (Disal 1) i Clorur de 1,3 (bis)triethylamoni-2-propanol (Disal 2), amb percentatges de rendiment del 83 i 100% respectivament. Les noves Disales considerades com a HBA's han estat estandarditzades, escalades i caracteritzades amb ressonància magnètica nuclear (RMN), espectroscòpia infraroja (FT-IR), determinació de capacitat d'absorció d'aigua i punt de fusió. Aquests nous HBA's han estat usats en la síntesi de nous solvents eutèctics (DES's) i s'han obtingut 22 nous solvents, les condicions de síntesi dels quals també van ser escalades.

Al cinquè Capítol (Caracterització dels DES's) es descriuen els assaigs realitzats per mesurar les propietats fisicoquímiques dels nous 22 DES's. Se'ls va determinar, analitzar i discutir el punt de fusió, densitat, pH, viscositat, conductivitat, capacitat d'absorció d'aigua (CAA) i l'activitat antimicrobiana dels seus compostos precursors. També s'han caracteritzat els DES's amb les tècniques de RMN i FT-IR identificant alguns dels desplaçaments als senyals causats pels enllaços d'hidrogen característics de la formació dels DES's.

Al sisè i darrer capítol metodològic (Fraccionament de biomassa lignocel·lulòsica (BML) amb nous DES's), partint d'una modelització teòrica (usant el programa COSMO-RS) i els DES's sintetitzats, s'han seleccionat els DES's que tenien més probabilitat d'extracció per a cel·lulosa i lignina. Amb els DES seleccionats s'han tractat diferents residus de cultiu, obtenint-se dues fraccions: una rica en cel·lulosa (F1) i l'altra en lignina (F2). Posteriorment, s'han determinat els percentatges de rendiment d'extracció per avaluar-ne la concordança amb les prediccions de la modelització teòrica. Els extractes obtinguts s'han analitzat mitjançant FT-IR per verificar la

composició d'acord als senyals característiques. Els resultats mostren que només un dels DES's assajats aporta resultats acords a la referència (en percentatge de rendiment i composició), els altres no són gaire efectius en el fraccionament dels residus tractats.

La memòria finalitza amb la presentació d'una discussió general (apartat 7) i les conclusions generals de l'estudi. A través dels diferents ítems presentats i valorats, es mostra la potencialitat dels residus d'agroalimentaris, la importància del desenvolupament de tècniques sostenibles i la cerca de processos nous emmarcats dins la química verda i l'economia circular.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BIOECONOMÍA Y ECONOMÍA CIRCULAR

En los últimos años se ha incrementado el interés por la conservación de los recursos naturales y la protección del medioambiente. En consecuencia, se ha visto un aumento en los procesos de reciclado y ahorro en general en los procesos productivos. Es posible que este cambio provenga del momento que vivimos en el planeta, donde la explotación de nuestros limitados recursos naturales pone freno a nuestra demanda. El incremento de la productividad suele estar relacionado de manera directa con la explotación de los recursos naturales (renovables y no renovables), esto puede amenazar la sostenibilidad de la vida de los ecosistemas naturales, y en consecuencia de la población humana (1). Desde hace algunos años la tasa de uso de solventes en relación con la extracción, ha aumentado en un 50 % más que hace 30 años, los datos históricos y las proyecciones indican que entre 1980 y 2040 podríamos llegar a un aumento de la explotación de los recursos naturales del 233 % (2,3). Como hasta ahora no tenemos otra tierra donde vivir y la exploración espacial que busca planetas con características donde se pueda albergar vida apenas está iniciando, solo nos queda hacer lo posible por cuidar, mantener y “reparar” en la medida de lo posible el medioambiente. Hace algunos años los gobiernos y líderes mundiales se propusieron aunar esfuerzos para mejorar nuestra gestión de los recursos naturales, sin perjudicar la calidad de vida, antes de que el problema sea completamente irreversible, un límite que según los expertos tenemos muy cerca (3,4). En función de esto, cada día se destinan más recursos para la investigación científica, con el fin de encontrar alternativas para mejorar los procesos productivos, extractivos, etc.; los cuales son imprescindibles para solventar las necesidades del mundo desarrollado (salud, comunicaciones, educación, tecnología, movilidad, etc.). Lo que se busca es que no se impacte negativamente el medioambiente, que no se afecte el desarrollo económico-social y que tengamos ciclos productivos sostenibles.

Desde hace algún tiempo escuchamos con mayor regularidad los términos economía circular y bioeconomía, estos están relacionados con las estrategias y esfuerzos que se encaminan a mejorar la administración de nuestros recursos naturales y no llegar a un punto que nos lleve a la extinción. Según la definición de la Comunidad Europea, la bioeconomía abarca todos los sectores y sistemas que dependen de recursos biológicos (plantas, animales, microorganismos y biomasa derivada de procesos productivos incluidos los residuos orgánicos). También incluye sus funciones, principios, y los productos y servicios relacionados, de manera que incluye e

interrelaciona los ecosistemas y los servicios que prestan todos los sectores de producción. Incluyendo así todo sector que utiliza y/o produce recursos biológicos para producir alimentos, piensos, productos biológicos, energía y servicios (2). El término bioeconomía es relativamente nuevo pero lo bastante grande como para abarcar la economía circular que hace ya varios años se viene mencionando. La economía circular es un modelo de producción y consumo que implica compartir, alquilar, reutilizar, reparar, renovar y reciclar materiales y productos existentes todas las veces que sea posible para crear un valor añadido (5). El modelo lineal de los sistemas productivos (tomar, producir y tirar), requiere una amplia, barata y accesible disposición de materiales y energía para desarrollar procesos productivos. Además, de un eficiente mecanismo para deshacerse de los residuos producidos. La poca sostenibilidad en el tiempo que poseía este modelo, dio paso a la apropiación de términos como el reciclaje y reuso, los cuales hacen parte del desarrollo sostenible y que finalmente constituyeron el modelo de economía circular (6). Los ciclos biológicos del planeta tienen un diseño perfecto, las plantas por ejemplo nacen de una semilla, se reproducen y mueren, incluso en la última parte de su ciclo genera materia orgánica que se usará de manera que todos los elementos cumplen una función y sirven para crear o regenerar vida por sí solos (3). La naturaleza tiene un eficiente sistema circular, el problema se genera cuando nosotros los seres humanos alteramos ese equilibrio. El ser humano con sus avances tecnológicos y desarrollo industrial, produce cantidades de residuos (basura), que no tenemos la capacidad de almacenar, reusar o hacer desaparecer. Muchas de las habitantes del planeta nunca se han preguntado a dónde irá toda la basura que producimos. Ahora somos más de 7800 millones de personas que consumimos bienes y servicios y producimos residuos (7). El aumento de nuestras necesidades por el aumento de la población hace necesario que el desarrollo continúe, pero este debe ser un desarrollo sostenible con la vida del planeta.

El término desarrollo sostenible tomó mayor importancia después del acuerdo de París en 2015 (8) pero ya era mencionado desde 1987. En este año el informe de Brundtland para las Naciones Unidas, titulado "Nuestro futuro común", definió el desarrollo sostenible como la satisfacción de las necesidades de la generación presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades (9). En ese tiempo muchos estudiosos del tema, notaban como la rapidez con la que devorábamos recursos no correspondía al ritmo de renovación de éstos y auguraban problemas futuros (como los que vivimos ahora). El desarrollo tecnológico nos ha facilitado la vida tal y como la conocemos, pero también ha hecho que desequilibremos de manera escandalosa los ciclos y recursos naturales de nuestro planeta. El ejemplo más claro lo tenemos con la revolución tecnológica, mientras que un árbol con su ciclo de vida genera materia orgánica (reusable de distintas maneras) y vida durante largo tiempo,

los aparatos electrónicos tienen una vida útil de entre 3 y 5 años y requieren grandes volúmenes de materiales y explotación de recursos naturales para ser producidos. Cuando éstos terminan su vida útil, muchas veces por la ya conocida obsolescencia programada, generan solo basura y muchos de sus componentes no se reutilizan y terminan siendo graves contaminantes (3). Además, el término de desarrollo sostenible y su búsqueda no solo implica condiciones ambientales, sino que se ve reflejado en el progreso social sin distinción de condición geográfica o física, el equilibrio medioambiental donde utilicemos recursos al ritmo de su renovación y el crecimiento económico que garantiza los medios para lograr un bienestar total.

Todos los sectores productivos deben estar en constante desarrollo o al menos en la búsqueda de innovaciones en los procesos que les permitan una gestión integral, entendida como mayor productividad, aumento de ganancias y menor impacto ambiental. Sea en el sector primario como se le denomina al sector agropecuario o en el secundario o también llamado industrial (tanto extractivo como de transformación), es indiscutible que la química tiene gran importancia(10). En la búsqueda de sostenibilidad, esta rama de las ciencias se ha empoderado de su papel con el desarrollo de la química sostenible y la química verde (más conocida como “Green chemistry” en inglés). Ambos términos, pese a no significar exactamente lo mismo, tienen el mismo fin que es contribuir al desarrollo y bienestar del planeta, sin afectar a la naturaleza ni a las generaciones futuras (11). El área de la agroindustria (sector secundario de transformación) también tiene gran importancia. Es uno de los sectores que nunca detiene su producción (la industria alimentaria es considerada como esencial). Esto lo pudimos evidenciar en la pandemia, que puso en jaque a gran parte de las industrias y a la actividad económica en general, pero el sector alimentario siempre estuvo en producción para suplir las necesidades de los consumidores. Como los procesos productivos incluyen la generación de residuos, la producción de los alimentos también genera gran cantidad de residuos. En este sentido, el objetivo de gran parte de la investigación actual en la industria alimentaria, es producir menor cantidad de residuos, reducir sus componentes contaminantes, y/o mejorar el aprovechamiento de éstos, para disminuir el impacto económico y ambiental (12).

1.2. OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE (ODS)

Los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) son una serie de retos definidos para la mejora de la calidad de vida de todas las personas, buscando un desarrollo y bienestar más igualitario. Hacen parte de las estrategias diseñadas para lograr el “desarrollo sostenible a nivel global” y para su

alcanzarlos es necesaria la acción conjunta de gobiernos, sector privado, sociedad civil y de todos los ciudadanos (13). Esta iniciativa fue creada por la Organización de las Naciones Unidas (ONU), entidad nacida en 1945 y con 193 países miembros en la actualidad, que es la encargada de velar por el cumplimiento de los propósitos firmados y pactados por las naciones en la carta de la ONU (14). Para poder cumplir con estos propósitos ha generado propuestas de desarrollo sostenible en sus reuniones en las que los distintos países se han comprometido a realizar acciones individuales en pro del bien colectivo. En la reunión de 2015 se aprobó la Agenda 2030 sobre el Desarrollo Sostenible, donde se presenta una oportunidad para que los países y sus sociedades emprendan un nuevo camino con el que mejorar la vida de todos (4). En esta reunión se plantearon los 17 ODS que abarcan temas para enfrentar los desafíos ambientales, políticos y económicos del mundo (Figura 1.1). Dentro de los objetivos con los que cuenta esta iniciativa se encuentran el fin de la pobreza, la seguridad alimentaria, salud, equidad, saneamiento y además acciones específicas hacia mejoras de la producción y el combate al cambio climático.



Figura 1.1. Los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible de la ONU.

Dentro de esta larga lista de objetivos el desarrollo de esta tesis, tiene aplicación en la mejora de continua de procesos direccionada por los ODS 12 y 13. Estos junto con los demás ODS constituyen una luz en el camino de protección de nuestro planeta tierra la supervivencia de todas las especies (nosotros incluidos) en un sano equilibrio.

El medioambiente juega un papel fundamental en la preservación de los seres humanos y el desarrollo de las sociedades con equidad y calidad de vida para todos. Esto ha sido manifestado también en el acuerdo de París en 2015, con el que busca un compromiso de los países miembros por incrementar sus esfuerzos hacia la lucha contra el cambio climático (8,15,16). Pese a los compromisos adquiridos por los gobiernos, está claro que los esfuerzos realizados para cumplir la agenda del desarrollo sostenible son insuficientes, los recursos naturales se siguen usando de manera insostenible y no se han logrado las mejoras en cuanto a calidad de vida de la población mundial. Esto se evidencia en los informes de los ODS de 2018 y 2020 que con datos anteriores a la pandemia del Covid-19, ya reflejaban la lejanía en cifras con respecto a las propuestas en la agenda 2030 (17,18). En cuanto a las acciones para detener el cambio climático, aún no se ha alcanzado el 7,6 % anual de reducción de los gases de efecto invernadero requerido para limitar el calentamiento global a 1,5 °C anuales. Además de esto, con la llegada de la pandemia, la crisis sanitaria, económica y social ha puesto en jaque todas las estrategias tendientes al logro de estos 17 ODS, pero dada la situación sin precedentes vivida se priorizó los objetivos que interactuaban de manera directa con la amenaza de mortalidad por la nueva enfermedad y los medios de subsistencia de las personas (19).

La gran mayoría de estos esfuerzos se centran en el desarrollo de una economía circular, el incentivo de la investigación juega un papel primordial para la búsqueda de energías limpias, que provengan de recursos renovables y el reemplazo de materiales y procesos que continúen afectando la estabilidad de nuestro vulnerable medioambiente.

1.3. IMPORTANCIA DE LOS PROCESOS BIOCATALÍTICOS

En la gran mayoría de los procesos industriales se presentan diferentes tipos de reacciones químicas. Se denomina catálisis al mecanismo por el cual ciertas reacciones químicas son provocadas, o aceleradas por unas sustancias llamadas catalizadores. Estas sustancias no cambian durante la reacción ni química o físicamente (20,21). Los catalizadores pueden ser gases, líquidos o sólidos (22). Su clasificación depende del criterio usado (estructura, composición, ámbito de aplicación o la común: estado de agregación). La clasificación más común, según el estado de agregación implica cómo reacciona el catalizador en el sistema de

reacción. Según esta clasificación hay dos tipos de catalizadores principalmente: heterogéneos (aquellos que se mantienen en estado sólido en el sistema) y homogéneos (aquellos que pueden ser líquidos o gaseosos y permanecen en mezcla íntima con los componentes de la reacción, actuando por su masa, su acción aumenta con su concentración) (20,22). También hay formas intermedias como los catalizadores homogéneos adheridos a sólidos (catalizadores soportados) y los biocatalizadores que son enzimas y pueden clasificarse entre los catalizadores homogéneos moleculares y los catalizadores heterogéneos macroscópicos (22).

Hoy en día las enzimas que se usan como biocatalizadores son cada vez más importantes. Debido a sus ventajas como la solubilidad en agua, alta actividad enzimática y selectividad, funcionamiento en condiciones suaves (bajas presiones, temperaturas, pH cercanos a 7, etc.), los procesos y tecnologías biocatalíticas están penetrando cada vez más en todas las ramas de las industrias de procesos químicos (22). En la economía circular los procesos biocatalíticos son importantes por que ayudan a que la producción de diversos materiales sea más rápida, fácil y eficiente y reducen los residuos generados durante los procesos de fabricación (21–23). Pese a los biocatalizadores pueden tener algunas desventajas como la baja estabilidad, el hecho de que incrementen el desarrollo de procesos sostenibles y la química verde les ha merecido la importancia actual (22).

1.4. NUEVAS TECNOLOGÍAS INFORMÁTICAS APLICADAS A LA INVESTIGACIÓN

En la búsqueda de procesos sostenibles, limpios y eficientes la aplicación de las nuevas tecnologías informáticas son una gran herramienta que permite acelerar los procesos investigativos y reducir sus costes por experimentación. Con los avances computacionales se han podido desarrollar programas capaces de incorporar y procesar una gran cantidad de datos de distintas áreas del conocimiento como la física y la química. No solo los avances computacionales son los responsables del éxito de estas tecnologías, sino también los constantes desarrollos metodológicos que se realizan sobre ellas (24).

Es así como hoy en día tenemos distintos programas que nos ayudan a predecir algunas propiedades de moléculas y sistemas moleculares más o menos complejos. Sus aplicaciones van desde el dibujo de una molécula, hasta la simulación de sus interacciones. Algunos de los softwares usados para la modelización química y cuántica son LAMMPS (25), NWChem (26,27), que suelen ser gratuitos al menos en su versión de prueba y uno de los más usados aunque de pago el software COSMO-RS (28–31). El software COSMO-RS del inglés: *Conductor-like Screening Model for Real Solvents* es capaz de considerar las propiedades técnicas de los solventes de

manera que se pueden estudiar distintos sistemas y procesos de solubilización. Fue desarrollado por Klamt y colaboradores (30) y es conocido como un potente método de descripción molecular y de selección de solventes basado en el resultado de los cálculos químicos cuánticos para comprender el mecanismo de disolución de un sistema. COSMO-RS combina consideraciones de química cuántica (COSMO) y la estadística termodinámica (RS) para determinar y predecir las propiedades termodinámicas sin necesidad de datos experimentales, lo cual es bastante útil a la hora de probar un compuesto.

1.5. RESIDUOS Y SUBPRODUCTOS

1.5.1. Definiciones y generalidades.

La definición más clara de residuo cualquier sustancia u objeto que su poseedor deseche o tenga la intención o la obligación de desechar, esto fue determinado en la Ley 22/2011 de España (32). Esta misma Ley define lo que es un subproducto, denominándolo “ un residuo no residuo” es decir, una sustancia u objeto resultante de un proceso de producción (de un determinado producto), que tiene ciertas características por las cuales puede ser usado con seguridad (32). Es por esto, que muchos residuos pueden convertirse en subproductos, una vez se ha determinado que se pueden usar con seguridad y generar valor agregado.

En general los residuos se pueden clasificar en función de su procedencia, estado de la materia o si es contaminante o no. En España según el Instituto para la Diversificación y Ahorro de Energía, que pertenece al Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, los residuos se pueden clasificar en urbanos o municipales, industriales, peligrosos o no peligrosos e inertes (33). Desde la implementación de las estrategias para lograr una economía circular, las estadísticas presentadas para los residuos industriales muestran alguna mejora, sin embargo, en relación con los residuos domésticos no. En España los residuos municipales han aumentado (principalmente los relacionados con residuos biodegradables de cocinas y restaurantes), entre el año 2017 y 2018 alrededor de 126.334 toneladas (ton) (34,35). Esto contrasta con los resultados de las estadísticas para los residuos industriales que han mostrado una drástica disminución. Para la industria de la alimentación, bebidas y tabaco se redujeron casi a la mitad entre 2004 y 2016, los de la industria química, farmacéutica, y de la fabricación de productos de caucho y plástico una cuarta parte, según los datos del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (36). Hoy en día todavía muchos de los residuos biológicos se dejan lugares abiertos para que se descompongan de forma natural, se desechan en vertederos, o se incineran al aire libre y se secan para obtener carbón vegetal, lo que no sólo tiene una baja eficiencia, sino

que también provoca una grave contaminación ambiental, como las emisiones de gases de efecto invernadero y el deterioro de la calidad del aire (37).

La industria alimentaria, durante el proceso de producción, preparación y distribución de alimentos genera distintos tipos de residuos (tanto sólidos como líquidos) (38). A estos los llamamos residuos agroindustriales o agroalimentarios y muchos de estos pueden convertirse en subproductos dependiendo de distintas variables (pulcritud en los procesos productivos, clasificación y manejo, etc.). Según la oficina europea de estadística EUROSTAT, la industria de la producción de alimentos, bebidas y productos del tabaco de la unión europea generó 22,4 millones de toneladas de residuos animales y vegetales (tanto peligrosos como no peligrosos) en 2018. Esto supuso alrededor de 1,6 millones de toneladas más que en 2014 (39). La optimización de los procesos de producción con tendencia hacia la economía circular, siempre busca disminuir el volumen de residuos generados, pero la variedad de productos requeridos por el mercado, la constante carrera por la innovación y satisfacción del consumidor ante sus crecientes demandas, hace que los residuos agroindustriales y agroalimentarios lejos de disminuir, continúen generándose en grandes volúmenes. Dentro de los residuos más comunes en los procesos productivos se encuentran las partes de la materia prima que se desechan (porque no se requieren en el producto final) y las cascara, pieles, piedras, otros materiales físicos o líquidos que se generan en los equipos posteriores, a los tratamientos realizados con diferentes sistemas extractivos. Otro tipo de residuos que produce la industria alimentaria pueden ser los materiales de envase (de los productos usados para los tratamientos de fertilización y mantenimiento de cultivos, o para almacenamiento, producción y comercialización de los productos), entre otros, que pueden significar un amplio volumen de residuos y de los cuales algunos son catalogados como peligrosos, pero estos no son objeto de estudio de este trabajo.

Algunos residuos orgánicos provenientes de frutas y verduras, pueden convertirse en subproductos, a partir de los que se pueden extraer compuestos bioactivos que incluyen principalmente polifenoles, taninos, flavonoides, flavonoles, vitaminas (A y E), minerales esenciales, ácidos grasos, volátiles, antocianinas y pigmentos, mientras que los de origen animal incluyen péptidos bioactivos y en la industria láctea son principalmente los del suero y el calostro (40). El reto actual consiste en que los residuos derivados de las actividades agroalimentarias, puedan ser utilizados como materias primas o productos intermedios en distintas aplicaciones, eliminando o minimizando problemas de contaminación medio ambiental y generando valor añadido

Los residuos de la industria alimentaria se pueden dividir en dos grandes grupos en función de sus características bioquímicas, residuos de origen vegetal y de origen animal (41).

1.5.2. Residuos de origen vegetal y subproductos

Los residuos de origen vegetal son principalmente materiales lignocelulósicos, provenientes de las materias primas vegetales como residuos de frutas, verduras y de cultivo. Los residuos lignocelulósicos provenientes de la industria alimentaria actualmente son objeto de numerosas investigaciones, buscando revalorizarlos y convertirlos en subproductos, aprovechando su potencial para la obtención de compuestos de interés industrial. Los residuos lignocelulósicos también llamados biomasa lignocelulósica (en adelante BML), se generan en un alto volumen en muchos procesos agroalimentarios. Según las estadísticas, anualmente se pueden generar alrededor de 4600 millones de toneladas de BML, proveniente de residuos agrícolas como tallos, hojas y restos de cultivo (42). La industria agroalimentaria compone el 14,9 % de la industria total española. El subsector de la transformación de frutas y hortalizas representa un 8,3 % y el porcentaje de residuos generados en este tipo de industria puede llegar a estar entre 15 y 65 % del volumen inicial de materias primas, lo que significa muchas toneladas de residuos con potencial para su aprovechamiento (43). Antes el principal uso de BML era básicamente la producción de compost, pero poco a poco la biorrefinería ha ido ganando terreno, no solo por la necesidad de creciente de fuentes de energía si no por las limitaciones que ofrecen los productos derivados del petróleo. El uso de BML para la producción de biocombustibles y diferentes biopolímeros derivados que reemplacen los actuales polímeros provenientes de fuentes no renovables está cada vez más extendido(44–46).

Los componentes mayoritarios de la BML son tres biopolímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina (47–49). En función de su origen puede haber presentes otros componentes como aceites, pectinas, pigmentos, etc. También minerales, proteínas y compuestos extraíbles solubles en agua y ácidos orgánicos pueden presentarse como componentes minoritarios. Los polímeros de la BML se pueden separar por fraccionamiento o aislamiento con diferentes procesos químicos, físicos o biológicos y posteriormente deben ser sometidos a un proceso de purificación de ser necesario (50–52).

Los materiales lignocelulósicos poseen resistencia a la descomposición de la pared celular ya que la estructura cristalina de celulosa se encuentra incrustada en la matriz de polímeros de lignina y hemicelulosa como se muestra en la Figura 1.2, lo que hace difícil su fraccionamiento (48). El objetivo principal de los distintos tratamientos de materiales lignocelulósicos es eliminar

esta resistencia para separar la celulosa de la matriz de polímeros y hacer que este más accesible para una posterior hidrólisis y fraccionamiento de otros compuestos (49,53–55).

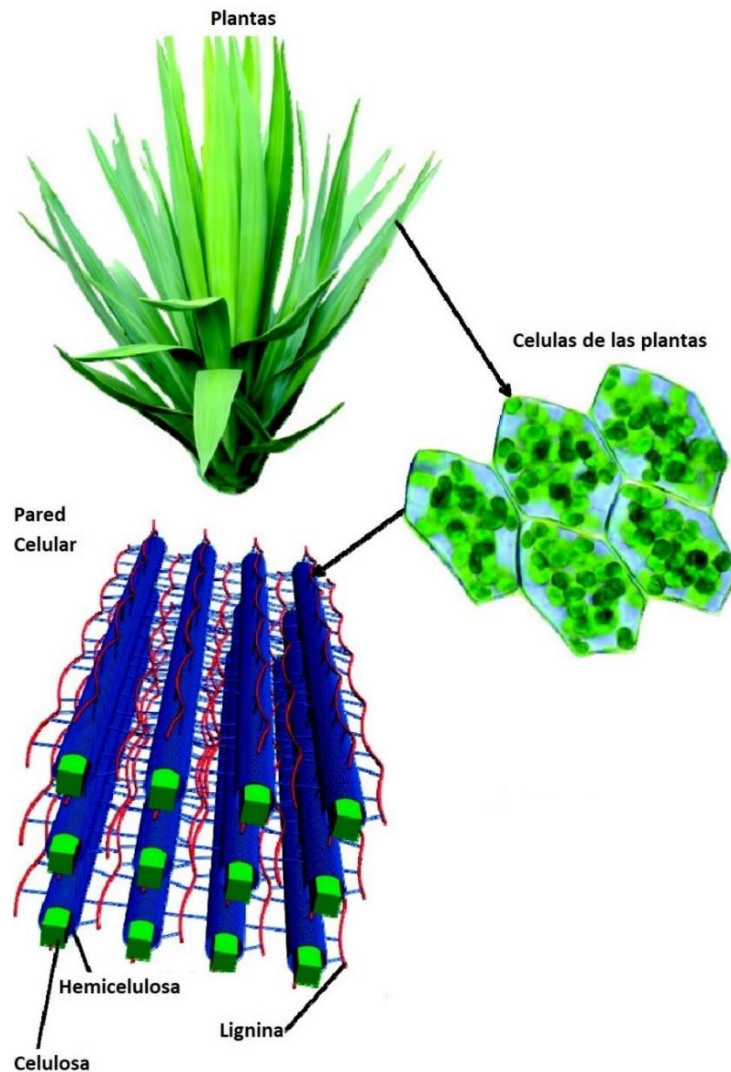


Figura 1.2. Estructura de biomasa lignocelulósica, adaptado y reproducido de J. Zakzeski et al (48). Copyright © 2010, American Chemical Society.

1.5.2.1. Celulosa

Es uno de los componentes mayoritarios de los materiales lignocelulósicos, constituye aproximadamente del 35 al 50 % (según procedencia de la biomasa) (47,53,56). Se caracteriza por ser la base estructural de las células vegetales y por ser insoluble en agua, disolventes orgánicos y en disoluciones acuosas básicas, además es soluble en ácidos y resistente a agentes oxidantes. La celulosa es el compuesto polimérico más abundante en la tierra (54,57,58) y su

fórmula química es $(C_6H_{10}O_5)_n$. Es un polímero lineal constituido por unidades de β -D-glucosa unidas por enlaces entre los carbonos 1 y 4. Por su alto grado de polimerización y ordenación interna es un polímero de gran tamaño que puede variar entre 100 y 30000 unidades de glucosa (53,54,57), dependiendo del tipo de derivado y su fuente. La celulosa con alto grado de polimerización puede alcanzar una longitud de cadena de 500 a 15.000 nm. La celulosa obtenida por métodos de aislamiento es poli dispersa, por lo cual su GP medio es menor (entre 800 a 3.000). Existen distintas técnicas que pueden dar información sobre las masas molares y distribución de la celulosa, como las mediciones de viscosidad y la cromatografía de exclusión por tamaño (57). La conformación lineal permite el empaquetado de numerosas hebras de celulosa en fibrillas cristalinas, formadas por las agrupaciones de las cadenas de glucosa, dando la estructura típica de la pared celular vegetal (53,54). En las unidades de glucosa, la configuración más estable es en forma de silla (Figura 1.3), con los grupos hidroxilos en posición ecuatorial. Donde la conformación molecular del enlace β glucosídico hace que se hidrolice con dificultad en medios catalizados por ácido. Los grupos OH que se encuentran en los dos extremos de la cadena muestran un comportamiento diferente, el grupo OH del C1 que se encuentra a uno de los extremos es un aldehído que le otorga propiedades reductoras, mientras que el grupo OH del C4 en el extremo opuesto de la cadena es un grupo hidroxil alcohol y en consecuencia no reductor (57). La representación más común de la estructura molecular de la celulosa, que está compuesta por unidades de glucosa, se muestra en la Figura 1.3, donde se observan las cadenas lineales formando puentes de hidrógeno entre ellas (54,57).

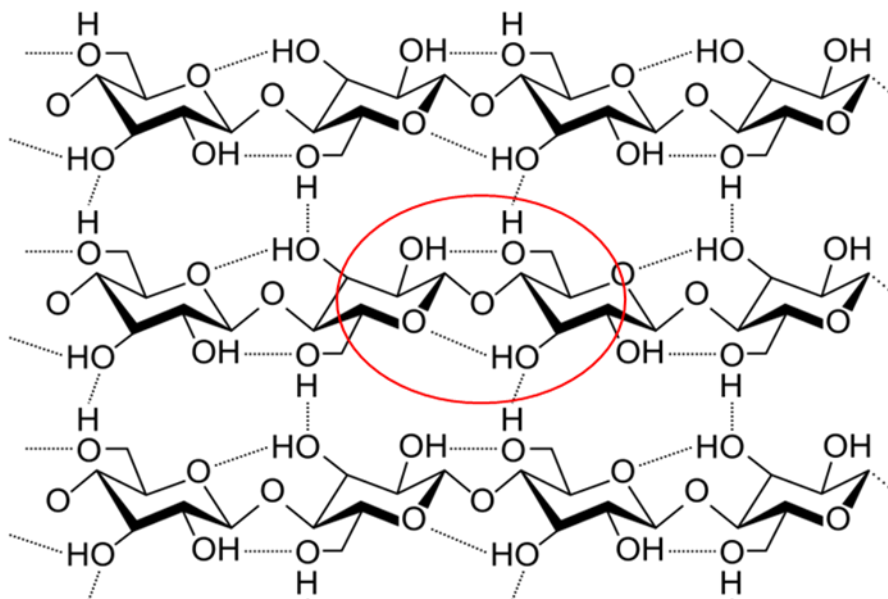


Figura 1.3. Estructura molecular lineal de la celulosa con un enlace glucosídico β 1-4 entre dos monómeros de glucosa demarcado en rojo.

Los enlaces de hidrógeno también llamados puentes de hidrógeno, son un tipo especial de enlaces en los que las fuerzas de Van der Waals se producen entre un átomo de hidrógeno de una molécula con deficiente carga electrónica y un átomo de otra molécula con elevada carga electrónica (59). Los enlaces de hidrógeno tienen mucha influencia sobre el comportamiento de algunas de las propiedades de la celulosa como la solubilidad, la reactividad y la cristalinidad. Además son los responsables de la rigidez y de las disposiciones tridimensionales de la celulosa (57).

El grado de polimerización (GP), la resistencia mecánica, cristalinidad, estabilidad térmica, porosidad, no toxicidad y la biodegradabilidad, entre otras propiedades hacen de la celulosa un compuesto de gran interés y con una amplia gama de aplicaciones industriales.

Actualmente sus principales derivados son la celulosa microcristalina (CM) y la celulosa nanocristalina (CN) que poseen un alto interés industrial. Su principal diferencia radica en el tamaño que alcanzan las partículas que puede ser alrededor de 50 μm de diámetro y longitud de 100-1.000 μm para la CM, o entre 5 a 20 nm de diámetro y una longitud de 100 nm a varios micrómetros para la CN (60,61).

1.5.2.2. Hemicelulosa

Este componente de la BML es un heteropolímero ramificado complejo de menor peso molecular que la celulosa. Actúa como agente de unión entre la lignina y la celulosa a través de una variedad de interacciones covalentes y no covalentes (Figura 1.2) (47). Se compone de azúcares C6 (glucosa, manosa y galactosa) y azúcares C5 (principalmente arabinosa y xilosa), además de algunos ácidos de azúcares (ácidos urónicos) (47).

1.5.2.3. Lignina

La lignina es el segundo polímero más abundante de la tierra después de la celulosa, la única materia prima renovable de gran volumen compuesta por compuestos aromáticos y además la única fibra no polisacárida que se conoce (62,63). Es uno de los componentes de la BML (entre el 15 a 30 %), también es uno de los subproductos de los procesos de fabricación de pulpa de papel y distintos procesos de química y biorrefinería (51,57,62,64).

Este polímero de fenilpropano compuesto por alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico unidos por enlaces éster (46,56), se une fuertemente a la celulosa y a la hemicelulosa a través de robustos enlaces covalentes de hidrógeno entre cadenas, formando una red y proporcionando así la estructura de las células vegetales (46). Los grupos funcionales de la lignina incluyen metoxilos, carbonilos, carboxilos e hidroxilos que se unen a elementos

aromáticos o alifáticos, en diferentes cantidades y proporciones, dando lugar a diferentes composiciones y estructuras de la lignina (51). Es una molécula de alto peso molecular, tridimensional y amorfa, en la que múltiples unidades estructurales que la componen no suelen repetirse de forma regular, su estructura está condicionada por su origen y método de aislamiento (65). Una de las representaciones estructurales de este polímero más aceptadas se representa en la Figura 1.4, donde se ven las unidades de fenilpropano oxigenadas unidas entre sí por enlaces C-C o con enlaces tipo éster (R-(C=O)-OR') (56,66).

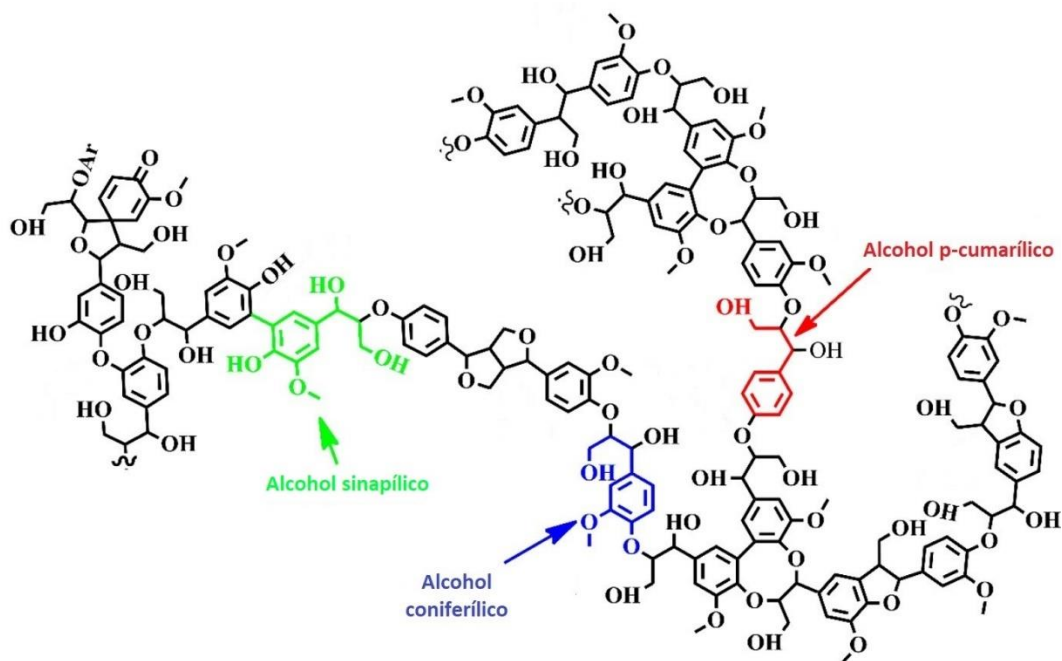


Figura 1.4. Estructura molecular de la lignina y con fragmentos de sus tres principales alcoholes de fenilpropano: sinapílico, coniferílico y p-cumarílico. Adaptado de Ge, Y. & Li, Z. (66). Copyright © 2018, American Chemical Society.

La lignina es insoluble en ácidos y soluble en álcalis fuertes como el hidróxido de sodio y es vulnerable a agentes oxidantes (52,56,67). Los grupos hidroxilos en las macromoléculas de lignina son cruciales porque desempeñan un papel importante en las propiedades químicas y físicas de la lignina, como la reactividad, la hidrofilia y la funcionalidad (66).

El método de extracción de la lignina depende del precursor y de su composición, y el rendimiento, la pureza y la estructura final están influidos por el tipo de método de extracción, el disolvente, la temperatura y el tiempo (50). En la mayoría de los casos, la extracción de lignina altera su estructura prístina debido a la compleja arquitectura que se observa en la matriz de los componentes de la biomasa (50).

1.5.3. Subproductos y residuos de origen animal

1.5.3.1. Generalidades

La mayoría de los residuos animales proceden de las industrias pesquera, cárnica, del cuero y avícola. Entre estos encontramos los residuos de carne, pescado, crustáceos, el estiércol de animales de granja y ganado, los residuos de curtiduría, las plumas de pollo y otras aves de corral, etc. (37). A los residuos resultantes del sacrificio de animales para la alimentación (grasas, vísceras, sangre, etc.), se les conoce como subproductos de origen animal no destinados al consumo humano (Sandach)(68,69). La normativa sanitaria española aplicable sobre Sandach estaba regida por el “Reglamento del Parlamento del Consejo Europeo” (CE) 1774/2002, que fue derogado por el CE 1069/2009 (70). La modificación se ha realizado ante el cambio de las necesidades, los avances científicos y mejoras de los procesos para garantizar la seguridad sanitaria. Según esta normativa los residuos Sandach son “los cuerpos enteros o partes de animales o productos de origen animal de las tres categorías en la que se clasifican no destinados a consumo humano, incluidos óvulos, embriones y esperma” (69,70). La normativa clasifica a los Sandach en 3 categorías en función de su riesgo, de acuerdo a su naturaleza, gestión y procesamiento por el que pueden ser transformados, explotados y comercializados o no (69–71). Se ha evidenciado la afectación de la seguridad de la cadena alimentaria humana, animal y la confianza de los consumidores, debido a la aparición de diversas patologías en los animales de sacrificio que pueden ser transmitidas a los seres humanos generando crisis sanitarias. Episodios como los brotes de fiebre aftosa, la propagación de encefalopatías espongiformes transmisibles (como la Encefalopatía Espongiforme bovina (EEB)) y la presencia de dioxinas en los piensos (70,72) generaron la estricta normativa para los Sandach y la prohibición en muchos países (entre ellos la Unión Europea, Canadá y Estados Unidos), de la incorporación de muchos de sus productos derivados en productos alimenticios tanto de humanos como de animales (72,73). Según la normativa, también existen los Productos Animales de Bajo Valor Añadido considerados aptos para el consumo humano que pertenecen a la categoría 3 de los Sandach (74).

El procesamiento de la biomasa procedente de residuos animales es fundamental para su aprovechamiento, sin duda alguna los procesos térmicos son la principal herramienta en la destrucción de distintos tipos de compuestos y/o microorganismos que pueden causar riesgo en la salud humana. Se ha demostrado que la hidrólisis térmica (Temperatura mínima: 180 °C, Presión: 1.200 kPa, tiempo: 40 min) destruye la proteína priónica que se encuentra en los tejidos de algunos bovinos. Se sospecha que los priones causan la EEB y por eso estos tejidos son considerados como material especificado de riesgo y clasificados como residuos peligrosos (72).

La gestión de los Sandach conlleva un gasto importante para las empresas y un impacto negativo al medio ambiente porque aquellos que no son utilizados deben incinerarse (74). Los subproductos y residuos animales pueden usarse como biomasa para la generación de energía o también generar productos como harinas, grasas, fibras y Proteínas Animales Transformadas (PAT). La mejora en los procesos en la industria alimentaria, las prácticas sanitarias, los procesos y tratamientos a los residuos hacen que se controlen más y mejor los riesgos inherentes de los Sandach. Así, se van encaminando estas prácticas industriales hacia la economía circular y se cumple la estricta normativa que garantiza la minimización del riesgo en la salud de los consumidores. De esta manera se pueden obtener distintitos productos como los mostrados a continuación.

1.5.3.2. Harinas

Las harinas son materiales granulados secos que pueden provenir de huesos, cartílagos, restos de carne o de huesos y cabezas de pescado. Son unos de los principales productos procesados a partir de los residuos animales y se consideran como un subproducto, obteniéndose de todos los tipos de mataderos y pescaderías. La amplia normativa que la cubre, su clasificación en función de su fuente o método de recolección, si ha sido sometida a tratamiento o no, afectan directamente sus características y posibles usos. La harina procedente de sangre bovina lleva inmersos procesos como anticoagulación, centrifugación y posterior congelación para la separación de sus constituyentes esenciales (74).

El proceso de producción de harina de pescado incluye la aplicación de calor para coagular las proteínas y separar el agua, posteriormente un prensado para separar el sólido del líquido, luego el secado de la materia sólida y conversión en un material granulado. De la parte líquida que sale del prensado se puede obtener otro subproducto como lo es el aceite (75).

1.5.3.3. Aceite

Los aceites considerados como subproducto y con más potencial industrial son principalmente los aceites de pescado, estos contienen distintos tipos de ácidos grasos susceptibles también de aprovechamiento, desde los ácidos grasos saturados (AGS), ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) hasta los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (76). Estos últimos, los AGPI son de gran interés industrial debido a sus comprobadas propiedades benéficas para la salud demostrada por numerosos estudios científicos (77–79).

Los aceites se extraen principalmente de las cabezas, vísceras y restos de músculo de pescado puesto que tienen más compuestos de interés farmacéutico y funcional (75,76). El aceite de pescado comúnmente se obtiene en el proceso de elaboración de harina siendo la fase líquida obtenida del prensado, posteriormente sometida a purificación y refinado (75).

1.5.3.4. Ácidos grasos omega-3.

Los ácidos grasos omega-3 son ácidos grasos esenciales que se encuentran en alta proporción en los tejidos de ciertos pescados y en algunas fuentes vegetales. Los principales ácidos grasos omega-3 son el ácido α -linolénico (ALA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), estos dos últimos se obtienen principalmente de fuentes marinas (75). Los principales efectos sobre la salud otorgados a los ácidos grasos omega-3 aislados y/o combinados como ésteres etílicos se han descrito en las enfermedades cardiovasculares (ECV) (77,80,81). También se han descrito efectos beneficiosos por sus importantes propiedades antiinflamatorias y la protección de las células hepáticas contra la toxicidad inducida por los ácidos biliares (82) y en enfermedades como la diabetes (83), las enfermedades del sistema inmunitario(84) y el cáncer (85,86). Asimismo, se han encontrado interacciones positivas incluso en enfermedades como el trastorno del espectro autista (TEA) (87) y el Alzheimer (88) lo que los hace muy atractivos para ciertos usos industriales.

1.5.3.5. Proteínas

Las proteínas son moléculas formadas por aminoácidos que están unidos por un tipo de enlaces conocidos como enlaces peptídicos, hacen parte de los macronutrientes y son fundamentales en la vida. **El colágeno** es una proteína fibrosa, el componente principal de las capas intercelulares o tejidos conjuntivos fibrosos que constituye entre el 30 y el 60 % del contenido de proteína total de los mamíferos y más del 30 % del contenido total de materia orgánica. Para la obtención del colágeno primero éste se debe solubilizar (por acción de ácidos o por tratamiento enzimático), posteriormente aislar (por precipitación) y purificar (mediante disolución y posterior separación por diálisis) (75). La **gelatina**, que es una forma parcialmente hidrolizada del colágeno (89,90), se puede obtener al romper los enlaces de la triple hélice del colágeno, una vez separadas las cadenas se procede a hidrólisis controlada purificación y secado del producto (75). A partir de los residuos marinos como la piel se pueden extraer proteínas como colágeno y gelatina (89,90). La **elastina** también es una proteína del tejido conjuntivo que aporta resistencia y dureza, por lo cual sus fuentes son similares a las del colágeno. A partir de los demás residuos Sandach procedentes de mataderos de bovinos, y ovino, también podemos

obtener proteínas como el colágeno y la elastina y se obtienen principalmente de la piel y tendones de los animales (74).

Hidrolizados proteicos son péptidos de diferentes tamaños originados por la hidrólisis de las proteínas también llamados proteína hidrolizada que hacen parte de la PAT. La hidrólisis de las proteínas se puede llevar a cabo por medios químicos o enzimáticos (75). La proteína hidrolizada del pescado se compone de entre 16 y 18 aminoácidos según el tipo de especie de pez y las variaciones estacionales en las que sea pescado. Su composición de aminoácidos es bien equilibrada ya que consta de ocho aminoácidos esenciales y ocho no esenciales (89). Los **péptidos bioactivos** son una pequeña secuencia de **aminoácidos** encriptada en una proteína (91). Estos se pueden producir a partir de la proteína extraída de peces mediante métodos químicos o enzimáticos, y cuentan con un gran potencial en la industria farmacéutica.

1.5.3.6. Otros compuestos funcionales

Diversos compuestos que pueden ser denominados como funcionales o nutracéuticos pueden ser extraídos de los residuos de pescado, lo cual ha sido expuesto en diversas publicaciones científicas. A parte de los compuestos mencionados también se pueden encontrar minerales, y enzimas almacenados en los residuos de pescado (89).

El **chitosan** es polisacárido que se puede extraer de los residuos pesqueros y que tiene diversos usos. También conocida como **quitosano** es un polisacárido natural, biodegradable y biocompatible, que se obtiene de la quitina, abundante en los caparazones de ciertos crustáceos (gamba, cangrejo y camarón) (75,92). A la quitina se le atribuye actividad antimicrobiana, inmunogénica, antitumoral, anticoagulante y cicatrizante, pero su escasa solubilidad la hace difícil de usar, por este motivo se transforma en quitosano. Producir quitosano requiere diversos procesos como desproteización, descalcificación, despigmentación y desacetilación de quitina (75).

Los **carotenoides** son compuestos que actúan como pigmentos pero que a la vez son considerados potentes antioxidantes. De los residuos de crustáceos se ha logrado extraer carotenoides como la astaxantina (93). Su uso está ampliamente distribuido entre las industrias alimentarias, los aditivos para piensos y los cosméticos humanos (93).

Enzimas: Las enzimas disponibles en el pescado son: pepsina, tripsina, quimotripsina y colagenasa. Estas enzimas se extraen comercialmente de las vísceras del pescado a gran escala. Estos biocatalizadores poseen mejores propiedades catalíticas que los catalizadores

heterogéneos, buena eficiencia a bajas temperaturas, menor sensibilidad a las concentraciones de sustrato y mayor estabilidad (89).

Escualeno: hidrocarburo natural, es considerado un compuesto bioactivo ya que es intermediario en la biosíntesis del colesterol, fortalece el sistema inmunitario, previene padecimientos cardíacos y posee propiedades antioxidantes. Se extrae del aceite de hígado de tiburón por destilación al vacío (75).

Condroitín sulfato es un glucosaminoglucano sulfatado, una sustancia natural existente en tejidos de vertebrados e invertebrados, que se une a proteínas (75). Se puede obtener de los cartílagos como las tráqueas de los bovinos, porcinos, aviares, en el caso del marino se extrae del tiburón (74,75).

Ácido hialurónico es un polisacárido que presenta función estructural se puede extraer del humor vítreo y líquido sinovial de ganado vacuno, crestas de gallos, aletas de tiburón y del humor vítreo de distintas especies de pescado, como tiburón, atún o gallineta, a partir del cartílago presente en las tráqueas de bovinos (74,75). Entre sus propiedades destacan su capacidad para retener agua, para desarrollar colágeno o como antiinflamatorio y lubricante de las articulaciones.

La **Insulina** es una hormona que secreta el páncreas. Este polipéptido de 51 aminoácidos forma dos cadenas unidas por diferentes puentes disulfuro e intervine en el aprovechamiento metabólico de los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas. Los defectos en la secreción de esta hormona causan la diabetes, esta enfermedad la padecen más de 2 millones de personas en el mundo y su tratamiento es la administración de insulina (94). Desde los años 80 se sintetiza insulina humana a partir del páncreas porcino(solamente se diferencian en un aminoácido) y bovino, aunque este proceso, se combina con la fabricación de insulina sintética (74).

1.5.4. Usos industriales de subproductos agroalimentarios y perspectivas

1.5.4.1. Biomasa lignocelulósica (BML).

Los usos de la BML se investigan a diario y se basan en aprovechar estructuras poliméricas de origen biológico, renovables y menos contaminantes, en lugar de los tradicionales y ya posicionados polímeros y materiales derivados del combustible fósil (95). Se ha demostrado que se pueden preparar distintos tipos de materiales tales como polímeros funcionales, adsorbentes, portadores, energéticos, de uso médico, agentes floculantes basados en biopolímeros y hasta polímeros inteligentes (96). El proceso de extracción y el origen de la BML

son las principales variables que condicionan la morfología ultraestructural y las características funcionales de los derivados que se puedan obtener (58).

Actualmente los estudios sobre la celulosa y sus derivados buscan usos cada vez más novedosos, desde la producción de combustibles, química fina y hasta materiales de ingeniería (fibras, tubos, aerogeles, electrónica, envases, impresión 3D, etc.) (46). Algunas de las aplicaciones más comunes de la celulosa y sus derivados se resumen en la Figura 1.5. Ni la gestión de los residuos se escapa a los usos de la celulosa, puesto que se usa en distintas tecnologías para la eliminación de contaminantes de las aguas residuales, como la adsorción, la filtración por membrana, la coagulación, el intercambio iónico, la electrólisis y los métodos fotocatalíticos (95).



Figura 1.5. Principales usos industriales y posibles usos de la celulosa (58,95,97).

Derivados como la CM y la NC son usados como agente de refuerzo polimérico y/o aglutinante, principalmente en la industria cosmética y alimentaria. También han sido usados en la industria farmacéutica, tanto en la estabilización de suspensiones como en el suministro de fármacos, entre otras aplicaciones médicas (61,95). Los derivados de celulosa poseen gran biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo que les permite ser usados como un envoltorio alimentario alternativo a los polímeros sintéticos. Además, su uso en aplicaciones biomédicas es prometedor. Sus usos incluyen estructuras soporte (andamios) para la ingeniería de tejidos y excipientes farmacéuticos para la administración de fármacos. (58,60,95,97).

Respecto a la lignina, el abanico de usos también es bastante amplio por su versatilidad y las posibilidades que ofrece su fraccionamiento. Sus aplicaciones van desde la agricultura

(compostaje entre otros), la industria alimentaria, bioplásticos, biocombustibles, biomateriales, lubricantes hasta el campo de las partículas (nanocompuestos y nanopartículas) (46,98,99). En la Figura 1.6 se observan algunas de las áreas, aplicaciones y usos de la lignina.



Figura 1.6. Principales usos industriales y posible usos de la lignina (46,50).

Se puede decir que la fracción de lignina obtenida de la BML se utiliza principalmente para la producción de compuestos aromáticos (44) los cuales son usados en distintas aplicaciones (Fig. 1.6). También se han reportado efectos benéficos para la salud por parte de algunos de los componentes de la lignina, actualmente se estudian propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, prebióticas, antioxidantes, antibióticas y antimicrobianas (46).

1.5.4.2. De origen animal

Los usos de los residuos de origen animal tradicionalmente fueron el compostaje, pero las aplicaciones de los Sandach han ido evolucionando. Hoy en día se puede usar la biomasa animal (por ejemplo la proveniente del estiércol) para producir biocombustibles y hasta obtención de metano o hidrógeno a través del tratamiento de los residuos orgánicos (100). También son usados para la fabricación de piensos y biomateriales.

- **Piensos:**

Uno de los principales mercados para los residuos de origen animal. Se pueden producir a partir de **harinas** de carne, huesos o sangre, principalmente por su alto contenido en PAT. El uso de harinas con PAT en los piensos para animales estaba prohibido para piensos de aves (y otros

usos específicos), pero el año anterior (2021) la comunidad europea ha optado por permitir de nuevo su uso, siempre y cuando no se use para la producción de piensos la misma especie que los consume (101). Esto sin lugar a dudas incentivará de nuevo la producción de este tipo de producto. Además de su uso en los piensos, la harina de sangre puede ser usada para las industrias alimentaria y farmacéutica mediante la obtención de moléculas biológicamente activas (MBA) (74).

- **Biomateriales:**

Productos naturales de valor industrial como el colágeno, elastina usados en farmacéutica y cosmetología también pueden ser sintetizados a partir de estos residuos Sandach (37,74,75). Entre los residuos de origen animal los desechos del marisco son los recursos más abundantes de biomateriales (37,75). Los residuos como las cáscaras, cabezas, pieles, colas, aletas, huesos, exoesqueletos, espinas y vísceras son fuentes potenciales para recuperar sustancias naturales como colágeno, gelatina, quitina y quitosano entre otras (37,75).

Proteínas a partir de pescado (Sandach): en el caso del colágeno y la gelatina sus principales usos son en la industria alimentaria, farmacéutica y biomédica (75,89). Pese a que también se puede extraer este tipo de proteínas de los bovinos, las que provienen del pescado tienen mejores características debido a su configuración de aminoácidos (89). El **colágeno** se usa como nutraceutico para prevenir las patologías osteoarticulares y en productos cosméticos para el tratamiento de arrugas producidas por una pérdida de elasticidad debida al envejecimiento. Las **gelatinas** pueden ser usadas en la industria alimentaria como estabilizante y emulsionante, como excipiente de encapsulación en la industria farmacéutica y de complementos alimentarios, así como en la fabricación de películas fotográficas, películas gráficas y películas de rayos X y como material de soporte junto al que se implantan las células madre (75). **Elastina** se usa para la industria cosmética así como para tratamientos quirúrgicos reparadores (74).

Otros usos de las **PAT** provenientes de Sandach han sido reportados por diversos autores. Según Ramkumar y colaboradores (102) proteínas hidrolizadas de pescado pueden ser sustrato barato para la producción de enzimas como proteasas, enzimas de importancia económica por su amplia aplicación en la industria del cuero y de los detergentes. Mekonen y colaboradores, así como Adhikari y colaboradores (72,73,103) han documentado el uso de proteínas hidrolizadas para la fabricación de sustancias adhesivas para conglomerados de madera y madera.

La **proteína del pescado** es una fuente de aminoácidos equilibrada, lo que permite que los subproductos desarrollados a partir de esta (harina de pescado, salsa de pescado, fertilizante, alimento para animales, ensilado, etc.) tengan unas excelentes propiedades (89). Los

aminoácidos obtenidos por hidrólisis de las proteínas de pescados se utilizan como aditivos alimentarios, en aplicaciones farmacéuticas, producción de piensos y complementos alimenticios. Además, aminoácidos como la arginina, la glicina, glutamato e histidina se utilizan en productos farmacéuticos proteicos como excipiente (89).

Aceite y sus ácidos grasos: el aceite de pescado dependiendo de la fuente y método de extracción puede utilizarse en la industria alimentaria, farmacéutica, en la agricultura y principalmente en la acuicultura como aditivo para piensos (77,104). También se ha utilizado como portador de pesticidas, en pinturas y en la fabricación de cuero (76,77). Además, los ésteres de ácidos grasos de alcoholes simples se utilizan en una gran variedad de aplicaciones, tales como la producción de biodiésel o aditivos de biodiésel, lubricantes, refrigerantes para la metalurgia, fluidos de perforación e impresión, tintas y disolventes en resinas alquídicas (77,105). Los **AGPI** como los omega-3 y sus ésteres etílicos se usan como ingredientes nutraceuticos en productos alimentarios funcionales y en productos farmacéuticos, entre otros (77,78,106).

El **escualeno** se usa en medicina como adyuvante en vacunas contra la gripe y paludismo. También es explotado en la industria farmacéutica y cosmética, como ingrediente en cremas, lociones y esmaltes, además de usarse como humectante y emoliente. En la industria alimentaria se puede usar como agente antioxidante, como refuerzo del sistema inmunitario y para reducir los niveles de colesterol (75).

Los usos del **quitosano** son variados, estos van desde el recubrimiento de semillas, sistemas liberadores de fertilizantes, agentes bactericidas y fungicidas en la agricultura, hasta usos en el sector médico, como por ejemplo su aplicación en gasas, vendajes y cremas bactericidas para el tratamiento de quemaduras. Se usa también como coagulante primario para el tratamiento de aguas residuales, floculante para la remoción de partículas coloidales sólidas y aceites de pescado y en el tratamiento de captura de metales pesados en soluciones acuosas. En la industria cosmética sus usos van desde la fabricación de cápsulas “quita grasas”, agentes hidratantes para la piel, hasta aditivos bactericidas en jabones y en la pasta dental. En alimentación se puede usar como aditivo alimentario y componente en cubiertas comestibles. En biosensores se puede aplicar como soporte para la inmovilización de enzimas sensibles a un sustrato específico (75,92).

El **ácido hialurónico** se usa como lubricante, amortiguador y regenerador de tejidos, además de utilizarse para cirugía intraocular, procesos artrósicos, artríticos y para la recuperación de tejido quemado (74). En cosmética en tratamientos para la hidratación de la epidermis, en

cirugía estética como material de relleno e implantes y en medicina para el tratamiento de artritis reumatoide (75). El **Condroitín sulfato** es un compuesto utilizado en bioingeniería médica para la regeneración de tejidos para la investigación (74), además de ser calificado como antiinflamatorio no esteroideo y usarse en tratamientos para la artrosis en humanos y patologías articulares de animales (75).

Algunos **otros compuestos** del aceite de pescado también se han utilizado como portadores de pesticidas, en pinturas y en la fabricación de cuero (76). Además, los ésteres de ácidos grasos de alcoholes simples se utilizan en una gran variedad de aplicaciones, como aditivos para el biodiésel, lubricantes, refrigerantes para la metalurgia, fluidos de perforación e impresión, tintas, disolventes en resinas alquídicas, entre otros (105).

1.6. SOLVENTES

1.6.1. Solventes orgánicos.

Un solvente es en general una sustancia que se utiliza para diluir otra sustancia (soluto). Molecularmente el solvente actúa rodeando las moléculas del soluto a este proceso se denomina solvatación (107,108). Es así como los solventes se pueden utilizar para disolver, extraer o suspender otras sustancias y para formar disoluciones. Los solventes generalmente son líquidos, pero también pueden existir en forma gaseosa o sólida. El más común es el agua denominada el “solvente universal” dado que disuelve más sustancias que ningún otro (109). El fraccionamiento de BML se puede realizar por diferentes métodos químicos (con solventes o hidrólisis ácida), físicos (auto hidrólisis, explosión de vapor, entre otros), biológicos (enzimas) o mezclas de estos (110,111). Los solventes además de participar en el fraccionamiento de BML también se usan en procesos de industrias farmacéuticas, químicas, agroindustriales y agroalimentarias, de manera que se utilizan y eliminan millones de toneladas cada año, lo que incrementa el impacto medioambiental (53,112).

Los solventes orgánicos comunes se clasifican generalmente en hidrocarburos (alifáticos, aromáticos, cíclicos o halogenados), aminas, cetonas, ésteres, éteres, aldehídos, alcoholes, etc. (107) que en general provienen de la industria petroquímica (recurso no renovable). En la Tabla 1.1 se nombran algunos de los solventes usados más comunes y sus abreviaturas.

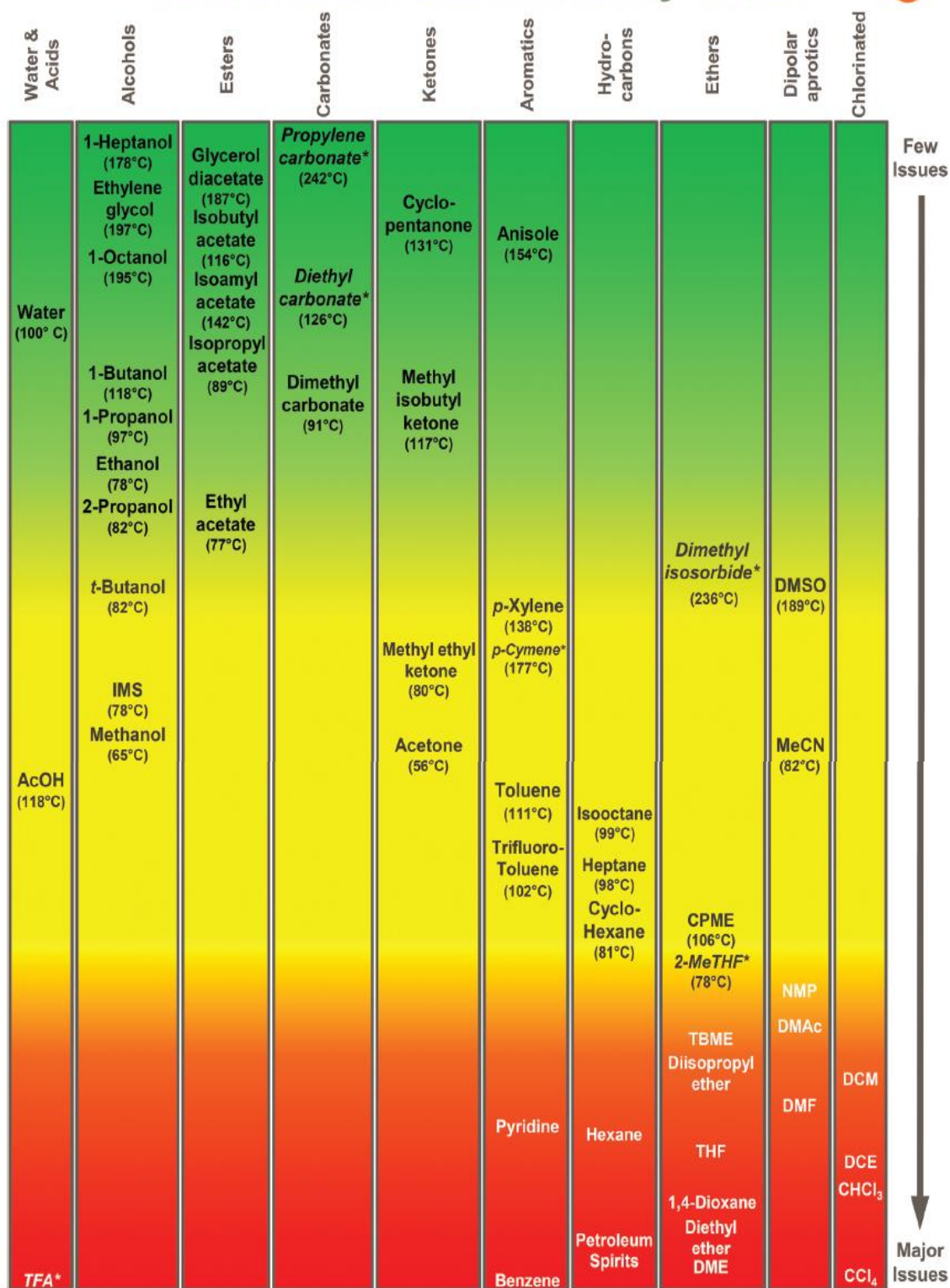
Tabla 1.1 Solventes más usados y su clase química (113).

| Clase química | Solvente | | |
|----------------------------|--|--|---|
| Agua y ácidos | Agua | Ácido acético (AcOH) | Ácido trifluoroacético (TFA) |
| Alcoholes | 1-Heptanol 1-Butanol 2-Propanol Metanol | Etilenglicol 1-Propanol 2-Butanol | 1-Octanol Etanol Éter industrial metilado (IMS) |
| Ésteres | Glicerol diacetato Isopropil acetato | Isobutil acetato Etil acetato | Isoamil acetato |
| Carbonatos | Carbonato de propileno | Dietil carbonato | Dimetil carbonato |
| Ketonas | Ciclo pentona Acetona | Metil isobuti lketona | Metiletil ketona |
| Aromáticos | Anisole Tolueno Benceno | p-Xileno Trifluoruro de tolueno | p-Cimeno Piridina |
| Hidrocarburos | Isooctano Hexano | Heptano Éteres de petróleo | Ciclohexano |
| Éteres | Dimetil isorbida 2-Metiltetrahidrofurano (2-MeTHF) Diisopropileter 1,4-Dioxano 1,2-Dimetoxietano (DME) | Ciclopentilmetileter (CPME) Metiliterbutileter (TBME) Tetrahidrofurano (THF) Dietiléter | |
| Apróticos dipolares | Dimetil sulfoxido (DMSO) N-metil-2-pirrolidona (NMP) N,N-dimetilformamida (DMF) | Acetonitrilo (MeCN) Dimetilacetamida (DMAc) | |
| Clorados | Diclorometano (DCM) Cloroformo (CCl ₃) | 1,2-Dicloroetano (DCE) Tetracloruro de carbono (CCl ₄) | |

Pese a haber sido usados durante muchos años, disolventes conocidos como compuestos orgánicos volátiles (COV's) hoy en día son considerados unos de los grandes contaminantes medioambientales y responsables del calentamiento global, principalmente porque afectan la capa de ozono (114,115). Algunas de sus características como alta presión de vapor, alta volatilidad, inflamabilidad, toxicidad, entre otras, hacen que se consideren contaminantes para el medio ambiente y nocivos para la salud humana (53,112,114,115). El uso y elección del disolvente es esencial para muchos procesos ya que representa gran parte del volumen empleado en los procesos de extracción y/o síntesis (112,116). Es aquí donde entra la química verde que busca reducir el uso y la producción de sustancias peligrosas en los procesos industriales, además de disminuir el consumo de energía encaminándose al uso de fuentes renovables y procesos sostenibles (11,63,99,116). Las empresas farmacéuticas como "GlaxoSmithKline" GSK (112,113), AstraZeneca, Pfizer, Sanofi y grupos especializados como la Mesa Redonda Farmacéutica del Instituto de Química Verde de la ACS y la Iniciativa de Medicamentos Innovadores (IMI)-CHEM21 (117), han generado varias clasificaciones de los solventes según sus potenciales riesgos; estas son el principio básico de las guías de selección de disolventes publicadas (116). La empresa farmacéutica GSK publicó su primera guía en 1998 y su objetivo era para mejorar la selección de solventes para la síntesis química (112,113). Esta

guía ha ido actualizándose en el tiempo, incluyendo solventes y riesgos y en ella se evalúan cuantitativamente los solventes según varios aspectos como: peligros para la salud, seguridad del medioambiente, eliminación de residuos, potencial de exposición, inflamabilidad y explosión, reactividad y estabilidad, impacto en el aire y agua, incineración, reciclaje, tratamiento biológico y COV's, donde 1 es el valor de menor riesgo y 9 el más alto o el de mayor riesgo (108,112,113). Básicamente estos mismos criterios son usados por las demás guías. Según estas guías muchos de los solventes orgánicos comúnmente usados son potencialmente peligrosos (Figura 1.7), su uso está siendo restringido cada vez más por la normativa Europea y se busca su remplazo por solventes menos nocivos (116).

GSK Solvent Sustainability Guide



* The scoring assessment for this solvent includes 4 or more data gaps, therefore there is a lower level of confidence in the solvent's placement on this guide.

Figura 1.7. Vista de una sola página de la Guía de Sostenibilidad de los Disolventes de GSK, que incluye los disolventes más utilizados y las alternativas recomendadas, ordenados por clase química, Descrito por Alder et al (113).

La necesidad de buscar otro tipo de solventes con los que se puedan llevar a cabo los procesos industriales con menor impacto ambiental y para la salud humana, ha introducido un nuevo concepto de solventes “solventes amigables con el medioambiente” o también llamados solventes verdes, popularmente conocidos como “green solvents” del inglés (116,117). Este tipo de solventes se están integrando lentamente en los procesos industriales. Esto se debe a que proporcionan ventajas sobre los disolventes orgánicos o acuosos, normalmente mejorando la separación de productos sumado a las ventajas en su manejo e impacto. Entre los ejemplos de solventes amigables con el medioambiente se encuentran los líquidos iónicos (en adelante IL's del inglés *Ionic Liquids*, los solventes eutécticos (en adelante DES's del inglés *Deep eutectic solvents*), los polímeros líquidos, el dióxido de carbono supercrítico (en adelante scCO₂ del inglés *Supercritical CO₂*), los disolventes expandidos por gas (en adelante GXL del inglés *Gas-Expanded Liquid*) y los disolventes conmutables (116).

Los IL's pueden definirse como sales formadas por cationes orgánicos y aniones orgánicos o inorgánicos con puntos de fusión generalmente inferiores a sus constituyentes y usualmente menores a los 100 °C. Estos compuestos poseen una alta estabilidad térmica, reciclabilidad, baja presión de vapor, viscosidad ajustable, miscibilidad, solubilidad y capacidad de extracción para muchos compuestos orgánicos e inorgánicos (118,119). Pese a que durante mucho tiempo todos los IL's se consideraron solventes verdes, estudios han demostrado que algunos IL's pueden ser volátiles, inflamables, inestables e incluso tóxicos, posiblemente por algunas de las grandes combinaciones de cationes y aniones, que pueden llegar a tener este comportamiento adverso (120,121).

Los polímeros líquidos (como el polietilenglicol y el polipropilenglicol) usados como solventes presentan algunas ventajas como su baja volatilidad, y biodegradabilidad, sin embargo pese a que son usados en diversas aplicaciones industriales y a que normativa para su uso como solvente es poca, aún no se han utilizado comercialmente para este fin (116).

El uso de solventes supercríticos como el scCO₂ es uno de los métodos de extracción de compuestos más innovadores, suele usarse principalmente en la extracción de compuestos de manera no toxica (122). Se ha usado en la extracción de compuestos como carotenoides, ácidos grasos omega-3, cafeína, aroma de lúpulo, entre otros (40,104,122,123). Sus aplicaciones son principalmente en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética y requiere una alta inversión y mantenimiento (116). La definición de una sustancia en un punto supercrítico (PSC) es cuando está sometida a condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico, llamadas temperatura crítica (T_c) y presión crítica (p_c) en donde no se puede licuar ni vaporizar,

de manera que las sustancias no se comportan ni como líquido ni como gas. En un fluido supercrítico la solubilidad de un soluto es una función compleja entre la temperatura y la presión (122). El CO₂ es un excelente disolvente supercrítico porque su PSC es fácil de conseguir (T_c = 31 °C, p_c = 72,8 atm), su costo es bajo (en comparación con otros) y debido a que presenta buena selectividad y capacidad de extracción (116,122,123).

Los GXL se forman disolviendo un gas comprimible (como el CO₂) en un solvente orgánico. Aumentando o disminuyendo la presión para disolver más o menos el CO₂ en el solvente, la solubilidad de los solutos puede cambiar y se pueden realizar separaciones multicomponentes (62,124). Además de esto, otras de las posible ventajas de este método es la reducción de la cantidad de solvente orgánico hasta en un 50 % y el manejar condiciones de funcionamiento más suaves en comparación con otros procesos industriales y basados en el fluidos supercríticos (116).

Los solventes conmutables son definidos como aquellos que cambian bruscamente sus propiedades físicas de forma reversible, en respuesta a un estímulo externo (cambio de temperatura, luz y/o la adición o eliminación de un gas) (125). De nuevo el CO₂ es protagonista pues es uno de los materiales conmutables más usados. Pese a que aún no se utiliza mucho este proceso dentro de sus ventajas están su uso seguro, el bajo coste, la escasa o nula generación de residuos y un mecanismo fácilmente reversible (116).

Los DES's actualmente representan una de las mejores alternativas como solventes verdes, y han sido uno de los principales solventes empleados en este trabajo, por lo tanto, se amplía la información a continuación.

1.6.2. Solventes Eutécticos (DES's)

1.6.2.1. Evolución de los DES's

En el marco de la química verde y posterior a la publicación de los 12 principios de la química verde en 1998, los científicos se han enfocado en la búsqueda de solventes alternativos y más amigables con el medioambiente (116). En 2001 Abbot y colaboradores (126) en la búsqueda de nuevos IL's realizó pruebas con distintos compuestos, entre estos algunos basados en diferentes sales de amonio cuaternario y sales metálicas. De las pruebas realizadas la mezcla de cloruro de colina (ChCl) con el cloruro de zinc en una proporción molar de 1:2 presento el punto de congelación más bajo (23 - 25 °C) (127). Sus investigaciones continuaron y fue así como el termino DES's fue acuñado por primera vez en 2003 por Abbott y colaboradores (128) para describir mezclas de ChCl con urea que tenían puntos de fusión mucho más bajos que los de sus

compuestos puros (129). Posterior a esto, la urea se comenzó a sustituir por ácidos carboxílicos (oxálico, málico y succínico) o alcoholes, lo que dio lugar a DES's con propiedades similares a las de los IL's, destacando el potencial de los DES's para la extracción de compuestos bioactivos (128,130–133). Por estos días se maneja otro termino para referirse a un tipo específico de DES. El termino NADES (del inglés Natural Deep Eutectic Solvent) fue utilizado por primera vez por Choi y colaboradores (134) para definir las mezclas eutécticas de dos o más compuestos naturales (119). Básicamente los NADES se componen de los llamados “metabolitos primarios” como los ácidos orgánicos, los aminoácidos, los azúcares, los polioles y los derivados de la colina (127). A menudo se buscan términos diferentes para referencia a los componentes específicos de los DES, como es el caso de los basados en aminoácidos llamados AADES (del inglés Amino Acid DES) o como los DES's terapéuticos o también llamados THEDES (del inglés therapeutic DES) (131,135).

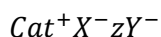
Actualmente las publicaciones sobre DES's van en aumento, puesto que estos solventes han despertado interés para aplicaciones en una amplia gama de áreas, como la energía, metalurgia, separaciones y extracciones, electroquímica, biotecnología, farmacéutica, biomédica, síntesis de materiales, nanomateriales y biomoléculas, genómica, catálisis química y biocatálisis, entre otras (121,130,131,133,136).

1.6.2.2. Fundamentos de los DES's

Un DES es la mezcla eutéctica de dos o más compuestos generalmente sólidos, de un coste asequible, seguros y capaces de asociarse entre sí mediante puentes de hidrógeno. Estas mezclas eutécticas suelen ser líquidas a temperatura ambiente y además se caracterizan por un punto de congelación notoriamente menor que el de sus componentes (130). Estos sistemas formados a partir de una mezcla eutéctica de ácidos y bases de Lewis o Brønsted, pueden contener una variedad de especies aniónicas y/o catiónicas, de ahí su capacidad de formar puentes de hidrógeno (128).

La mezcla eutéctica está compuesta por un aceptor de enlaces de hidrógeno (en adelante HBA del inglés *Hydrogen Bond Aceptor*) y un donante de enlace de hidrógeno (en adelante HBD del inglés *Hydrogen Bond Donnor*). Entre las moléculas HBA y HBD existen fuertes interacciones no enlazantes, como dipolos, enlaces de hidrógeno, interacciones alquilo-alquilo, enlaces o puentes de halógeno y fuerzas de Van der Waals, que conducen a un descenso marcado del punto de fusión e inhiben el proceso de cristalización (128,135,137). En 2014 Smith y colaboradores (128): describieron los DES mediante una fórmula general mostrada en la siguiente ecuación:

Ecuación 1.1:



donde “Cat⁺” es el catión orgánico (típicamente sales de amonio, fosfonio o sulfonio), “X⁻” es el contraión de la base de Lewis (generalmente aniones haluro como el Cl⁻) o también llamado HBA, “Y⁻” se refiere a un ácido de Lewis o Brønsted también llamado HBD, que participa en la formación del complejo aniónico con X⁻ (como la urea), y “z” se refiere al número de moléculas de HBD (128,133).

En función de sus componentes los DES se pueden clasificar en 5 tipos, el último incluido recientemente. El tipo I (sal cuaternaria y haluro o cloruro metálico), tipo II (sal cuaternaria y haluro metálico hidratado), tipo III (sal cuaternaria y HBA), tipo IV (haluro metálico y HBD) y tipo V (HBA’s y HBD’s no iónicos y moleculares) (121,128,133,138,139). En la Tabla 1.2, se muestran las ecuaciones de los tipos de DES.

Tabla 1.2. Clasificación de los DES y sus fórmulas (128,133).

| Tipo | Formula general* | Donde: |
|------|---|--|
| I | $Cat^+ X^- zMCl_x$ | M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In |
| II | $Cat^+ X^- zMCl_x yH_2O$ | M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe |
| III | $Cat^+ + X^- zRZ$ | Z = CONH ₂ , COOH, OH |
| IV | $MCl_x + RZ = MCl_{x-1} + RZ + MCl_{x+1}$ | M = Al, Zn y Z = CONH ₂ , OH, COOH OH |
| V | No iónico | Compuesto sólo por sustancias moleculares |

*Cat⁺, X, Y han sido definidas en la ecuación 1.

Esta clasificación se puede decir que está en constante actualización debido a la necesidad de incluir los tipos emergentes y no convencionales de DES que van siendo sintetizados (135).

Los DES’s tipo I y II se consideran hidrofílicos, lo que tiene algunas desventajas como la interacción y solubilidad significativa del DES en el agua (140). Dado que el agua modifica las propiedades estructurales de los DES, al aumentar la solubilidad en el agua las interacciones entre sus componentes se debilitan (140–142). Este es uno de los motivos por los cuales los científicos centran cada vez más su atención en DES’s hidrofóbicos, como lo son los tipos III y IV, ya que son estables en medio acuoso (140,143). En los DES’s tipo III, el HBA suele ser una sal de haluro iónica (127,133,140), la más usada es el ChCl por su bajo coste, biodisponibilidad y toxicidad y alta biodegradabilidad (133).

Los HBA pueden dividirse en dos categorías basadas en compuestos iónicos (sales de amonio cuaternario/fósforo o tetraalquilo) y en compuestos no iónicos (por ejemplo, monoterpénos) (140). Entre los más comunes como se muestra en la Figura 1.8, se encuentran las sales de amonio y de fosfonio. También hay moléculas terpenoides como el alcanfor y algunos aminoácidos o sus derivados como la betaína, glicina e histidina (Figura 1.8 y Tabla 1.3).

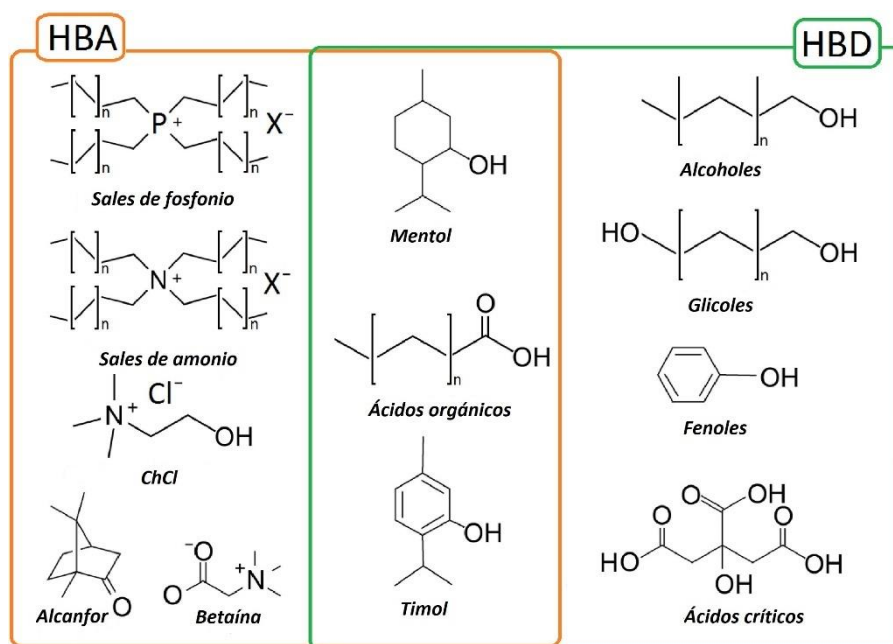


Figura 1.8. Estructuras típicas de aceptores y donantes de enlaces de hidrógeno (HBA y HBD) utilizados para la preparación de DES. Copyright © 2019 Patrycja Makoś, Edyta Słupek and Jacek Gębicki. Published by Elsevier B.V.(140).

Dentro de los HBD más populares se incluyen fenoles, ácidos carboxílicos, alcoholes y glicoles. Sin embargo, algunos de ellos pueden ser tanto donantes como aceptores de enlaces de hidrógeno (140). Algunos de los nombres de los compuestos HBA y HBD descritos en la bibliografía se muestran en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. HBA y HBD referidos en bibliografía (84,120,127,128,130,131,133,136,144).

| HBA's | HBD's | |
|----------------------------------|-----------------|--------------------|
| Acetato de colina | 1,1-dimetilurea | Ácido oxálico |
| Ácido de nicotínico | 1,3-dimetilurea | Ácido p-cumárico |
| Alanina | 1,4 Butanodiol | Ácido subérico |
| Betaína | 1-2-Propanodiol | Ácido succínico |
| Bromuro de metiltrifenilfosfonio | 1-metilurea | Ácido tartárico |
| Bromuro de tetrabutilamonio | 1-Naftol | Ácido tricarbálico |

| | | |
|---|--------------------|--------------------|
| Bromuro de tetrabutilfosfonio | Acetamida | Benzamida |
| Cloruro de (fenilmetil) trifenilfosfonio | Ácido adípico | Dietilenglicol |
| Cloruro de acetilcolina (AChCl) | Ácido benzoico | D-Isosorbida |
| Cloruro de bencildimetil (2-hidroxi)etil - amonio | Ácido cafeico | D-sorbitol |
| Cloruro de Clorocolina (ClChCl) | Ácido cinámico | Etilenglicol |
| Cloruro de colina (ChCl) | Ácido cítrico | Etilurea |
| Cloruro de etil (2-hidroxi)etil dimetilamonio | Ácido decanoico | Fenol |
| Cloruro de etilamonio | Ácido dodecanoico | Fructosa |
| Cloruro de tetrabutilamonio | Ácido estearico | Glicerol |
| Cloruro de tetraetilamonio | Ácido fenilacético | Glucosa |
| Cloruro de tetrametilamonio | Ácido gálico | Imidazol |
| Cloruro de trimetilamonio | Ácido glicólico | Mentol |
| D-L mentol | Ácido hexanoico | N-metilacetamida |
| Fluoruro de colina | Ácido itacónico | Propilurea |
| Glicina | Ácido láctico | Succionanitrilo |
| Histidina | Ácido levunílico | Timol |
| Lidocaína | Ácido linoleico | Trifluoroacetamida |
| Nitrato de colina | Ácido málico | Triurea |
| Prolina | Ácido malónico | Urea |
| Timol | Ácido oleico | Xilitol |

Debido a la variedad y la posibilidad de combinaciones HBA's y HBD's, la posibilidad de distintos DES's es extremadamente alta y pese al volumen de publicaciones aún no han sido totalmente reportadas ni sintetizadas (131).

Una de las características de los DES's es tener el punto de fusión más bajo que el de sus compuestos originales. Esto es debido a su estructura química, ya que contiene iones grandes y no simétricos con una energía de red baja lo que se traduce en bajos puntos de fusión. La síntesis de un DES que usualmente se da por la complejación de la sal de amonio cuaternario (HBA) con la sal metálica (HBD), genera la deslocalización de la carga que se produce a través del enlace de hidrógeno. Por ejemplo entre un ion haluro (HBA) y la fracción HBD, esto se traduce en la disminución de los puntos de fusión del DES en comparación con sus componentes individuales (128).

Los DES's poseen mayores ventajas con respecto a los solventes tradicionales, dadas por sus propiedades fisicoquímicas que se pueden resumir en: bajo punto de fusión, baja volatilidad y toxicidad, alta estabilidad térmica y química, capacidad de disolver diferentes tipos de compuestos (orgánicos, inorgánicos y poliméricos), viscosidad variable, bajo poder de corrosión, acción catalítica, solubilidad en agua, presión de vapor mínima, baja inflamabilidad, capacidad

de reciclamiento, facilidad de síntesis, biodegradabilidad y bajo coste (de acuerdo a su procedencia) en comparación con los solventes orgánicos tradicionales (118,127,128,130).

1.6.2.3. Propiedades físico-químicas de los DES's

Las propiedades fisicoquímicas de los DES's como el comportamiento de fase, densidad, viscosidad, conductividad, tensión superficial, capacidad de absorción de agua y polaridad (127,128) muy importantes a la hora de determinar los posibles usos.

- **Comportamiento de fase**

Para definir un DES es de gran ayuda conocer los diagramas de equilibrio sólido-líquido (ESL) de los compuestos. Los DES's se forman a partir de la mezcla de los compuestos que lo conforman en la relación molar correcta (entre HBD y HBA), de la que se obtiene una mezcla líquida eutéctica a temperatura ambiente. El punto eutéctico es la temperatura mínima a la cual se puede fundir una mezcla (generalmente dos sólidos), los cuales poseen una composición molar establecida. De esta manera en una mezcla eutéctica los compuestos se hacen mutuamente compatibles y se reduce drásticamente el punto de fusión de la mezcla (hasta en 150 °C) y su punto de congelación en comparación con sus componentes puros individuales o el esperado para una fase líquida ideal (128,130,137,145,146). La alta desviación de la idealidad, debido a la formación de redes de enlaces de hidrógeno fuertes y muy complejas entre sus componentes individuales (principalmente los formados entre HBA y el HBD) son lo más importante en la formación de los DES's (144,145). La fuerza de estos enlaces de hidrógeno afecta directamente a la temperatura de transición de fase del solvente, su estabilidad y sus propiedades fisicoquímicas y termodinámicas (144,145). En la Figura 1.9 se muestran un esquema del diagrama ESL, el punto eutéctico y la depresión del punto de congelación para un DES.

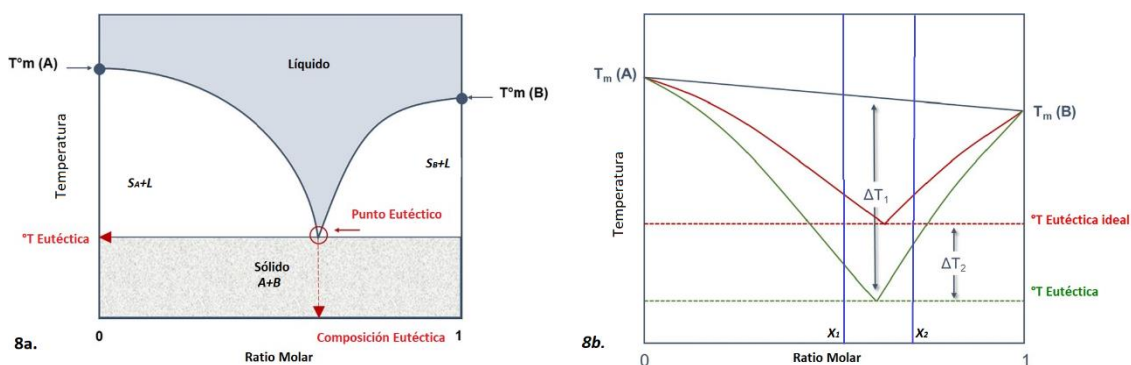


Figura 1.9. a. Diagrama general de fase sólido-líquido de una mezcla binaria de compuestos A y B, $T_m(A)$ y $T_m(B)$ representan las temperaturas de fusión respectivamente. El punto eutéctico representa la composición y la temperatura mínima de fusión. **b.** Diagrama de fase sólido-líquido

que representa una mezcla eutéctica ideal simple (línea roja) y una mezcla eutéctica profunda (línea verde). ΔT representa la depresión del punto de congelación considerada (127). Adaptada de El Achkar y colaboradores 2021 Copyright © 2021, Springer Nature Switzerland.

En el diagrama de la Figura 1.9.a. la intercalación de A en B (o viceversa) frustra las tendencias naturales de cristalización del otro componente, y las mezclas resultantes experimentan una depresión observable en el punto de fusión. Representar eutéctico como la temperatura mínima de fusión donde se encuentran las curvas de ambos compuestos componentes (Temperatura eutéctica ideal) corresponde a la definición tradicional de los DES's manifestada por muchos autores (128,137,147–149). No todos los autores están de acuerdo con esta definición (127,129,150–152), por lo cual se han desarrollado otra que se explica en la Figura 1.9.b. La definición de Martins y colaboradores (150) manifiestan que las mezclas eutécticas profundas siguen esta misma tendencia general (Figura 1.9.a.), pero presentan depresiones inesperadamente profundas como se muestra en la Figura 1.9.b. (136,150). La depresión de temperatura se define como la diferencia (ΔT_2) entre el punto ideal ($^{\circ}T$ Eutéctica ideal) y punto eutéctico profundo ($^{\circ}T$ Eutéctica) (139,150). Además, la depresión de temperatura debe ser tal que la mezcla sea líquida para un determinado rango de composición (entre x_1 y x_2) (129,150). En este punto aún hay diferencias entre algunos autores que consideran que se debe utilizar ΔT_1 (temperatura eutéctica ideal) para definir un DES, lo que se vería reflejado en la Figura 1.9.a. Pero para Martins y colaboradores (150) si se utiliza ΔT_1 como definición de un DES, abarcaría cualquier mezcla de compuestos con excepción de los que presentan soluciones sólidas completas o forman compuestos intermedios estables con puntos de fusión comparables a los de los precursores puros. La ventaja de una definición basada en ΔT_2 es que es más restrictiva, otorga el calificativo de "profundo" y es más sólida desde el punto de vista teórico, ya que permite establecer relaciones directas con él. Los equilibrios de las fases se forman dependiendo de sus componentes y se comportan diferente según los tipos de DES's (128).

- **Densidad**

La densidad (d), propiedad que expresa la relación existente entre la masa (m) de una sustancia y su volumen (v), es una de las propiedades más importantes de los DES's. Responde a la ecuación $d=m/v$ y usualmente se mide en magnitudes como g/cm^3 o Kg/m^3 . El valor de esta propiedad depende del tipo de sal, la elección del donante de enlace de hidrógeno (HBD) y la relación molar entre HBA y HBD. El aumento del número de grupos funcionales -OH en el HBD da lugar a la formación de más enlaces de hidrógeno, lo que disminuye el volumen libre disponible (tamaño de los huecos en el líquido), que se evidencia con el aumento de la viscosidad

y por ende la densidad. (127,128,136,138). La densidad de los DES's también está influenciada por la temperatura, de manera que disminuye linealmente con el aumento de esta, esto ha sido demostrado experimentalmente por diversos estudios (136). La densidad es una de las propiedades que influye de manera directa en el uso de los DES's como solvente.

- **Viscosidad**

Esta importante propiedad de los líquidos describe la resistencia del líquido al flujo y deformación y está relacionada con la fricción interna en el líquido. Hay dos tipos de viscosidad: la dinámica y la cinemática. La viscosidad dinámica (μ) o viscosidad absoluta es la relación entre el gradiente de velocidad y el esfuerzo cortante. La viscosidad cinemática está relacionada con la densidad del fluido y hace referencia a la oposición del fluido a dejarse cortar por la fuerza de la gravedad, lo que se obtiene con el cociente entre la viscosidad dinámica (μ) y la densidad (d). Esta propiedad es dependiente de la temperatura (a mayor temperatura, menor viscosidad) y en el Sistema Internacional se mide en pascales-segundo (Pa s) pero la unidad más utilizada es centipoises (cP) (donde 1 cPs = 1 mPa s).

La viscosidad es una de las propiedades que suele generar problemas para los solventes, puesto que las altas viscosidades tienen efectos perjudiciales en la transferencia de masa, las velocidades de reacción y la manipulación de los procesos (116). Si bien algunos DES's presentan viscosidades más bajas que los compuestos que los componen (como el glicerol), es un tema que aún está en estudio. Se ha demostrado que el uso de cosolventes como el agua, o el cambio de las proporciones molares de los componentes podrían ser las formas más fáciles de superar el problema ya que funcionan muy bien para reducir las altas viscosidades (116,135). La viscosidad está muy relacionada con la temperatura, puesto que las fuerzas de cohesión intermoleculares que contribuyen a la viscosidad del líquido son reguladas por la temperatura, a medida que la temperatura aumenta la viscosidad disminuye (146). La viscosidad de un DES se ve afectada además, por la naturaleza de sus componentes, su proporción molar y el contenido de agua (127,137,138,146). Las viscosidades reportadas por los DES's pueden ser muy bajas (como 19 cP) o muy altas (85.000 cP) a temperatura ambiente, pero las más deseables para el su uso como solvente son las más bajas (130).

- **Conductividad (σ)**

Esta propiedad física expresa la capacidad de un cuerpo de conducir calor o electricidad. Está determinada por la presencia de iones (cationes o aniones), su concentración, movilidad,

valencia y de la temperatura de la medición. En el laboratorio es medida como la resistencia en ohmios o megaohmios. La conductividad es el inverso de la resistencia específica, y se expresa en micromho por centímetro ($\mu\text{mho/cm}$), equivalentes a Siemens por centímetro (S/cm) o a microsiemens por centímetro ($\mu\text{S/cm}$) o milisiemens por centímetro (mS/cm) en el Sistema Internacional de Unidades.

En los DES's además de la relación entre la viscosidad y la temperatura, se ha demostrado que la conductividad eléctrica de los DES's también depende de la temperatura (128). A medida que aumenta la energía cinética, la conductividad de los DES's puede aumentar significativamente y la viscosidad disminuye (127,130,146). La mayoría de los DES's tienden a tener conductividades iónicas pobres ($< 2 \text{ mS cm}^{-1}$ a temperatura ambiente) (127,130). Además de la temperatura, la relación molar aceptor de enlace de hidrógeno/donante de enlace de hidrógeno, la naturaleza tanto de la sal orgánica como del donante de enlace de hidrógeno, así como el anión de la sal y la adición de agua influyen en la conductividad (127,128,130,138,146).

- **Tensión superficial**

La tensión superficial es una propiedad de los líquidos que surge por las fuerzas que actúan cohesionando las moléculas de los líquidos. Los líquidos con alta tensión superficial no se ven atraídos por otros materiales con los que están en contacto y suelen tener alta viscosidad. Hasta ahora hay pocos estudios relacionados con esta propiedad, pero es muy importante ya que depende en gran medida de la intensidad de las fuerzas intermoleculares que tienen lugar entre el donante de enlaces de hidrógeno y la sal correspondiente. Las redes extensas de enlaces de hidrógeno son reflejadas en tensiones superficiales mayores en los DES's. Además, la tensión superficial está influenciada por la fracción molar de la sal y el tipo de catión, ya que un grupo hidroxilo adicional o una cadena alquílica más larga en la sal de amonio cuaternario conduce a mayores tensiones superficiales (127).

- **Efecto del Agua**

El efecto del agua en los DES's es muy importante ya que no solo permite mejorar sus características, sino que también puede perjudicar la integridad del solvente (127,151). Los DES's están formados por iones y moléculas coordinados y con enlaces de hidrógeno, lo que los hace fuertemente miscibles en agua e higroscópicos (141). El agua influye en muchas de las propiedades fisicoquímicas como el punto de fusión, densidad, viscosidad, conductividad, tensión superficial y polaridad (116,127,135,141). Dada la presencia del agua en casi todos los sistemas y la higroscopia de los DES's, la absorción de agua por parte de estos es inevitable (127,143,153) y puede llegar a cambiar sus características.

- **Polaridad**

La polaridad refleja la capacidad de solvatación o solubilización, cuanto mayores son las atracciones intermoleculares, mayor es la polaridad (127,146). La espectroscopia de fluorescencia UV-vis es una herramienta importante para medir y comprender la polaridad del microambiente, la estructura, las interacciones y la solvatación dentro de los DES's (136). La polaridad de un DES puede evaluarse mediante su escala de polaridad, en la que se mide la ET que es la energía de transición electrónica de un colorante de sondeo en un DES. Utilizando el colorante orgánico, se mide el desplazamiento hipocrómico (azul) o baticrómico (rojo) de las bandas UV-vis (127,130,146). Las escalas no son universales, hay distintos colorantes y escalas como las de Dimroth y Reichardt y la escala multiparamétrica de Kamlet y Taf (127,146). La naturaleza iónica y la polaridad relativamente alta de los DES's hacen que muchas especies iónicas, como las sales metálicas, muestren una alta solubilidad (128).

1.6.3. Aplicaciones de los DES's

Las aplicaciones de los DES's como solventes son diversas ya que poseen muchas características y propiedades que les dan ventaja frente a los demás solventes. Además, también son químicamente sintonizables, lo que significa que pueden diseñarse para aplicaciones específicas dada la amplia variedad de compuestos que pueden formarlos (127).

1.6.3.1. Extracción de compuestos

La capacidad de los DES's de extraer la gran variedad de compuestos (como fosfolípidos, proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos, los más reportados), depende en gran medida de las propiedades físico-químicas, especialmente de la polaridad, la cual se puede ajustar en función de la naturaleza del compuesto a extraer (127). A partir de BML de distintos sustratos (residuos de paja, maíz, trigo, madera, papel, palma de aceite, etc.) se pueden extraer celulosa, hemicelulosa, lignina, xilano y demás compuestos de interés industrial (121,152,154,155). También se ha reportado la extracción de hidrocarburos policíclicos aromáticos y distintos compuestos fenólicos que se usan en la producción de fibras, plásticos, medicamentos, preservantes, pesticidas, explosivos, etc. (146,155). Compuestos biofuncionales también pueden ser extraídos a partir de subproductos de origen animal, entre ellos proteínas, flavonoides, polifenoles, AGPI, entre otros (119,152).

1.6.3.2. Aplicaciones biomédicas

Algunos DES's pueden formar sistemas eutécticos con compuestos medicinales (fármacos), por lo que pueden ser una alternativa a algunos de los excipientes más utilizados (146). Pese a ser

una aplicación que apenas está emergiendo, los DES's representan una alternativa más segura y biocompatible a los solventes orgánicos para la solubilización de ingredientes farmacéuticos (poco solubles en agua). Se han reportado prometedores resultados en la solubilización de diferentes clases de fármacos (como antiinflamatorios no esteroideos, antifúngicos, anestésicos y analgésicos) utilizando principalmente mezclas eutécticas basadas en ChCl (133).

1.6.3.3. Almacenamiento de energía

La vida moderna y el uso de las nuevas tecnologías han incrementado la demanda de estrategias y materiales que mejoren las tecnologías de almacenamiento y conversión de energía. Algunos DES's poseen la estabilidad electroquímica y características favorables para ser un posible remplazo a los electrolitos utilizados en las baterías de iones de litio (136). Las baterías de flujo redox y las células solares sensibilizadas por colorantes son otras formas de almacenamiento de energía emergentes para las que los DES's también están siendo investigados (136).

1.6.3.4. Aplicaciones metalúrgicas

Algunos DES's han demostrado tener ventajas para este tipo de aplicaciones por la alta solubilidad de las sales metálicas y los metales (128,136), la ausencia de agua y la alta conductividad en comparación con los disolventes no acuosos y su costo en comparación con los IL's (128). Las principales aplicaciones son la galvanoplastia o deposición de metales (incorporación de iones metálicos en solución), extracción, reciclaje y/o procesamiento de metales en solución (disolución, refinado de minerales) (128,136). Los procesos que se llevan a cabo con los DES's incorporan los métodos de recuperación, purificación, fundición, aleación y revestimiento para producir materiales útiles a partir de fuentes tanto crudas como recicladas (136). La doble función de las mezclas eutécticas, como solvente y cocatalizador, junto con su fácil reciclabilidad, observada en las transformaciones mediadas por metales de transición y ácidos, podría permitir mejorar muchos procesos industriales en términos de eficiencia y sostenibilidad (133).

1.6.3.5. Purificación y fabricación de biodiésel

La síntesis enzimática de biodiésel a partir de aceites usando como solventes DES's a partir de ChCl ha sido ampliamente investigada (128). Debido a su alta polaridad, algunos DES's han sido usados para la eliminación del glicerol del biodiésel crudo, estos procesos de purificación se llevan a cabo usando también la ayuda de enzimas (130,136).

1.6.3.6. Biotransformaciones

Una biotransformación es una modificación química realizada por un organismo (o enzima) sobre un compuesto químico y es vital para nuestra supervivencia, puesto que permite al cuerpo transformar los nutrientes absorbidos (alimentos, oxígeno, etc.) en sustancias que necesitamos para funcionar(128). Este tipo de procesos se suele llevar a cabo en solventes acuosos u orgánicos, pero los DES's son una excelente alternativa. Los solventes orgánicos disuelven las enzimas, pero los DES's no, estos se pueden utilizar como cosolvente con agua para ayudar a los sustratos no polares (orgánicos) a disolverse en una solución acuosa, como segunda fase en una mezcla de agua y DES, o como sustituto no volátil del solvente no acuoso (128). La catálisis en presencia de DES's como pretratamiento o como solvente, ha demostrado que puede tener porcentajes mayores de rendimiento o mejorar la calidad del producto en algunos casos prácticos estudiados (152).

1.6.3.7. Nanopartículas

Se han realizado investigaciones sobre la heterogeneidad y la microestructura de los DES's, para comprender la estructura y el comportamiento de los materiales a escalas de longitud relevantes y poder utilizar estos solventes en la nanotecnología (136) Los DES's son ventajosos para la preparación de nanomateriales, por su alta viscosidad y a su elevada fuerza iónica, pueden utilizarse como solventes ecológicos para el crecimiento de nanopartículas funcionales con morfologías y estructuras especiales (129). La síntesis de nanopartículas de forma controlada son claves en aplicaciones como los electrocatalizadores, los sensores electroquímicos, las baterías de aire y las pilas de combustibles (128).

Los DES's se han usado como solvente para la síntesis controlada de nanopartículas metálicas, esta es una de las novedades en las aplicaciones en la ciencia de los electrocatalizadores (129). También se han utilizado como dispersantes en la formación de nanopartículas y otros nanocompuestos, aunque aún el desarrollo es poco (136). También pueden participar en las reacciones químicas y actuar como reactivos para preparar materiales de almacenamiento de energía de alto rendimiento (como el carbono dopado con heteroátomos y los compuestos basados en metales de transición) (129).

1.6.3.8. Otras aplicaciones

El uso de los DES's continua en aumento y tienen muchas otras aplicaciones, como en la adsorción de gases (CO₂), en transformaciones de azúcares no protegidos, celulosa y almidón, uso como aditivos funcionales, monómeros, entre otras (116,128,131). Otra aplicación está en la

síntesis ionotérmica, donde los DES's se han usado como plantillas orgánicas para preparar nuevos materiales inorgánicos como zeolitas, fosfatos de metales de transición u óxidos (128). Sin lugar a dudas el listado de usos de los DES's se irá ampliando a medida que se van sintetizando y descubriendo nuevos DES's a partir de compuestos no reportados.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Dar un valor agregado a los residuos agroalimentarios (biomasa lignocelulósica y Sandach) desarrollando procedimientos de extracción y/o síntesis, con la que se obtengan compuestos con potencial uso industrial enmarcados dentro de la economía circular.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar y desarrollar técnicas de extracción de aceite de hígado de rape (AHR) con solventes tradicionales y solventes verdes y determinar el perfil lipídico de los aceites obtenidos.
- Utilizar tecnologías informáticas de simulación y predicción para el estudio de solventes verdes en la extracción de AHR.
- Aplicar procesos biocatalíticos al AHR con diferentes variables (biocatalizador, tiempo, etapas del proceso) y analizar los ésteres etílicos por su perfil lipídico.
- Utilizar derivados del de glicerol para la síntesis y caracterización de NUEVOS compuestos como el Cloruro de 1,3 (bis)trietilamonio-2-propanol y el Cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol.
- Sintetizar, caracterizar y escalar NUEVOS solventes eutécticos (DES's) a partir de los nuevos compuestos sintetizados.
- Escalar los nuevos DES's sintetizados y determinar algunas de sus propiedades físico químicas.
- Realizar un estudio teórico para investigar las capacidades de algunos de los DES's sintetizados para el fraccionamiento de biomasa lignocelulósica (BML), usando herramientas informáticas avanzadas de simulación y predicción como el programa COSMO-RS.
- Evaluar y contrastar los resultados teóricos obtenidos para algunos de los DES's sintetizados con ensayos experimentales donde se realice fraccionamiento de BML.

3. APROVECHAMIENTO DEL HÍGADO DE RAPE

3.1. ANTECEDENTES

Los subproductos animales son la materia prima para obtener muchos compuestos con potencial interés industrial (75). Los subproductos de pescado tienen mayor importancia como fuente de hidrolizados proteicos, colágeno, gelatina, quitosano, condroitín sulfato, harinas, aceites, ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), ácido hialurónico y escualeno, entre otros (69,75). Estos compuestos son usados en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (75). Por su parte, el perfil de ácidos grasos (AG) del pescado marino (ya sea azul o blanco), contiene un alto porcentaje de AGPI, principalmente los conocidos como omega-3. Esto es debido a que los omega-3 son sintetizados por las microalgas y llegan a los peces a través de la cadena alimentaria (78). Numerosos estudios científicos han demostrado los beneficios para la salud de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), en particular de los omega-3 (79,80,83–88). Los principales ácidos grasos omega-3 son el ácido α -linolénico (ALA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). Sus efectos benéficos se han demostrado principalmente sobre las enfermedades cardiovasculares (ECV) (79,80), pero también se han descrito efectos beneficiosos en diversas enfermedades como la diabetes (83), las enfermedades del sistema inmunitario (84) y el cáncer (85,86). Asimismo, se ha encontrado una interacción positiva incluso en enfermedades como el TEA (87) y enfermedades neuronales como el Alzheimer (88). De aquí deriva la importancia de incluir los ácidos grasos omega-3 como ingredientes nutracéuticos en los productos alimentarios funcionales y en la farmacia (106). Según los datos de Apromar sobre la acuicultura y la pesca en España 2019 (156), la UE consumió 13 millones de toneladas de productos acuáticos en 2018. Dependiendo del tipo de producto marino se genera un volumen de subproductos que pueden llegar hasta el 60% del volumen total del producto pescado, muchos de los cuales son desechados. La búsqueda de fuentes económicas y sostenibles de AGPI en el marco de la economía circular, muestra que es posible uso de estos subproductos marinos (vísceras, cabezas, etc.). Uno de los subproductos de la industria pesquera es el hígado de rape, que pese a tener un importante valor culinario en algunos restaurantes como plato gourmet, en la gran mayoría de los casos suele considerarse un subproducto no útil y se desecha con el resto de las vísceras (157–159). El rape, un pescado blanco, contiene un 30 % de aceite, cuyo perfil de ácidos grasos muestra la presencia de DHA, EPA, ácido gadoleico y oleico (77,160). Por este motivo se ha estudiado este subproducto para ver su potencial como fuente de AGPI, determinando un proceso de extracción limpio dentro del marco de la economía circular. Para la extracción, usualmente se usan solventes orgánicos (COV's) que son inflamables, volátiles y

tóxicos (161). El método Folch (FM) es uno de los más comunes y utiliza una mezcla de cloroformo y metanol (2:1p/p) para extraer la muestra. Realizar procesos de extracción con solventes más respetuosos con el medio ambiente (o también llamados solventes verdes), que son menos contaminantes que los solventes tradicionales, es una prioridad para la economía circular (77,162,163). Para que un solvente sea verde debe cumplir 12 criterios. Entre los más destacables esta, el proceder de materias primas renovables, ser reciclable mediante tratamientos ecoeficientes, presentar propiedades similares a las de los disolventes comunes, tener un punto de ebullición alto y una presión de vapor baja y una biodegradabilidad mejorada en condiciones ambientales normales, etc. Algunos solventes de base biológica, pueden considerarse solventes verdes, como es el caso del 2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF), ciclopentil metil éter (CPME), dimetil carbonato (DMC) y limoneno (LMN), que pueden dimitir producirse a partir de biomasa (162). Estudiar el comportamiento de estos solventes en procesos de extracción es necesario si buscamos hacer procesos productivos eficientes, donde se maximicen los recursos y minimicen los residuos (164,165). Las nuevas tecnologías informáticas como los softwares predictivos, permiten el ahorro de tiempo y recursos de investigación. El programa COSMO-RS puede utilizarse como ayuda para predecir las interacciones de los solventes con los solutos a extraer (132,162,166).

3.2. MATERIALES

3.2.1. Reactivos

Cloroformo (CCl_3) (99 %), 2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF), cloroformo-d (CDCl_3) (99,9 % D), sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), ácido oleico (90 %), hidrógeno fosfato de potasio (K_2HPO_4) y sulfato de magnesio (MgSO_4) se adquirieron en *Sigma-Aldrich* (España). El ciclopentil metil éter (CPME) (99 %) se adquirió de Zeon Corporation (Japón). El carbonato de dimetilo (DMC) (99 %), hexano (grado HPLC) y limoneno (LMN) (96 %) se compraron a *Acros Organics* (EE.UU.). El etanol absoluto se compró a Scharlau (España). El metanol se compró a *Fisher Scientific* (España). Los medios de cultivo agar patata dextrosa (PDA) y extracto de levadura (EY) fueron proporcionados por Scharlau Microbiología (España). La lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym 435) fue una muestra obsequiada por Novozymes A/S (Dinamarca). Las cepas de hongos usados en la biocatálisis están en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de España, bajo los códigos: *Rhizopus oryzae* (CECT20476) y *Aspergillus flavus* (CECT20475.2.1). El hígado de rape fue donado por Congelados y Especialidades Barrufet SL (España) y el aceite de girasol se compró en el mercado. Los patrones para los análisis de GC-MS y CG-FID, de ésteres metílicos de ácidos grasos

(FAMES de sus siglas en inglés *Fatty Acid Metil Esters*), el éster etílico del ácido oleico (EE-AO) (98 %) y éster etílico del ácido docosahexaenoico (EE-DHA) (98 %) se adquirieron de *Sigma-Aldrich* (EE. UU.). Para la cromatografía en capa fina (CCF) se usaron placas de 0,20 mm de sílica gel 60 de *Millipore Corporation* (Alemania) y de sílica gel 60/UV₂₅₄ Alugram^R de *Macherey-Nagel* (Alemania).

3.2.2. Equipos

El hígado de rape se trituró con un Minipimer Taurus Bapi 600 (España). Las pruebas de actividad enzimática se llevaron a cabo en un “thermomixer confort” de Eppendorf AG (Alemania). Para la extracción del aceite de hígado de rape (AHR) se ensayaron dos procedimientos, uno empleando un agitador-mezclador rotatorio Roller Labnet II de Labnet (EE.UU.) y otro usando un disruptor celular Ultra Turrax[®] de IKA[®] (España). Para las pruebas de biocatálisis se usó una incubadora Labnet 211DS (España). Para el proceso de secado con N₂, se usó un módulo de temperatura PIERCE (EE.UU.) y la unidad de evaporación Thermo Scientific Reacti-Vap[™] de Fisher (EE.UU.). La caracterización de las muestras obtenidas se realizó mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en un equipo MERCURY plus de 400 MHz (EE.UU.). La determinación del perfil lipídico de las muestras se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent (España) con detector de ionización de llama (FID) y columna cromatográfica capilar de sílice fundida de 30 m × 0,25 mm recubierto con una película de 0,25 µm de espesor de (50 %-cianopropil)-metilpolisiloxano DB-23 de Agilent (España). Se usaron las tecnologías informáticas y computacionales, como el programa COSMO-RS para los estudios predictivos de solubilidad, programas de dibujo (ChemDraw, ChemSketch, etc) para la elaboración de las imágenes moleculares y programas para el análisis de los datos obtenidos por los diferentes equipos (Spectra manager, Mestrenova, GC-FID, etc).

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Estudio Teórico de solubilidad con programa COSMO-RS

Se realizó un estudio teórico para encontrar el mejor solvente para la extracción del AHR, mediante el método computacional predictivo desarrollado por COSMO-RS del inglés *Conductor-like Screening Model for Real Solvents*. Con este programa se consideraron las propiedades técnicas de los solventes, determinando su posible capacidad de extracción de AHR. Luego se compararon los resultados teóricos obtenidos con el COSMO-RS con los datos obtenidos experimentalmente. La comparación se realizó teniendo en cuenta la cantidad de AHR extraído y los parámetros técnicos de los disolventes utilizados.

Procedimiento COSMO-RS

COSMO-RS fue desarrollado por Klamt y colaboradores (30) y es conocido como un potente método de descripción molecular y de selección de solventes basado en el resultado de cálculos químicos y físicos para comprender el mecanismo de disolución de un sistema. COSMO-RS combina consideraciones de química cuántica (COSMO) y la estadística termodinámica (RS) para determinar y predecir las propiedades termodinámicas sin necesidad de datos experimentales.

En el primer paso, el dibujo de la molécula (compuesto a extraer) se introduce en un conductor virtual. En ese entorno, la molécula induce una carga de polarización en su superficie (σ -superficie). A continuación, se puede realizar el cálculo para cada molécula de interés (molécula del solvente a usar). El segundo paso utiliza el cálculo termodinámico estadístico donde se relacionan las variables de los compuestos. La termodinámica de las interacciones moleculares que se basan en el "perfil obtenido" se utilizan para calcular el potencial químico del segmento superficial (σ -potencial) en las otras moléculas (77,132,163,167).

Las estructuras químicas de los disolventes y los solutos se transformaron mutuamente en sus notaciones de sintaxis de entrada de líneas moleculares simplificadas (SMILES), que se utilizaron posteriormente para calcular los parámetros de solubilidad de los disolventes y los compuestos. La solubilidad relativa se calcula a partir de la siguiente Ecuación 3.1 (28,30).

ECUACION 3.1

$$\log_{10}(x_j) = \log_{10}[\exp((\mu_j^{puro} - \mu_j^{Solvente} - \Delta G_{j,fusión})/RT)]$$

Donde:

μ_j^{puro} : potencial químico del compuesto puro j (J/mol); $\mu_j^{Solvente}$: potencial químico de j a dilución infinita (J/mol); $\Delta G_{j,fusión}$: energía libre de fusión de j (J/mol); x_j : solubilidad de j (g/g solvente); R : constante de los gases; T : temperatura (°K).

La solubilidad relativa se calcula siempre en dilución infinita. El logaritmo de la mejor solubilidad se fija en 0 y todos los demás disolventes se dan en relación con el mejor disolvente. Un disolvente con un valor $\log_{10}(x_j)$ de -1,00 produce una solubilidad que se reduce en un factor 10 en comparación con el mejor disolvente. Además, el logaritmo se transformó en la probabilidad de solubilidad y se expresó en porcentaje.

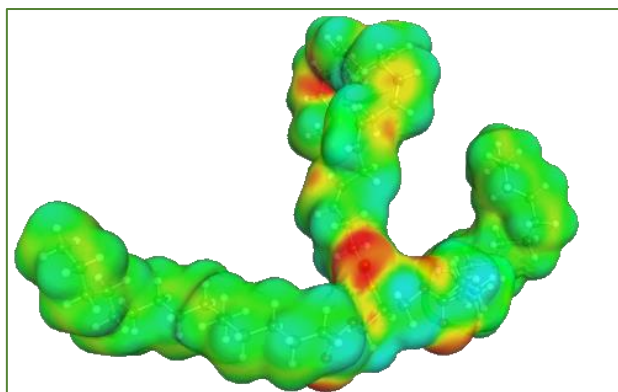


Figura 3.1. Molécula de un triacilglicérido (TAG) usada para el estudio teórico, compuesto por R1(C16:0); R2 (C22:6); R3 (C16:0)) graficada en el software COSMO RS.

En la Figura 3.1 se muestra una de las moléculas utilizadas en el estudio, el color azul representa las regiones polares fuertemente positivas y el color rojo muestra las superficies polares muy negativas. Los colores verde y amarillo corresponden a polaridades más bajas.

3.3.2. Extracción de aceite de hígado de rape (AHR)

3.3.2.1. Sistema mezclador-agitador rotatorio (Roller-Mixer, RM).

El AHR se extrajo con el método Folch (en adelante MF). Que consiste en extracción sólido-líquido con reactivo Folch (en adelante RF), una mezcla de cloroformo-metanol 2:1 v/v. A parte de este solvente de referencia se usaron cuatro solventes considerados solventes verdes (2-MeTHF, DMC, CPME y LMN). Una cantidad de 20 g de hígado de rape previamente descongelado, triturado y homogenizado, se extrajo con 100 mL de cada solvente (proporción 1:5 m/v). La mezcla se agitó a 60 rpm durante 30 min en un RM. La muestra se filtró a través de papel filtro y el residuo sólido se lavó dos veces con el correspondiente solvente. Se unieron los disolventes de lavado y se les añadió una solución de NaCl al 1 % v/v, se agitó enérgicamente la mezcla y se dejó reposar durante 2 h. Se recuperó la fase orgánica y se secó con sulfato sódico anhidro, luego este se filtró y se lavó con cloroformo. Las soluciones finales (solvente más aceite extraído) se evaporaron al vacío en un evaporador rotatorio. El aceite obtenido se secó al vacío durante 2 h como mínimo, se pesó (g) y finalmente se almaceno a -20 °C hasta su análisis. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. El porcentaje de rendimiento de las reacciones se determinó con el peso del aceite extraído en gramos dividido entre el peso del hígado sometido al tratamiento por cien para llevarlo al porcentaje. Este porcentaje de AHR, fue comparado con el contenido máximo de AHR. El contenido máximo de AHR, se determinó con una prueba de

extracción con el RF hasta agotamiento (hasta que no se observó color en el solvente, más de 5 repeticiones del tratamiento para cada muestra), por triplicado. El porcentaje de aceite obtenido, fue la referencia de la cantidad máxima de aceite contenida en el hígado de rape (39 %). El montaje utilizado se muestra en la Figura 3.2.

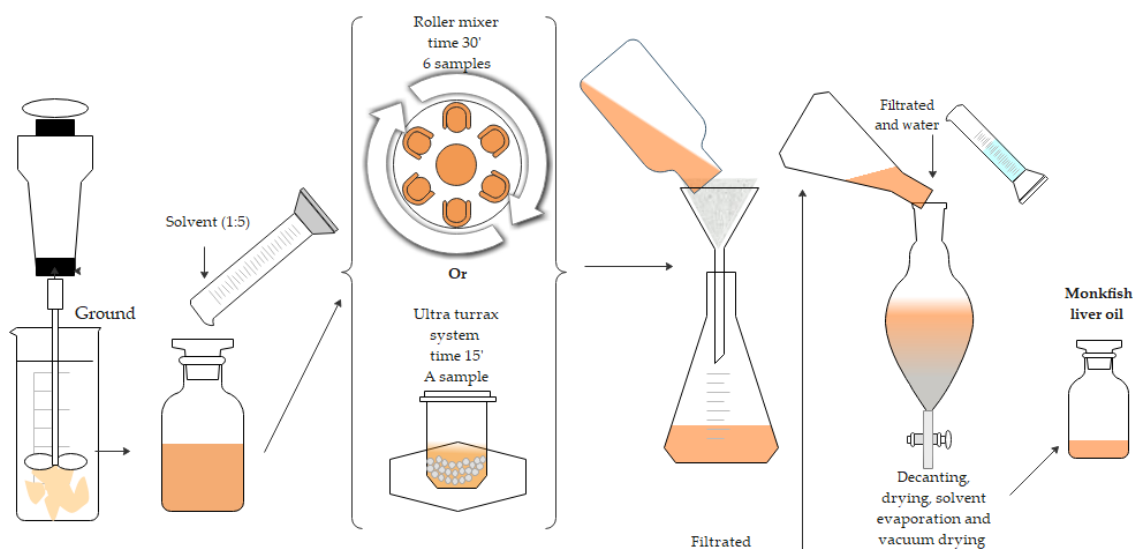


Figura 3.2. Procedimiento general para la extracción de aceite de hígado de rape utilizando dos sistemas: RM y Ultra-Turrax® (UT) (77).

Cada una de las muestras obtenidas de AHR fueron caracterizados y cuantificados mediante las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) respectivamente.

3.3.2.2. Extracción en un sistema Ultra-Turrax®(UT).

En un tubo del sistema UT se añadieron 2 g de hígado de rape triturado, 2 g de bolas de cerámica y 10 mL del correspondiente solvente. Se usaron los mismos solventes que en la prueba con el anterior método de agitación. La mezcla se agitó mecánicamente a 4000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se filtró y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min para separar el sobrenadante. La fase orgánica se recuperó y se secó con sulfato sódico anhidro. La mezcla se filtró y el disolvente se evaporó en un rotavapor. El aceite obtenido se secó al vacío y se pesó. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Los rendimientos de reacción se calcularon igual que para el otro sistema de agitación. Todos los experimentos se

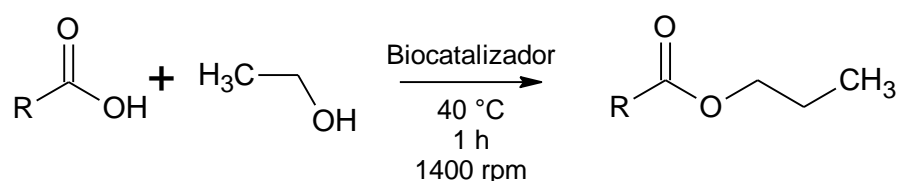
realizaron por duplicado y el montaje utilizado se muestra en la Figura 3.2. Todos los ensayos realizados fueron caracterizados y cuantificados mediante las RMN y GC-FID respectivamente.

3.3.3. Preparación de los biocatalizadores

El método de preparación de los biocatalizadores (células en reposo o *resting cells*) y medición de la actividad enzimática se realizó de acuerdo a los procedimientos reportados en la bibliografía con algunas modificaciones (168,169). Las cepas de *R. oryzae* y *A. flavus* se cultivaron en un medio líquido sintético que contenía 2 g de asparagina, 1 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de $MgSO_4$, 5 mg de clorhidrato de tiamina, 1,45 mg de $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, 0,88 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0,235 mg de $MnSO_4 \cdot H_2O$ por litro de agua destilada. El pH inicial del medio se ajustó a pH 6,0. A continuación, alícuotas de 250 mL del medio se esterilizaron a 121 °C durante 15 min. Posteriormente se añadió asépticamente un 1 % (v/v) de aceite de girasol refinado. El medio se inoculó con 2,5 mL de una suspensión de esporas de *R. oryzae* y *A. flavus* ($1-4 \times 10^6$ esporas/mL) y luego se incubó a 28 °C durante 5 días utilizando un agitador orbital a 200 rpm. El micelio se cosechó del medio de cultivo utilizando un embudo Buchner y se lavó con agua destilada seguido de acetona. A continuación, se secó al vacío durante 18 h y se molió hasta obtener un polvo. Las cepas de *R. oryzae* (CECT20476) y *A. flavus* (CECT20475.2.1) se encuentran en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

3.3.3.1. Pruebas de actividad enzimática

Las *resting cells* de *R. oryzae* y *A. flavus* fueron usadas como catalizadores en la esterificación según el esquema (Figura 3.3). Una mezcla en proporción 1:1 p/p de ácido oleico y etanol se añadió en un vial de reacción (5 mL) que contenía 10 % de biocatalizador (p/p en función del ácido oleico). Se dejó reaccionar en el minimixer (Condiciones: 1 h., 40 °C, agitación 1400 rpm). Pasado el tiempo de la reacción se analizaron las muestras por RMN y se cuantificó el oleato de etilo obtenido.



R: ácido oleico

Figura 3.3 Reacción de esterificación con ácido oleico, para la medición de la actividad enzimática de las *resting cells* de *R. oryzae* y *A. flavus*.

Las unidades de actividad enzimática (U) se determinaron a partir de la tasa de esterificación enzimática de ácido oleico y etanol para obtener oleato de etilo en μmol por minuto ($\mu\text{mol}/\text{min}$).

Para los cálculos matemáticos se relacionó el valor de la integral de los espectros ^1H -RMN para protones del ácido oleico y del oleato de etilo, determinando la fracción de cada uno de estos. Con estos datos, los pesos moleculares y la masa de micelio utilizada se determinó la actividad enzimática (U) expresada como $\mu\text{mol}/\text{min}$ (Ecuación 3.2).

ECUACIÓN 3.2:

$$U\left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}\right) = \frac{EOE\mu\text{mol}}{60(\text{min})} = \frac{mMi \frac{\%EOE}{100}}{mEOE \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)} * 1000000$$

Donde:

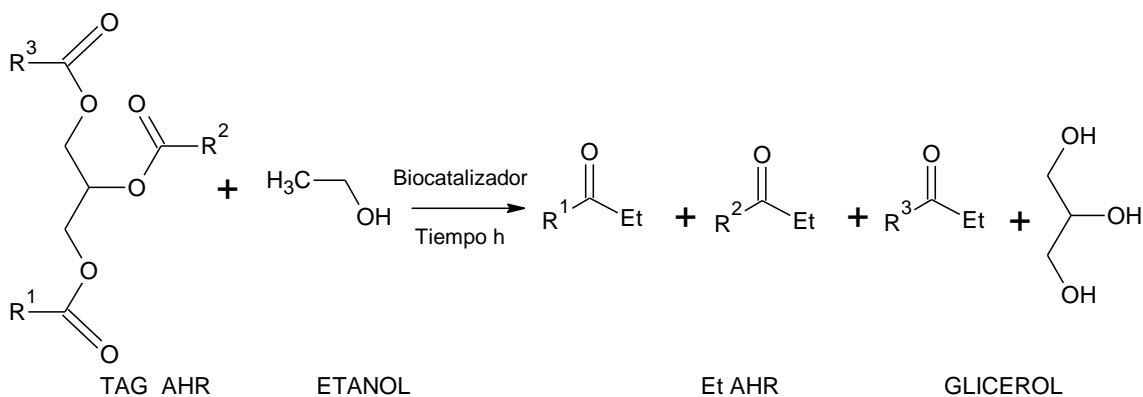
m: masa en g; EOE: Oleato de etilo, Mi: micelio

3.3.4. Esterificación por biocatálisis del aceite de hígado de rape (AHR).

3.3.4.1. Esterificación directa del AHR (Reacción en una sola etapa).

Una mezcla 1:3,2 de aceite de hígado de rape (0,453 g; 0,5 mmol) y etanol (0,0736 g; 1,6 mmol) se añadió a un vial de reacción (5 mL) provisto de un tapón revestido de politetrafluoroetileno (PTFE). El vial contenía 0,045 g de biocatalizador (10 % p/p basado en el peso del AHR). Los biocatalizadores utilizados fueron una enzima comercial (Novozym 435) o *resting cells* fúngicas (*R. oryzae* y *A. flavus*) o dos mezclas de *resting cells* (1:1 y 7:3, *R. oryzae*-*A. flavus*), respectivamente (Figura 3.4). La mezcla se agitó (220 rpm) continuamente a presión atmosférica y a 28 °C. Se evaluó el progreso de la reacción durante 24, 48 y 74 h. Se recogieron las muestras, se filtraron, se evaporó el disolvente y se pesaron. Una alícuota de 20 mg del crudo de reacción se disolvió en CDCl_3 y la solución resultante se analizó por RMN, donde se identificaron las señales correspondientes a la presencia de EE. Los rendimientos de la reacción de esterificación, se determinaron a través de cálculos matemáticos que relacionaron los valores de las áreas integradas en las RMN correspondientes a las distintas señales características, para los ácidos grasos libres (AGL) y los ésteres. Luego este resultado se corrigió multiplicando por el porcentaje de rendimiento en peso y así obtener el porcentaje real de esterificación. Los porcentajes de

rendimiento en peso, se calcularon dividiendo el peso final obtenido del éster etílico del AHR (EE AHR), entre la suma de los pesos iniciales (AHR+etanol). Los experimentos se realizaron por triplicado.



R: ácidos grasos componentes del AHR (R¹, R², R³...etc)

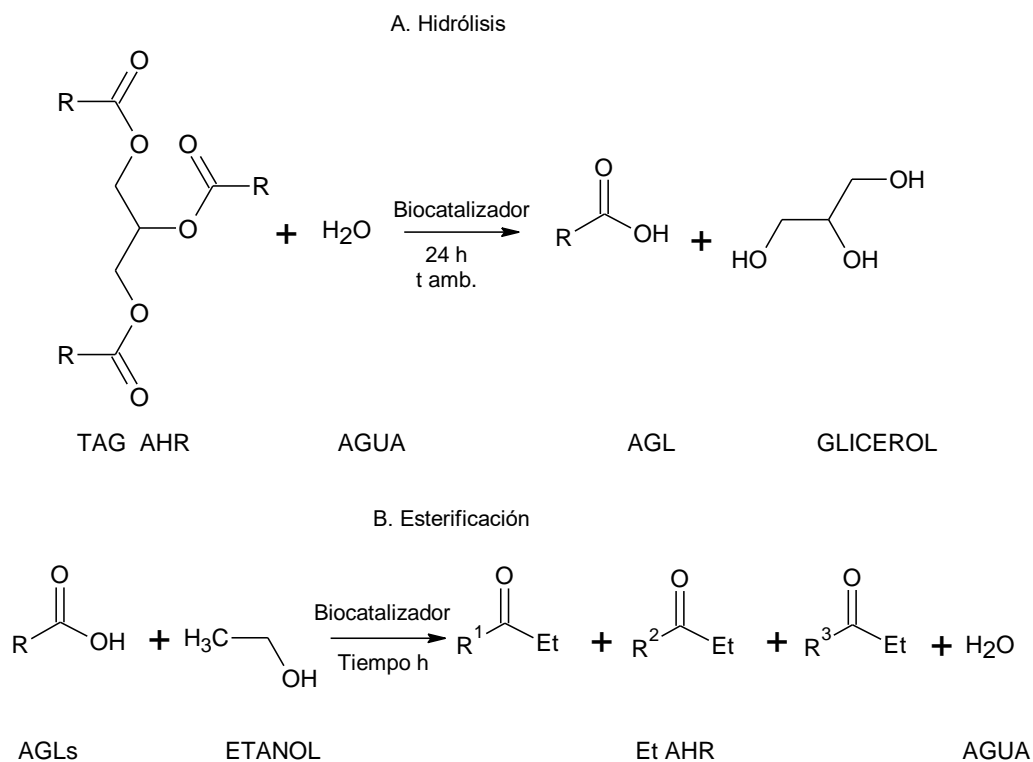
Et: Éster etílico del ácido graso

Por ejemplo: R¹: C18:1n9 ; R²: C20:5n3 ; R³: C16:0

Figura 3.4. Esquema de la síntesis de ésteres etílicos en la reacción de transesterificación en un paso (77).

3.3.4.2. Hidrólisis y esterificación del aceite de hígado de rape (AHR) (Reacción en dos etapas).

Este método de esterificación consistió en la aplicación de dos etapas. El primer paso se realizaron reacciones de hidrólisis biocatalizadas utilizando la enzima comercial, las dos *resting cells* fúngicas y sus mezclas (1:1 y 7:3, *R. oryzae* / *A. flavus*) y en el segundo paso la esterificación a mediante biocatálisis con los mismos biocatalizadores. La reacción en 2 etapas se esquematiza en la Figura 3.5.



R: ácidos grasos componentes del AHR (R¹, R², R³...etc.)
 Por ejemplo: R¹: C18:1n9 ; R²: C20:5n3 ; R³: C16:0

Et: Éster etílico del ácido graso

Figura 3.5. Esquema de la síntesis de ésteres etílicos en la reacción en dos pasos (A. hidrólisis B. reacción de esterificación) (77).

Para la hidrólisis, se agitó una mezcla de AHR (0,453 g; 0,5 mmol), biocatalizador (0,045 g; 10 % p/p basado en el peso del AHR) y agua (0,453 g; 25 mmol) a 28 °C durante 24 h. La muestra se filtró, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. Obteniendo el material hidrolizado de hígado de rape (MHHR). Los ensayos con su respectivo MHHR se analizaron por RMN y GC-FID y se determinó cuál de estos ensayos ofrecía los mejores resultados en cuanto a porcentaje de ácidos grasos libres (AGL). El procesamiento de las RMN consistió en determinar las señales que podían indicar presencia de AGL, TAG, Di acilglicérido (DAG) o mono acilglicérido (MAG) y la relación entre las señales correspondientes a los EE. Con las señales correspondientes a los AGL y los EEAHR, y una relación matemática de estas se calculó el porcentaje de AGL del MHHR. El biocatalizador que mostró el mayor rendimiento de ácidos libres se utilizó para escalar la hidrólisis, todo ello con el objetivo de obtener un volumen de hidrolizado suficiente para realizar los estudios de esterificación. El hidrolizado obtenido en el escalado se analizó mediante RMN y GC-FID para determinar el grado de hidrólisis y el perfil de ácidos grasos.

En el segundo paso, el aceite hidrolizado se utilizó para realizar las reacciones de esterificación utilizando los mismos biocatalizadores indicados anteriormente. Una mezcla de aceite de hígado de rape hidrolizado (0,300 g; 1 mmol), biocatalizador (0,03 g, 10 % p/p basado en el peso del aceite de hígado de rape hidrolizado) y etanol (0,147 g; 3,2 mmol) se agitó (220 rpm) a 28 °C. Las reacciones de esterificación se llevaron a cabo durante 24, 48 o 72 h. Los productos de reacción se analizaron mediante RMN y GC-FID. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los rendimientos de la esterificación en dos pasos se determinaron de manera similar a los de la esterificación en un paso.

3.3.5. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los análisis preliminares del AHR obtenido, MHHR y de los ésteres etílicos (EE) se llevaron a cabo mediante RMN. 20 mg (para ^1H) a 70 mg (para ^{13}C) de muestra fueron diluidos en 0,5 mL CDCl_3 . Los espectros se registraron con un espectrómetro de RMN MERCURY de 400 MHz.

3.3.6. Cromatografía en capa fina (CCF)

Las muestras diluidas de AHR y MHHR Y EE de AHR se analizaron mediante cromatografía de capa fina. Como eluyente se usó la mezcla de hexano/acetato de etilo en distintas concentraciones (8:2 - 7:3 - 6:4 v/v), además en todos los casos se utilizaron 0,2 mL de ácido acético. Como fase estacionaria se usaron placas de CCF de silica gel con soporte de aluminio. Se aplicó 0,1 mL de muestra que se desarrollaron en el sistema de solventes antes mencionado. Las placas se revelaron con H_2SO_4 al 5 % en metanol y calor, algunas fueron llevadas a la cámara oscura a 214 y 312 nm. Se usaron como patrones EE o ácido graso (AG).

3.3.7. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas CG-MS y Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)

Los perfiles de ácidos grasos del AHR y de los ésteres tras las reacciones de síntesis se analizaron con un cromatógrafo de gases Agilent acoplado a un detector de ionización de llama (GC-FID) con columna cromatográfica DB-23. El programa de temperatura utilizado fue de 180 °C durante 1 min, seguido de un aumento de 20 °C min^{-1} hasta alcanzar la temperatura final de 270 °C, que se mantuvo durante 20 min. Se aplicó un "splitless" de 20 mL/min durante 15 s. Se utilizó hidrógeno como gas portador a una presión constante. El volumen de inyección fue de 1 μL . El

sistema de inyección se mantuvo a 270 °C y el FID a 280 °C. El procesamiento de los datos se realizó con el programa Spectra Manager. Con ayuda de los patrones (estándares para identificación de ácidos grasos y algunos ésteres etílicos), se identificaron todas las señales correspondientes obtenidas por las muestras de hígado de rape (aceite, material hidrolizado, material esterificado). Las áreas de cada una de las señales fueron integradas y sumadas para tener un total de área correspondiente a 100 %, posteriormente se determinó el porcentaje al que equivaldría cada una de las señales (porcentaje de cada ácido graso). De esta manera se obtuvo el perfil lipídico de las muestras.

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Extracción y caracterización del aceite de hígado de rape (AHR)

La determinación del contenido máximo de aceite en el hígado de rape se realizó mediante la extracción de aceite hasta el agotamiento. Para ello se utilizó el sistema sólido-líquido empleando el solvente RF. A partir del hígado de rape fresco (49,8 % de humedad) se extrajo como máximo un 39,0 % p/p de aceite. El porcentaje de aceite en el hígado de rape es mayor al reportado para el hígado de otras especies marinas, lo que confirma el potencial que tiene este subproducto como materia prima para obtener productos de alto valor añadido. Este valor es más alto que el porcentaje reportado para el hígado de atún con un 17,5 % de aceite (170) o de los subproductos del salmón (cabeza, armazón y vísceras) con un contenido de aceite que va del 13,1 al 19,2 % (171). Ciriminna y colaboradores (172) informaron de un contenido de aceite del 1,5 % a partir de cabezas de anchoa. El AHR extraído se analizó mediante ¹H-RMN (Figura 3.6) y GC-FID (Figura 3.7).

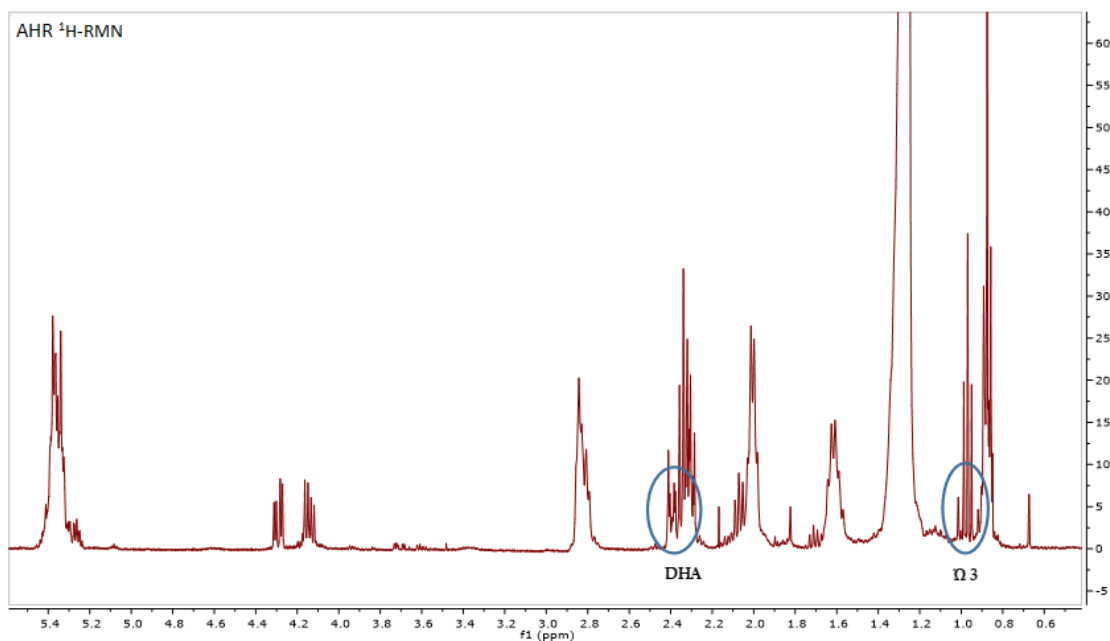


Figura 3.6. Espectro ^1H -RMN del aceite de hígado de rape extraído por el método Folch (FM) y con agitación RM con las señales DHA y $\omega 3$ según Néstor y colaboradores (77,173).

El espectro ^1H -RMN del AHR mostró señales entre 0,99 y 1,1 ppm indicativas de la presencia de los ácidos grasos omega-3. Además, también se observaron otras señales compatibles con la presencia de ácidos grasos poliinsaturados, monoinsaturados y saturados (AGPI's, AGMI's y AGS's, respectivamente). Estas señales coinciden con las observadas por Catrin y colaboradores (174) y Bratu y colaboradores (175) que determinaron la presencia de ácidos grasos omega-3 en el aceite de pescado. También se observaron señales específicas de DHA a 2,4 ppm correspondientes al hidrógeno unido al carbono α ($=\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{COOR}$) y al carbono alilo ($=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOR}$) (173).

En la Figura 3.7 se muestra el cromatograma (GC-FID) del AHR esterificado químicamente (derivatizado). El AHR se derivatizó para tener una referencia más exacta de la composición total de ácidos grasos y usarla como referencia. También se analizaron por GC-FID todas las muestras de los aceites extraídos con los solventes verdes, que presentaron un perfil lipídico similar. La identificación y cuantificación de los ácidos grasos se realizó según lo descrito en métodos.

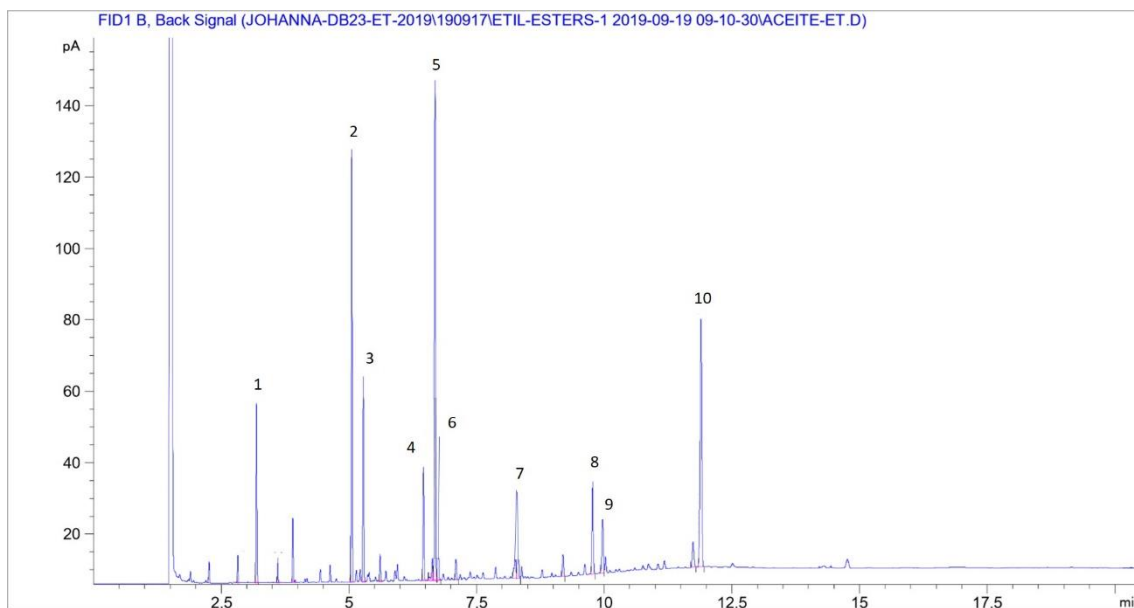


Figura 3.7. Cromatograma (GC-FID en DB-23, 30 m) del aceite de hígado de rape químicamente esterificado. La asignación e identificación de los picos corresponde a los ésteres etílicos de ácidos grasos (EE-AG) 1: mirístico, 2: palmítico, 3: palmitoleico, 4: esteárico, 5: oleico, 6: vaccénico, 7: gadoleico, 8: EPA, 9: behémico, 10: DHA. Los estándares utilizados fueron los ésteres del ácido palmítico, esteárico y oleico. El tratamiento de los datos se realizó según el método FAAES. (77).

El perfil de ácidos grasos del AHR derivatizado, se determinó mediante la identificación de las señales con ayuda de los patrones usados (FAMES, EE-AO y EE-DHA). El AHR contiene un variado e interesante perfil lipídico conformado por un 29,8 % de AGS's, un 43,7 % de AGMI's y un 26,5 % de AGPI's, como se observa tanto en la figura anterior como en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Perfil de ácidos grasos del AHR determinado por GC-FID en porcentaje (n=3). (77).

| Nombre | Abreviatura común | % Ácido graso |
|--|-------------------|---------------|
| Ácidos Grasos Saturados (AGS's) | | |
| <i>Cáprico</i> | C10:0 | 0,2 ± 0,3 |
| <i>Láurico</i> | C12:0 | 0,3 ± 0,4 |
| <i>Mirístico</i> | C14:0 | 1,9 ± 3,3 |
| <i>Palmítico</i> | C16:0 | 15,6 ± 0,8 |
| <i>Margárico</i> | C17:0 | 1,1 ± 0,1 |
| <i>Esteárico</i> | C18:0 | 4,2 ± 0,1 |
| <i>Araquídico (eicosanoico)</i> | C20:0 | 1,3 ± 0,2 |
| <i>Behémico</i> | C22:0 | 3,5 ± 0,5 |
| <i>Lignocérico</i> | C24:0 | 1,7 ± 0,2 |
| | ΣAGSs | 29,8 |

| Ácidos Grasos Monoinsaturados (AGMI's) | | |
|---|---------------|--------------|
| Miristoleico | C14:1n5 | 0,7 ± 0,4 |
| cis-10-Pentadecanoico | C15:1n5 | 0,5 ± 0,3 |
| Palmitelaídico | C16:1n7t | 0,4 ± 0,0 |
| Palmitoleico | C16:1n7c | 7,1 ± 0,2 |
| cis-10-Heptadecenoico | C17:1n7 | 0,4 ± 0,1 |
| Elaídico | C18:1n9t | 1,1 ± 0,1 |
| Oleico | C18:1n9c | 21,1 ± 0,5 |
| Vaccénico | C18:1n7 | 5,4 ± 0,3 |
| Gadoleico | C20:1n11 | 3,9 ± 0,8 |
| Erúcico | C22:1n9 | 0,7 ± 0,1 |
| Nervónico | C24:1n9 | 0,8 ± 0,0 |
| | ΣAGPIs | 43,7 |
| Ácidos Grasos Polinsaturados (AGPI's) | | |
| cis-9,12-Hexadecadienoico | C16:2n4 | 0,5 ± 0,1 |
| cis-6,9,12-Hexadecatrienoico | C16:3n4 | 0,2 ± 0,1 |
| Linoelaidico | C18:2n6t | 0,3 ± 0,1 |
| Linoleico | C18:2n6c | 1,0 ± 0,1 |
| α-Linolénico | C18:3 n3 | 0,2 ± 0,1 |
| γ-Linoénico | C18:3n6 | 0,4 ± 0,0 |
| Estearidónico | C18:4n3 | 0,6 ± 0,1 |
| cis-11,14-Eicosadienoico | C20:2n6 | 0,5 ± 0,1 |
| cis-11,14,17-Eicosatrienoico | C20:3n3 | 0,4 ± 0,1 |
| all cis-8,11,14-Eicosatrienoico | C20:3n6 | 0,1 ± 0,1 |
| Araquidónico | C20:4n6 | 1,1 ± 0,1 |
| Juniperónico | C20:4n3 | 0,6 ± 0,1 |
| Eicosapentanoico (EPA) | C20:5n3 | 4,4 ± 0,3 |
| cis-13,16-Docosadienoico | C22:2n6 | 0,2 ± 0,1 |
| Adrénico | C22:4n6 | 0,3 ± 0,0 |
| Clupanodónico | C22:5n3 | 0,5 ± 0,0 |
| Docosahexaenoico (DHA) | C22:6n3 | 15,2 ± 0,2 |
| | ΣAGPIs | 26, 5 |

Los ácidos grasos mayoritarios en el AHR corresponden a AGMI's como el ácido oleico. Este ácido graso, que compone el 21,1 % del AHR, ha demostrado tener efectos beneficiosos para la salud humana similares a los ácidos grasos omega-3 (176). La presencia de un 5,4 % de ácido vaccénico (isómero omega-7 del ácido oleico), es relevante debido a su asociación con un bajo riesgo de enfermedad cardiovascular (177,178). Otros AGMI's presentes son el ácido gadoleico (C20:1n9), característico de los aceites de pescado, y el ácido erúcico (C22:1n9), que también se ha informado que se encuentra en el hígado de pescado (170,179). De los AGS's del hígado de rape, podemos decir que el componente mayoritario es el ácido palmítico con un 15 %. Los AGS's no tienen muy buena reputación frente a la salud cardiovascular (SCV). Sin embargo, el porcentaje

de ácido palmítico es menor a los porcentajes de este ácido reportados en otros subproductos o residuos de pescado que oscila entre el 18 y 32 % (180,181). Respecto a los AGPI's, el DHA y el EPA son los principales del AHR con un 15,2 % y un 4,4 % del total respectivamente. Los AGPI's como el DHA y el EPA, característicos de las fuentes marinas, son de amplio interés principalmente por ser del grupo de ácidos omega-3. Estos ácidos grasos tienen reportados múltiples beneficios para la salud (77,78,80,106,174).

Tanto el aceite extraído así los productos de las biocatálisis, se analizaron de cualitativamente con CCF con una fase móvil hexano y acetato de etilo en diferentes proporciones (80:20 y 70:30 v/v), solvente apolar típicamente usado para las lograr separaciones de lípidos con CCF (182). De esta manera se identificaron los tipos de lípidos que aparecieron en función de su polaridad en las muestras (según el tipo de muestra). Lo primero identificarse (de abajo hacia arriba) fueron los MAG, seguidos de 1,2 DAG, 1,3 DAG y luego los AGL, posteriormente se vio el TAG y el EE. Esto concuerda con lo reportado por Byun y colaboradores (183) para aceite de coproductos de pescado.

3.4.2. Simulación teórica de extracción mediante el programa COSMO-RS

Se llevó a cabo una simulación con el programa informático COSMO-RS para determinar la solubilidad relativa de cuatro de los principales triacilgliceroles (TAG's) del AHR en los solventes seleccionados para el estudio (CPME, LMN, DMC, 2-MeTHF y mezcla de disolventes del FR (Cloroformo/Metanol, 2:1)). El análisis del AHR por ¹H-RMN permitió determinar que los TAG's eran los principales lípidos presentes en el aceite de pescado y cuales podrían ser los principales ácidos grasos presentes en este aceite (Figura 3.7). Además, el análisis GC-FID confirmó que estos TAG's estaban compuestos principalmente por cadenas largas de carbono, como el ácido palmítico (C16:0), el ácido oleico (C18:1n9), el EPA (C20:5n3) y el DHA (C22:6n3) (Figura 2.8). Por tanto, se utilizaron los cuatro ácidos grasos principales del aceite para definir cuatro estructuras teóricas de TAG:

- TAG-1(R1 (C16:0); R2 (C22:6n3); R3 (C16:0))
- TAG-2 (R1 (C18:1n9); R2 (C20:5n3); R3 (C16:0))
- TAG-3 (R1 (C18:1n9); R2 (C22: 6n3); R3 (C18:1n9))
- TAG-4 (R1 (C22:6n3); R2 (C22:6n3); R3 (C22:6n3))

Estos componentes principales se modelaron con el software ChemSketch y se utilizaron para el estudio predictivo en el software COSMO-RS (Figura 3.8).

COSMO-RS integra un enfoque de química cuántica que permite el cálculo de varias propiedades, como la solubilidad relativa de un compuesto en varios disolventes. Esto significa que el análisis del perfil σ y del potencial σ de los componentes de la mezcla (TAG's y solventes) proporciona información importante sobre las moléculas. Esta información puede utilizarse para predecir posibles interacciones en la fase fluida.

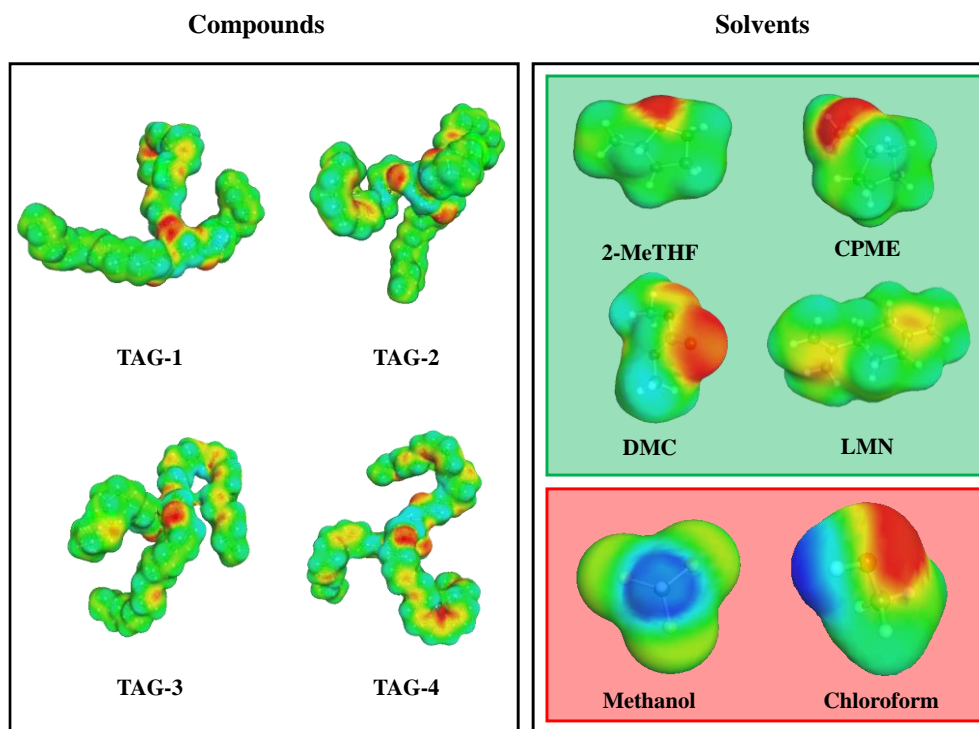


Figura 3.8. Modelización de las α -superficies por COSMO-RS de los compuestos y disolventes utilizados en el estudio teórico. Compuestos (TGA's): TAG-1(R1 (C16:0); R2 (C22:6n3); R3 (C16:0)); TAG-2 (R1 (C18:1n9); R2 (C20:5n3); R3 (C16:0)); TAG-3 (R1 (C18:1n9); R2 (C22:6n3); R3 (C18:1n9)); TAG-4 (R1 (C22:6n3); R2 (C22:6n3); R3 (C22:6n3)). Solventes verdes (fondo color verde): (2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF), ciclopentil metil éter (CPME), dimetil carbonato (DMC) y limoneno (LMN)). Solventes de referencia (fondo color rojo): (reactivo Folch (FR), cloroformo/metanol (2:1, v/v)) (77).

Los resultados de la modelación del programa se observan en la Tabla 3.2. donde se muestra la solubilidad determinada por el modelo COSMO-RS para los TAG's elegidos del AHR en los solventes utilizados en este estudio. La solubilidad se expresa en $\log_{10}(x_{\text{solub}})$ y se ha expresado también la probabilidad en porcentaje. A la mejor solubilidad se le asigna un valor de 0, y la solubilidad en el resto de solventes se da en relación con el mejor solvente. La tabla con los resultados arrojados por el programa se encuentra en la sección anexos (Tabla A2). Esta se

ha expresado en porcentaje de probabilidad de solubilidad para una mejor comprensión de los resultados.

Tabla 3.2. Solubilidad relativa calculada mediante el programa COSMO-RS ($\log_{10}(x_{\text{solub}})$) y probabilidad de solubilidad de los triacilglicéridos (TAG's) modelados como representativos del aceite de hígado de rape, en cuatro diferentes solventes verdes y FR como solvente de referencia (77).

| Solvente | TAG 1 | | TAG 2 | | TAG 3 | | TAG 4 | |
|----------|--|--------|-------------------------------|--------|-------------------------------|--------|-------------------------------|--------|
| | $\log_{10}(x_{\text{solub}})$ | P (%) | $\log_{10}(x_{\text{solub}})$ | P (%) | $\log_{10}(x_{\text{solub}})$ | P (%) | $\log_{10}(x_{\text{solub}})$ | P (%) |
| 2-MeTHF | 0,0000 | 100,00 | 0,0000 | 100,00 | 0,0000 | 100,00 | 0,0000 | 100,00 |
| CPME | 0,0000 | 100,00 | 0,0000 | 100,00 | 0,0000 | 100,00 | 0,0000 | 100,00 |
| DMC | -0,9721 | 10,66 | -0,8726 | 13,41 | -0,6799 | 20,90 | 0,0000 | 100,00 |
| LMN | 0,0000 | 100,00 | 0,0000 | 100,00 | 0,0000 | 100,00 | 0,0000 | 100,00 |
| FR | -1,7547 | 1,76 | -1,5751 | 2,66 | -1,4406 | 3,63 | 0,0000 | 100,00 |
| Donde | P = probabilidad Color verde: alta probabilidad de solubilidad (60-100 %). Color amarillo: probabilidad media de solubilidad (20-60%). Color rojo: baja probabilidad de solubilidad (0-20 %). Compuestos (triacilglicéridos): TAG-1(R1 (C16:0); R2 (C22:6n3); R3 (C16:0)); TAG-2 (R1 (C18:1n9); R2 (C20: 5n3); R3 (C16:0)); TAG-3 (R1 (C18:1n9); R2 (C22:6n3); R3 (C18:1n9)); TAG-4 (R1 (C22:6n3); R2 (C22:6n3), R3 (C22:6n3)). Disolventes verdes (2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF), ciclopentil metil éter (CPME), dimetil carbonato (DMC) y limoneno (LMN)). Solvente de referencia (reactivo Folch (FR), cloroformo/metanol (2:1, v/v)). | | | | | | | |

El solvente utilizado como referencia fue el RF, que se considera el método más fiable para la recuperación completa de los lípidos totales (184). Como se observa en la Tabla 3.2, el 2-MeTHF, CPME y LMN mostraron una mayor probabilidad de solubilidad (60-100 %) que el solvente de referencia (FR) para los TAG-1, TAG -2, TAG-3 y similar para TAG-4. El DMC presentó un comportamiento diferente mostrando una baja probabilidad de solubilidad (0-21 %) para tres de los cuatro TAG's (TAG-1, TAG -2, TAG-3) modelizados. Pero para el TAG-4 el DMC mostró un mejor porcentaje de solubilidad que el RF.

Estos resultados teóricos fueron contrastados con el estudio experimental, en el que utilizando los cuatro solventes seleccionados (2-MeTHF, CPME, DMC y LMN) se extrajo AHR, para verificar cual podía tener potencial para sustituir al solvente RF en la extracción de lípidos procedentes de este subproducto.

3.4.3. Extracción de aceite de hígado de rape utilizando el mezclador-agitador rotatorio (RM) o el Ultra-Turrax®(UT).

Se probaron dos equipos distintos de agitación para extraer el aceite del hígado del rape, sumados a diferentes solventes. La Tabla 3.3 resume resultados de rendimiento de extracción obtenidos con los diferentes solventes y los dos sistemas de agitación (RM y UT). También muestra los resultados de referencia (*) correspondientes a la cantidad máxima de aceite contenido en el hígado de rape. Los solventes utilizados corresponden a un éster (DMC), dos éteres (2-MeTHF y CPME) y un terpeno (LMN) que según las guías de solventes son menos contaminantes que el RF que es una mezcla de metanol y cloroformo (1:2 v/v) (112,113,117). Los valores de rendimiento de la extracción de aceite de la Tabla 3.3, fueron determinados de los resultados promedio de las extracciones realizadas. La unidad de medida expresada en g/100 g se describe así puesto que es la manera más usada, la relación se hace usando el porcentaje obtenido de extracción aplicado a 100.

Tabla 3.3. Extracción de aceite de hígado de rape con cuatro solventes verdes y un solvente convencional (RF) utilizando dos sistemas de agitación (media \pm desviaciones estándar (s.d.), n=2) (77).

| <i>Solvente</i> | Mezclador-agitador rotatorio (RM) | | ULTRA-TURRAX® (UT) | |
|---|---|--|---|--|
| | Rendimiento de la extracción de aceite (g/ 100 g) | Rendimiento de la extracción de aceite (%) | Rendimiento de la extracción de aceite (g/ 100 g) | Rendimiento de la extracción de aceite (%) |
| <i>Referencia*</i> | 39,0 | 100 | 39,0 | 100 |
| <i>2-MeTHF</i> | 39,0 \pm 0,9 | 100 \pm 3,0 | 33,9 \pm 1,5 | 87,0 \pm 22 |
| <i>CPME</i> | 39,0 \pm 2,4 | 100 \pm 0,7 | 39,0 \pm 0,3 | 100 \pm 2,2 |
| <i>DMC</i> | 38,6 \pm 1,9 | 99,0 \pm 0,4 | 29,3 \pm 0,2 | 75,0 \pm 5,0 |
| <i>LMN</i> | 37,4 \pm 1,7 | 96,0 \pm 6,7 | 32,0 \pm 2,6 | 82,0 \pm 4,3 |
| <i>RF</i> | 34,5 \pm 1,5 | 89,0 \pm 1,5 | 29,1 \pm 1,5 | 75,0 \pm 1,4 |
| <i>*Contenido total de aceite en hígado de rape</i> | | | | |

La capacidad de extracción de los solventes verdes se comparó con la capacidad de extracción del solvente convencional FR. En la Tabla 3.3 se puede observar que los rendimientos de extracción fueron mayores cuando se agitó con un RM en comparación con el UT. Autores como Fang y colaboradores (170) informaron de la importancia de la agitación en sus experimentos de extracción de aceite de atún. Esto puede indicar que el sistema de agitación del RM influye en las diferencias presentadas entre los dos sistemas de agitación, en donde el RM sería el

método de agitación más eficiente. Con el RM todos los solventes verdes mostraron porcentajes de extracción entre el 96 y el 100 %. Este porcentaje de extracción fue superior al mostrado por el solvente RF (89 %) con el mismo sistema.

Comparando ambos sistemas de agitación, con el UT se tiene porcentajes menores de extracción para el RF y la gran mayoría de los solventes verdes, exceptuando el CPME que fue 100 % en ambos sistemas. Los resultados de extracción menores pueden ser debido a la formación de emulsiones, formadas por la presencia de agua en el hígado de rape fresco, que sumadas al tipo y la alta velocidad de agitación (4000 rpm) que usa el sistema UT, crean el ambiente perfecto para la emulsificación.

El 2-MeTHF y la CPME extrajeron la mayor cantidad de aceite de pescado en los dos sistemas de extracción evaluados, lo que coincide con la predicción realizada con el programa COSMO-RS. En el estudio teórico, la DMC mostró la menor probabilidad de solubilidad de los triglicéridos utilizados como modelo; sin embargo, en la extracción experimental mostró mejores resultados de los esperados, con un 99 % de extracción en RM. El LMN presentó los porcentajes de extracción más bajos que los obtenidos teóricamente con COSMO-RS (96 % con RM y 82 % con UT). No obstante, estos porcentajes de extracción menores podrían ser consecuencia de las condiciones utilizadas para recuperar el aceite de la solución. Puesto que se llevó a cabo mediante unas condiciones de evaporación del solvente fuertes (90 °C/ 0,3 mbar), con una temperatura mucho mayor a la usada con los demás solventes (40 y 50 °C), lo que podrían favorecer la evaporación de parte de los compuestos más volátiles presentes en el aceite de pescado.

El AHR extraído con el RF fue analizado por RMN para identificar las señales que indican la presencia de los AG, como se mostró en la Figura 3.6. En los análisis RMN no se observaron diferencias en los espectros de ¹H-RMN de las muestras de AHR extraídas con los diferentes solventes (verdes o de referencia) y métodos de agitación RM (Figura 3.9) o UT (Figura 3.10).

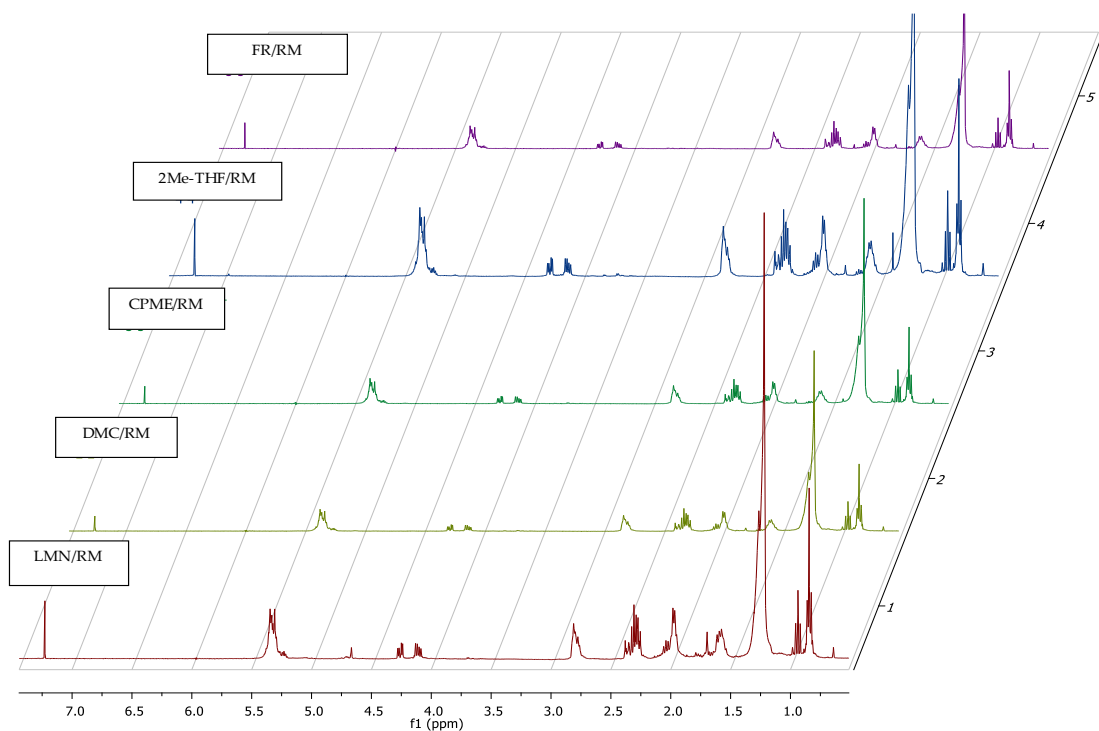


Figura 3.9. Espectro ^1H -RMN del aceite de hígado de rape (AHR) extraído con el mezclador-agitador rotatorio (RM) y diferentes disolventes. Líneas de color: rojo: LMN, limoneno; verde claro: DMC, carbonato de dimetilo; verde: CPME, ciclopentil metil éter; azul: 2-MeTHF, 2-metiltetrahidrofurano, y púrpura: RF, reactivo Folch.

En los espectros de la Figura 3.9. se pueden observar las señales de algunos ácidos omega-3 y el glicerol, identificadas previamente en la Figura 3.6. Para todas las extracciones con los diferentes solventes se observa entre 0,99 y 1,1 ppm señales compatibles con las de los ácidos grasos omega-3 y en 2,4 ppm con el DHA (173). En el espectro correspondiente al LMN se alcanza a ver trazas del solvente por una señal ubicada en 4,65 ppm. Pese a las duras condiciones de evaporación del solvente a las que fue sometido el AHR.

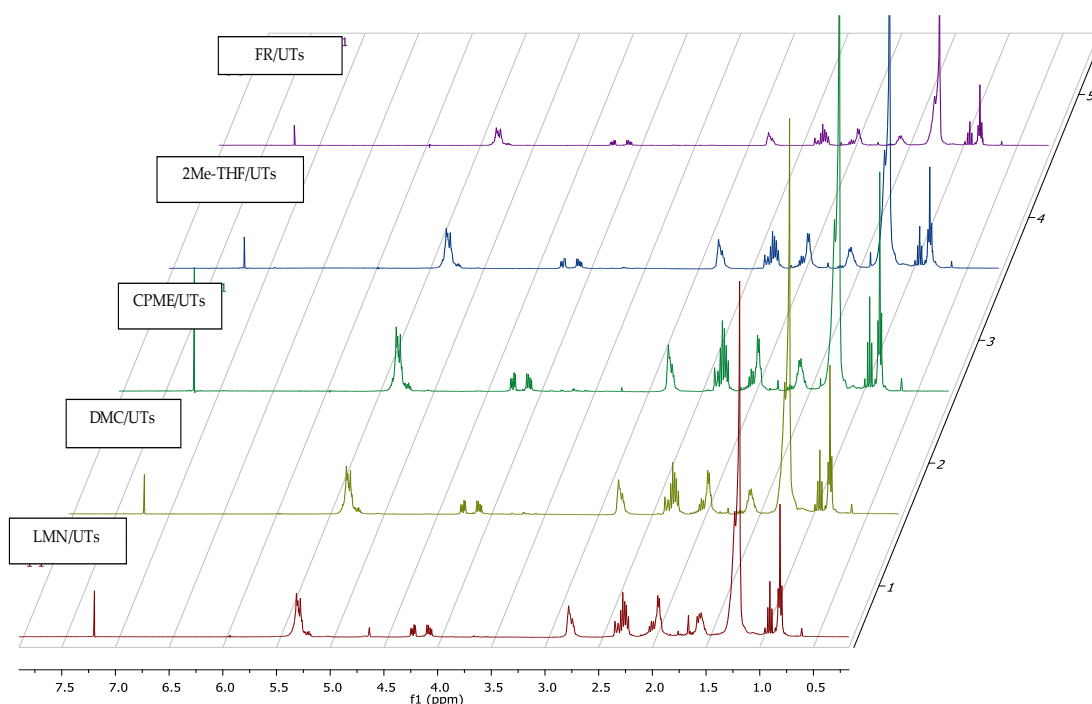


Figura 3.10. Espectro ^1H -RMN del aceite de hígado de rape hidrolizado (AHR) extraído con Ultra-Turrax® (UT) y diferentes disolventes. Líneas de color: rojo: LMN, limoneno; verde claro: DMC, carbonato de dimetilo; verde: CPME, ciclopentil metil éter; azul: 2-MeTHF, 2-metiltetrahidrofurano, y púrpura: RF, reactivo Folch (77).

En la Figura 3.10. se observan las mismas señales entre 0,99 y 1,1 ppm que indican presencia de los ácidos grasos omega-3 y en 2,4 ppm del DHA (173). En general, no se observan diferencias entre los espectros de las figuras anteriores que sugirieran diferencias en la composición del AHR extraído con los diferentes green solvents. Excepto por el AHR extraído con LMN, puesto que en el espectro de la Figura 3.10. se alcanza a observar una pequeña señal del solvente a la altura de 4,65 ppm.

Para elegir el mejor método de extracción del AHR, es muy importante considerar el solvente ideal y el mejor método de agitación. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el sistema RM, se puede decir que los solventes verdes evaluados podrían ser alternativas interesantes para sustituir a los solventes convencionales como el hexano, el cloroformo y el metanol para desarrollar procesos extractivos más respetuosos con el medio ambiente para las muestras de aceite (161,162). Un solvente alternativo ideal debe cumplir los siguientes requisitos (a) no ser considerado un COV's; (b) tener una baja toxicidad para los seres humanos; (c) tener un impacto limitado en el medio ambiente (ser ecológico); (d) obtenerse a partir de

recursos renovables; (e) tener un alto poder de disolución; (f) ser fácil de recuperar; y (g) no cambiar significativamente la configuración del proceso (132).

Considerando la información publicada en varias guías de disolventes (112,113,117,166,185), se evaluaron varias características y propiedades según los criterios de riesgo, ciclo de vida, coste, fuentes de producción (y su puntuación de 1 a 8, donde 1 corresponde a menor y 8 a mayor) y rendimiento de la extracción AHR (Tabla 3.4.) (112,113,117,185).

Tabla 3.4. Propiedades de los disolventes verdes, rendimientos de extracción (AHR), información sobre las sustancias y análisis de costes (77).

| Solvente (CAS) | % Rendimiento de extracción | | Punto de ebullición °C | Presión de vapor 20 °C (KPa) | Información de Solvente (Guías de solventes) ** | | | | | | Costo €/L | Fuente |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----|------------------------|------------------------------------|--|-------|----------------|------|----------|---------------|--------------|-----------------------------|
| | RM | UT | | | Uso | | Medio ambiente | | | Ciclo de vida | | |
| | | | | | Seguridad | Salud | Aire | Agua | Residuos | | | |
| <i>CCl₄</i> (67663) | 89* | 75* | 62 | 212 | 2 | 9 | 7 | 7 | 6 | 5 | 22,6 | Síntesis química |
| <i>MeOH</i> (67561) | | | 65 | 12,9 | 3 | 5 | 6 | 3 | 6 | 2 | 5,0 | Síntesis química |
| <i>2-MeTHF</i> (96479) | 100 | 87 | 80 | 10 | 5 | 6 | 8 | 6 | 4 | 7 | 60,8 | Cereales / Síntesis química |
| <i>CPME</i> (5614379) | 100 | 100 | 106 | 6 | 6 | 4 | 6 | 6 | 3 | 7 | 74,0 | Síntesis química |
| <i>DMC</i> (616386) | 99 | 75 | 90 | 7,4 | 1 | 3 | 5 | 3 | 5 | 3 | 66,3 | Síntesis química |
| <i>LMN</i> (5989275) | 89 | 82 | 178 | 0,2 | 5 | 4 | 3 | 3 | 7 | 8 | 23,4 | Cítricos |

Donde:
CCl₄: cloroformo; *MeOH*: metanol, *:valores de rendimiento obtenidos con el reactivo Folch (RF): (cloroformo/metanol (2:1, v/v)); *2-MeTHF*: 2-metiltetrahydrofurano; *CPME*: ciclopentil metil éter; *DMC*: carbonato de dimetilo; *LMN*: limoneno; *RM*: mezclador agitador-rotatorio; *UT*: Ultra-Turrax®; ** Datos de las guías de disolventes (113,117,166,185), Coste, precios tomados de Sigma Aldrich en octubre 2020 (<https://www.sigmaaldrich.com/spain.html>).

Teniendo en cuenta la información de estas guías y la Tabla 3.4, el disolvente más apropiado para la extracción de AHR sería el 2-MeTHF. Este disolvente se puede obtener de recursos renovables como las mazorcas de maíz y el bagazo (166), además mostró porcentajes de

extracción hasta del 100 % con el RM. Es uno de los solventes ecológicos más baratos (sólo superado por el LMN) y su puntuación con respecto a los posibles riesgos es aceptable (entre 4 y 6, excepto el riesgo ambiental del aire con 8).

Otro disolvente interesante es el CPME, debido a los excelentes rendimientos de extracción mostrados y a su puntuación de riesgo similar a la del 2-MeTHF. Sin embargo, este disolvente es un subproducto de la síntesis del caucho a partir del petróleo. Además, es el más caro de todos los disolventes estudiados. El DMC es un disolvente que presenta altos rendimientos de extracción con agitación RM, presenta bajos riesgos para la salud y el medio ambiente (puntuación entre 1 y 5). Sin embargo, sus bajos rendimientos de extracción con UT, su precio (el segundo más alto) y el hecho de que se prepare por síntesis química a partir de gas metano hacen que lo descartemos como disolvente ideal. El LMN es aceptable en términos de evaluación de riesgos, ya que este disolvente tiene una puntuación similar a la del CPME. Pero según algunas de sus propiedades y lo corroborado con los datos experimentales, es un disolvente difícil de evaporar, además de presentar los rendimientos de extracción más bajos. Por tanto, se considera un solvente no adecuado para la extracción de AHR (112,113,117,166,185).

3.4.4. Producción de biocatalizadores

La producción de biocatalizadores a partir de hongos filamentosos, como las *resting cells* se puede considerar mucho menos costoso en comparación con la producción de biocatalizadores comerciales que requieren procesos de extracción, purificación e inmovilización.

El procesamiento de los biocatalizadores se realizó según lo descrito en los métodos, un proceso lento debido al crecimiento de los microorganismos y se repitió varias veces, produciendo en diferentes lotes, para prevenir la contaminación y/o envejecimiento de las *resting cells* que pueden causar una disminución de la actividad enzimática (*U*) (una cepa antigua puede tener menor actividad enzimática).

Cada vez que se produjo una tanda/lote de biocatalizadores fueron sometidos a la evaluación de la *U*. Las cepas que se tenían procedentes de la CECT para el *R. oryzae* eran de réplicas de distintos años. En la producción de estos *resting cells* de *R. oryzae* se evaluó el posible efecto sobre la *U* de la adición de aceite (en el cultivo en medio líquido se incorpora aceite para inducir la producción de lipasas y se valoraron distintas concentraciones). Los resultados se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Resultados de la evaluación de la actividad enzimática (*U*) de los *resting cells* en relación con la adición de aceite en el medio de cultivo.

| <i>Microorganismo</i> | | mL de aceite adicionado | Actividad lipásica (<i>U</i>) | Rendimiento |
|-----------------------|-------|----------------------------|------------------------------------|-------------------|
| <i>Cepa</i> | AÑO* | | μmol/min | g Micelio/L medio |
| <i>R. oryzae</i> | 2016 | 1 | 1,14 | 5,28 |
| <i>R. oryzae</i> | 2016 | 2 | 1,40 | 7,49 |
| <i>R. oryzae</i> | 2016 | 3 | 0,22 | 11,53 |
| <i>R. oryzae</i> | 2013 | 1 | 0,85 | 7,16 |
| <i>R. oryzae</i> | 2013 | 2 | 0,96 | 6,75 |
| <i>R. oryzae</i> | 2013 | 3 | 0,58 | 11,43 |
| <i>A. flavus</i> | 2016 | 1 | 0,03 | 5,95 |
| <i>A. flavus</i> | 2017a | 1 | 0,02 | 5,14 |
| <i>A. flavus</i> | 2017b | 1 | 0,02 | 5,75 |

*Corresponde a la identificación propia usada en la universidad para diferenciar las cepas, en función del inicio de su uso (edad).

Como se evidencia en la Tabla 3.5., con los resultados con 2 mL de aceite se obtiene la actividad enzimática más alta para las *resting cell* de *R. oryzae*. También se pudo ver la afectación de la edad de la cepa, puesto que todas las del año 2013 presentan valores más bajos de la *U*. El rendimiento en g de micelio obtenido fue mayor en los *resting cells* que usaron más aceite, esto también se puede deber a restos de aceite en el micelio, pese a los lavados a los que se sometió el micelio (3), además los lavados con acetona no deben ser mayores a los descritos puesto que este solvente puede disminuir la actividad enzimática (afecta las lipasas).

En cuanto la cepa de *A. flavus* tienen mucha menor *U* en comparación con el otro hongo además el rendimiento en gramos obtenido fue menor.

La mayor *U* de las *resting cells* en la primera tanda de producción fue de 1,4 y 0,03 para de *R. oryzae* y *A. flavus* respectivamente, estas fueron usadas para los ensayos de biocatálisis.

3.4.5. Síntesis de ésteres etílicos de AHR mediante biocatálisis.

Se realizaron dos procedimientos para la producción de ésteres etílicos (EE) a partir de AHR y etanol: a) procedimiento de una etapa basado en una reacción de esterificación directa o transesterificación (Figura 3.4.), y b) procedimiento de dos etapas basado en reacciones secuenciales de hidrólisis y esterificación (Figura 3.5.). Se utilizaron diferentes biocatalizadores:

una enzima comercial (Novozym 435), *resting cells* de dos hongos (*R. oryzae* y *A. flavus*) y dos mezclas de estas *resting cells* (1:1 y 7:3, *R. oryzae*-*A. flavus*) en un medio libre de solventes.

3.4.5.1. Esterificación del AHR en una sola etapa, esterificación directa.

Los ensayos de esterificación en una etapa se llevaron a cabo según la reacción descrita en la Figura 3.4. Se ensayaron 3 tiempos de reacción y se utilizaron diferentes biocatalizadores. En la Tabla 3.6. se muestran los resultados de los porcentajes de esterificación (obtenidos con los cálculos descritos en los métodos) para las reacciones biocatalíticas de esterificación directa o en una sola etapa. Los biocatalizadores fueron la enzima comercial: Novozym 435, las *resting cells* de *R. oryzae* y *A. flavus*, las mezclas de estas en distintas proporciones (1:1 y 7:3 respectivamente).

Tabla 3.6. Resultados de la esterificación directa por biocatálisis, con el porcentaje de EE obtenidos a partir de aceite de hígado de rape. (media \pm s.d., n = 3) (77).

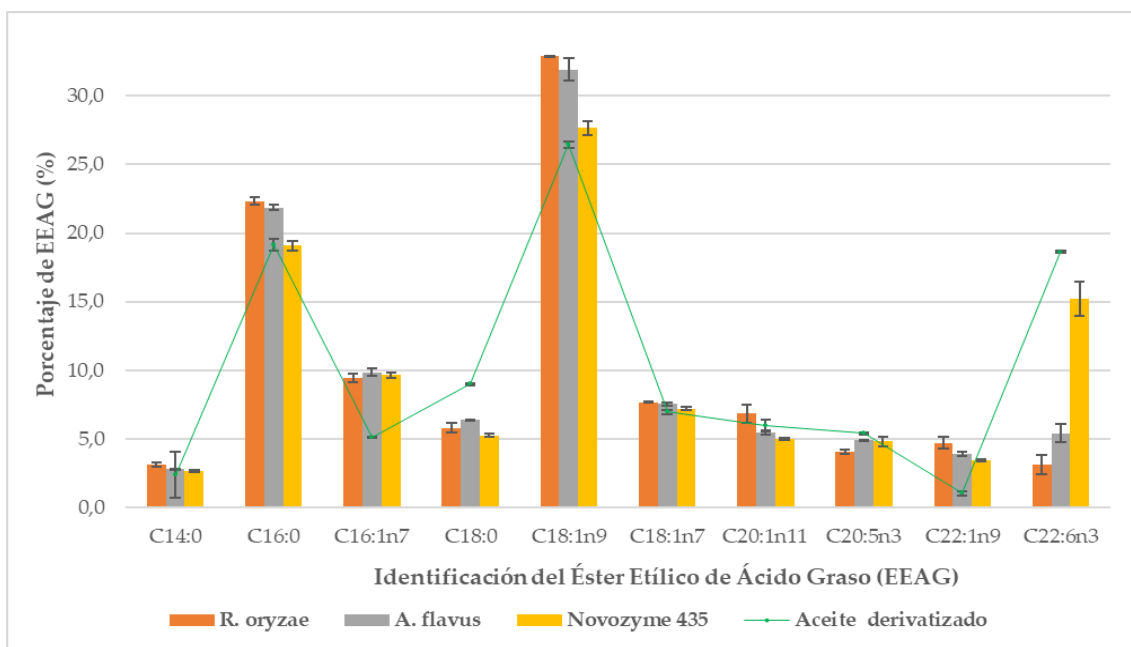
| Biocatalizador | Rendimiento % | | |
|---|----------------------|----------------|----------------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| <i>Tiempo de reacción en horas (h)</i> | | | |
| Novozym 435 | 44,0 \pm 2,8 | 61,0 \pm 1,5 | 63,0 \pm 0,4 |
| <i>R. oryzae</i> | 53,0 \pm 4,1 | 54,0 \pm 5,0 | 61,0 \pm 2,3 |
| <i>A. flavus</i> | 32,0 \pm 2,7 | 38,0 \pm 3,4 | 46,0 \pm 0,6 |
| <i>R. oryzae</i> / <i>A. flavus</i> (1:1) | 34,0 \pm 4,5 | 38,0 \pm 3,6 | 48,0 \pm 3,0 |
| <i>R. oryzae</i> / <i>A. flavus</i> (7:3) | 38,0 \pm 4,2 | 45,0 \pm 1,7 | 57,0 \pm 4,2 |

Como se observa en la Tabla 3.6., los resultados más altos de porcentaje de esterificación fueron obtenidos con las *resting cells* de *R. oryzae*, seguidas de la enzima comercial a las 24 h. Para las 48 y 72 h los valores más altos son obtenidos por Novozym 435 seguidos de las lipasas de *R. oryzae*. Las *resting cells* de *A. flavus* obtuvieron los valores más bajos en la esterificación, esto es concuerda con los resultados obtenidos para la actividad enzimática, donde *A. flavus* obtuvo valores más bajos que los del *R. oryzae*. Es destacable que las *resting cells* de *R. oryzae*, preparadas en el laboratorio con medios limitados, obtuvieran valores de porcentaje de esterificación cercanos a los obtenidos con la enzima comercial e incluso mayores para el primer tiempo ensayado (24 h). Los valores tuvieron una correlación positiva entre los tiempos de reacción y el rendimiento de la esterificación. Para las mezclas de los biocatalizadores propios los resultados más altos se dieron con la mezcla que tenía mayor contenido del *R. oryzae* y las

72 h de reacción. Sin embargo, los resultados no se consideraron relevantes puesto no se observó un aumento en el porcentaje de esterificación, sugiriendo que las mezclas no indujeron una mejora en la actividad catalítica de las *resting cells*.

Una vez valorados los resultados del porcentaje general de rendimiento de la esterificación, Se determino que los ensayos para determinar la composición del aceite esterificado por GC-FID, solo eran relevantes para los resultados con 3 de los biocatalizadores, la enzima comercial y las 2 *resting cells* fúngicas. Estos EEs sintetizados se analizaron por cromatografía de gases (GC-FID) para identificar y cuantificar cada éster de ácido graso. Se identificaron los 10 principales y se compararon con el AHR derivatizado (porcentajes máximos de EEs de AG).

En la Figura 3.11. se muestran los diez principales EE de AG obtenidos en la reacción de esterificación una sola etapa, ensayada con tres de los biocatalizadores: enzima comercial y las 2 *resting cells* fúngicas. Estos porcentajes fueron calculados a partir de los cromatogramas GC-FID realizados a los ésteres sintetizados, para la determinación del perfil lipídico (descrito en métodos).



| Nombre | Mirístico | Palmitico | Palmitoleico | Estearico | Oleico | Vacénico | Gadoleico | EPA | Erucito | DHA |
|------------------|-----------|-----------|--------------|-----------|---------|----------|-----------|---------|---------|---------|
| Abre. | C14:0 | C16:0 | C16:1n7 | C18:0 | C18:1n9 | C18:1n7 | C20:1n11 | C20:5n3 | C22:1n9 | C22:6n3 |
| AHR | 2,4 | 19,1 | 5,1 | 9,0 | 26,4 | 6,9 | 6,0 | 5,4 | 1,0 | 18,6 |
| <i>R. oryzae</i> | 3,1 | 22,3 | 9,4 | 5,8 | 32,9 | 7,7 | 6,9 | 4,1 | 4,7 | 3,1 |
| <i>A. flavus</i> | 2,8 | 21,9 | 9,8 | 6,4 | 31,9 | 7,6 | 5,5 | 4,9 | 3,9 | 5,4 |
| Novozym 435 | 2,7 | 19,1 | 9,7 | 5,2 | 27,6 | 7,2 | 5,0 | 4,8 | 3,4 | 15,2 |

Figura 3.11. Efecto del biocatalizador en el perfil de los principales ésteres etílicos de ácidos grasos obtenidos en la reacción de una sola etapa para 72 h. Los valores obtenidos porcentaje a partir de los cromatogramas realizados a las muestras, se encuentran muestran en parte inferior de la imagen como tabla de datos (77).

En la Figura 3.11. se puede observar que los AGPI's como el DHA (C22:6n3) y EPA (C22:1n9) se obtuvieron resultados de esterificación mayores al 80 % del total del AG correspondiente. Es decir, para el DHA se esterificó un 15,6 % del 18,6 % (máximo del valor de referencia) y para el EPA, un 4,4 % del 5,4 % de referencia.

Estos resultados demostraron que la enzima comercial no discrimina entre los diferentes ácidos grasos para sintetizar los EE ya que los esterifica todos lo máximo que le es posible. Esto ya ha sido descrito en la bibliografía (186,187). Castejon y colaboradores y Moharana y colaboradores (186,187) indican que Novozym es un biocatalizador adecuado para la síntesis de estos ésteres etílicos (EE's) omega-3.

Por el contrario, las *resting cells* mostraron los rendimientos más bajos para la esterificación de AGPI's principalmente DHA. *A. flavus* mostró el mayor rendimiento de ésteres etílicos de DHA (DHA-EE: C18:1n9) con un valor de 38 % del total de DHA. Mientras que *R. oryzae* sólo esterificó el 22 % del DHA presente en el aceite de pescado tras 72 h de reacción. No se observaron diferencias para la esterificación del EPA. Por tanto, se sugiere que las lipasas de *R. oryzae* discriminaron entre los diferentes AGPI's presentes en el AHR.

La selectividad de las enzimas ha sido reportada por diferentes autores que sugieren que algunas lipasas pueden ser selectivas para algún tipo de ácido graso dependiendo de su longitud de cadena, del solvente utilizado en su extracción y purificación, del método de inmovilización utilizado para la enzima y de las condiciones de reacción (temperatura y tiempo) (179,188). La selectividad mostrada por las *resting cells* de *R. oryzae* podría facilitar la separación del DHA de la mezcla de EE.

3.4.5.2. Esterificación del AHR en dos etapas: Hidrólisis y esterificación.

Los ésteres fueron sintetizados según el esquema de la síntesis mostrado en la Figura 3.5. donde se diferencian dos etapas de biocatálisis: Etapa 1: hidrólisis y Etapa 2: esterificación.

Etapas 1

La hidrólisis se llevó a cabo utilizando distintos biocatalizadores. La enzima comercial Novozym 435, las dos *resting cells* fúngicas y dos mezclas en diferentes proporciones (1:1 y 7:3 de *R. oryzae* y *A. flavus*) durante 24 h (Figura 3.12.). El porcentaje de rendimiento se determinó por medio de los análisis de las RMN realizadas y su correspondiente procesado (descrito en métodos). Los porcentajes mostraron

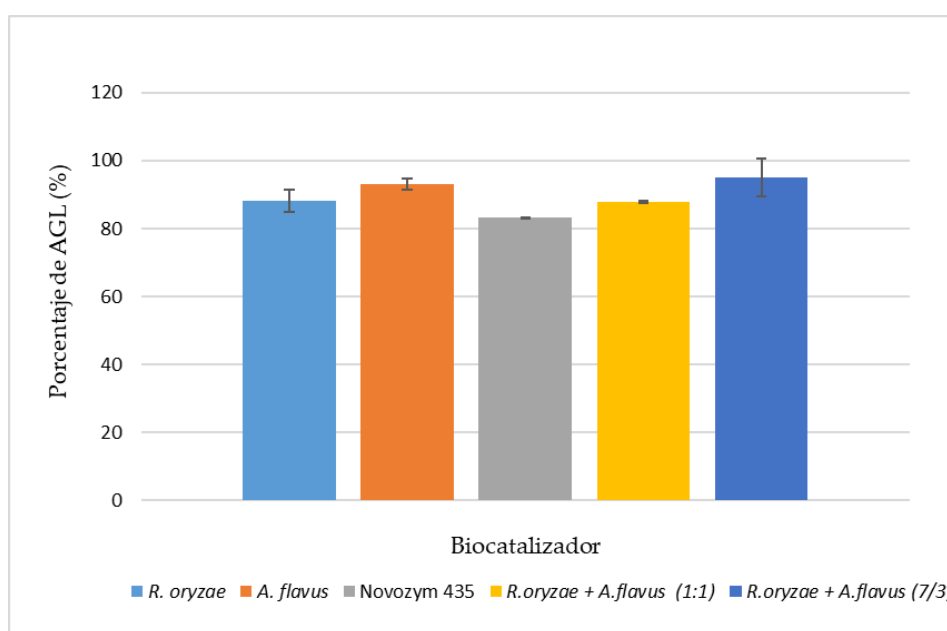


Figura 3.12. Porcentaje de AGLs obtenido en las reacciones biocatalíticas de la hidrólisis del AHR durante 24 h (n=3). Los biocatalizadores usados fueron Novozym 435 (enzima comercial), dos *resting cells* fúngicas (*R. oryzae* y *A. flavus*) y sus mezclas en distintas proporciones 1:1. y 7:3 de *R. oryzae* y *A. flavus* respectivamente (77).

Como se evidencia en la Figura 3.12., las *resting cells* de *R. oryzae* mezcladas con *A. flavus* en una proporción de 7:3 mostraron el mayor porcentaje de hidrólisis (> 95 % de ácido graso libre (AGL)). El segundo biocatalizador que presentó un alto porcentaje de hidrólisis fueron las *resting cells* de *A. flavus* (> 93 % de AGL). Todas las *resting cells* estudiadas tanto *R. oryzae* como *A. flavus* mostraron un mayor porcentaje de hidrólisis que la lipasa comercial Novozym (83 %), lo que indica que las *resting cells* pueden ser una alternativa barata a los biocatalizadores comerciales inmovilizados para estas reacciones. Los porcentajes de hidrólisis obtenidos con las *resting cells* propias, pueden considerarse elevados si se comparan con los reportados por Aarthy y colaboradores (189) para la hidrólisis de aceite de pescado con las enzimas de *Cryptococcus* sp., que obtuvieron un 25 % y un 66,5 % de AGL durante 24 h y 72 h,

respectivamente. Además, cabe destacar que el AHR contiene más DHA que los aceites hidrolizados de hígado de bacalao, sardina, salmón y tiburón (189).

Se llevó a cabo un escalado del proceso de hidrólisis utilizando el biocatalizador que obtuvo el mejor resultado en el experimento anterior (Figura 3.12.). Partiendo de 25 g de AHR y con la mezcla de *R. oryzae* y *A. flavus* (7:3), se logró un AHR hidrolizado (en adelante material hidrolizado de hígado de rape (MHHR)) con un 97,8 % de AGL.

Etapa 2.

La reacción de esterificación (Figura 3.5.), se realizó utilizando el MHHR obtenido en el experimento escalado. Los rendimientos de las reacciones de hidrolisis y de esterificación se muestran en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Resultado de las reacciones de esterificación mediante la biocatálisis del aceite de hígado de rape hidrolizado (AHRH) expresadas en porcentaje. (media \pm s.d., n = 3).

| Nombre del Biocatalizador Tiempo de reacción | Esterificación % | | |
|---|------------------|----------------|----------------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| Novozym 435 | 54,0 \pm 0,5 | 70,0 \pm 3,1 | 85,0 \pm 1,4 |
| <i>R. oryzae</i> | 42,0 \pm 2,7 | 55,0 \pm 1,7 | 65,0 \pm 4,0 |
| <i>A. flavus</i> | 37,0 \pm 5,1 | 39,0 \pm 3,1 | 41,0 \pm 2,0 |
| <i>R. oryzae</i> / <i>A. flavus</i> (1:1) | 32,0 \pm 3,2 | 37,0 \pm 4,5 | 37,0 \pm 4,5 |
| <i>R. oryzae</i> / <i>A. flavus</i> (7:3) | 41,0 \pm 0,6 | 34,0 \pm 4,7 | 42,0 \pm 1,4 |

Como se observa en la Tabla 3.7., se encontró una correlación positiva entre los tiempos de reacción y el rendimiento de la esterificación, al igual que en la transesterificación. La enzima comercial mostró el mayor rendimiento en la reacción de esterificación en comparación con las resting cells. Los rendimientos de esterificación obtenidos por Novozym 435 fueron del 54, 70 y 85 % para 24, 48 y 72 h respectivamente. El segundo lugar, al igual que en la esterificación de una etapa, lo ocuparon las *resting cells* de *R. oryzae*. Su porcentaje de rendimiento más alto fue del 65 % a las 72 h. *A. flavus* volvió a mostrar los rendimientos más bajos en la esterificación en comparación con *R. oryzae* (41 % en 72 h). Estos resultados confirman que las células en reposo de *A. flavus* no son muy activas en la esterificación de los ácidos grasos del AHR. En cuanto a las mezclas de las *resting cells* fúngicas, los rendimientos fueron inferiores a los obtenidos con *R. oryzae*, al igual que en la reacción de transesterificación.

La determinación de la composición de los EEs por GC-FID se realizó para los resultados de los 3 biocatalizadores (no para sus mezclas, por considerarse irrelevantes). Así pues, los EEs obtenidos con la enzima comercial y las 2 *resting cells* fúngicas se analizaron por cromatografía de gases (GC-FID) para identificar y cuantificar cada éster de ácido graso. Identificando 10 principales ésteres en el MHHR que fue comparado con su correspondiente derivatizado. En la Figura 3.13., se muestran los resultados del perfil obtenido por cromatografía para la esterificación en dos etapas.

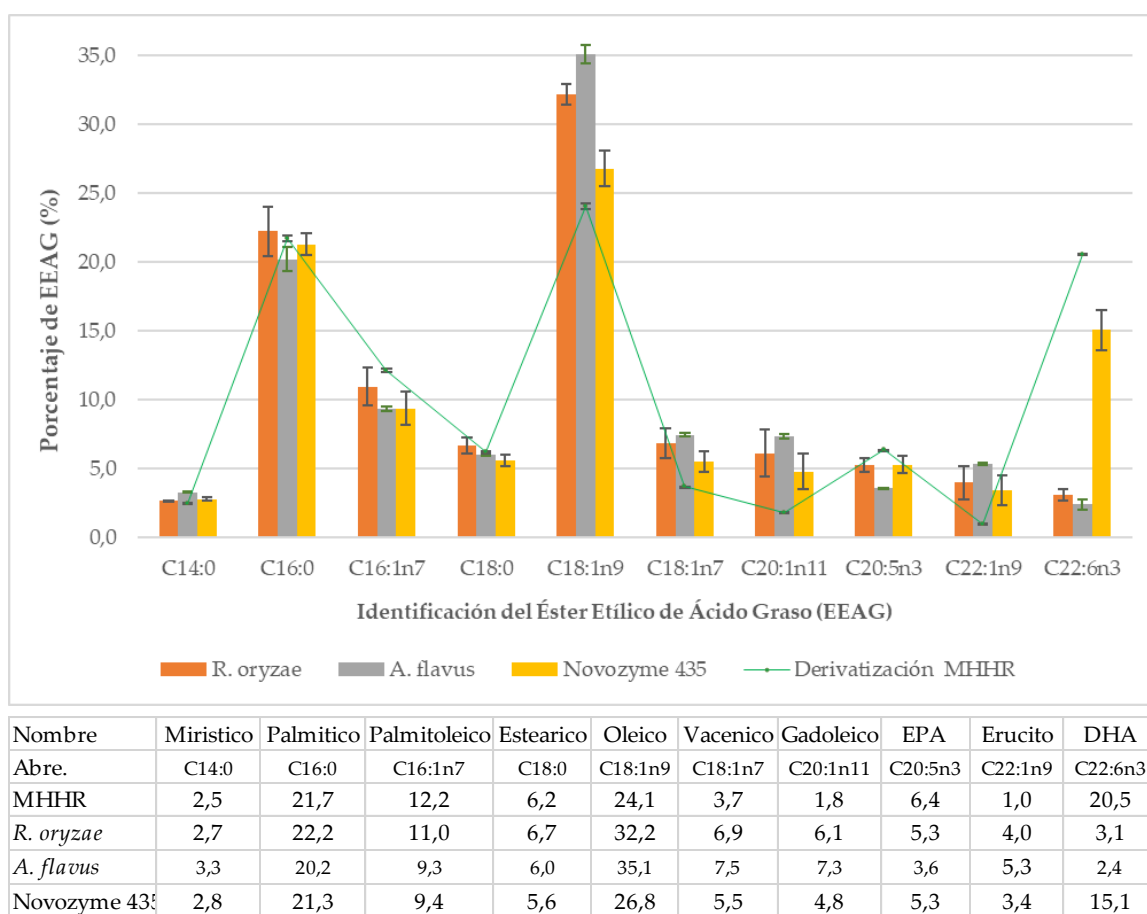


Figura 3.13. Efecto del biocatalizador en perfil de los principales ésteres etílicos de ácidos grasos obtenidos en la reacción en dos etapas para 72 h. Los valores obtenidos porcentaje a partir de los cromatogramas realizados a las muestras, se encuentran muestran en parte inferior de la imagen como tabla de datos (77).

En relación con los perfiles de EE (Figura 3.13.), éstos son similares a los mostrados en las reacciones de esterificación directa. Se evidencio un cambio en el contenido de algunos de los ésteres, este sugiere un enriquecimiento de AGMI's como los ácidos oleico (C18:1n9), gadoleico

(C20:1n11) y vaccénico (C18:1n7), que son beneficiosos para la salud (176). El ácido vaccénico es una fuente de omega-7 que se ha correlacionado positivamente con la presencia de DHA y EPA (177,178). Por otro lado, el aumento de ácido palmítico (C16) y ácido esteárico (C18) observado en los ensayos podría deberse a restos de los ácidos grasos presentes en el aceite de girasol utilizado en la producción de las *resting cells* como inductores de la producción de lipasas. Los propios microorganismos también pueden sintetizar diferentes ácidos grasos, *Aspergillus sp* produce ácidos grasos de cadena larga (C16:0, C16:1n7, C17:0, C18:0, C18:1n9, C18:2, C18:3 y C20:0). Este perfil de ácidos grasos se ha utilizado para discriminar especies de hongos pertenecientes al género *Aspergillus* (190). Además, la presencia de algunos ácidos grasos como el ácido gadoleico (C20:1n9) puede depender del tipo de sustrato utilizado en el medio de cultivo (191). No obstante, el incremento de estos ácidos grasos en el crudo final de la reacción no puede ser superior al 4 % teniendo en cuenta el porcentaje de biocatalizadores utilizados (10 %) y el porcentaje de ácidos grasos presentes en las *resting cells* fúngicas (40 %).

Los resultados de esterificación para el EPA fueron similares a los evidenciados en las reacciones de esterificación en una etapa. La enzima comercial y las *resting cells* de *R. oryzae* esterificaron más 5,3 % del 6,4 % del EPA contenido en el MHHR, es decir más del 80% de este AG. Si se compara con el EPA contenido en el AHR (5,4%), los dos biocatalizadores mencionados esterificaron casi el 100 %. Las *resting cells* de *A. flavus* esterificaron solo el 3,6 % del contenido total de EPA lo que correspondería al 60 % aproximadamente. En cuanto al DHA, nuevamente Novozym 435 esterificó el mayor porcentaje del DHA contenido en MHHR, mientras que las *resting cells* fúngicas no superaron el 15 % del total contenido (El 100% es el contenido total). *A. flavus* esterificó hasta el 2,1 % mientras que *R. oryzae* esterificó el 3,1 % del 6,4 % de DHA contenido en el MHHR. Estos bajos rendimientos parecen confirmar la hipótesis de la selectividad del DHA mostrada por *R. oryzae*.

Si hay algún tipo de selectividad de la lipasa de *R. oryzae* el DHA debía encontrarse como AGL dentro del material esterificado. La posibilidad de aislar estos AGLs también es interesante, ya que se ha demostrado que los AGPI's ingeridos en forma de AGL pueden ser más biodisponibles que los EE y, por tanto, más asimilables en el metabolismo humano (192).

Según lo descrito anteriormente, en el producto final obtenido (EEs) tras la fase de esterificación, podrían haber algún contenido de AG sin esterificar (correspondientes a DHA). Para confirmar la hipótesis esta hipótesis, los ésteres obtenidos se sometieron a una esterificación total mediante catálisis química (derivatización) utilizando H_2SO_4 . En la Figura 3.14. se compara los porcentajes de EE de DHA obtenidos en las reacciones de una y dos etapas para los diferentes tiempos (24, 48 y 72 h) utilizando *R. oryzae* o aplicando la catálisis química.

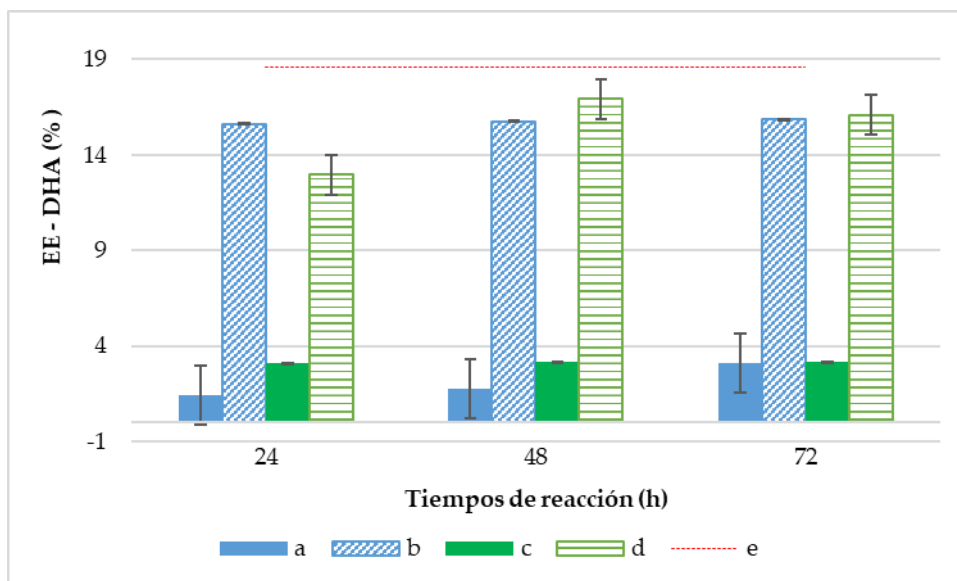


Figura 3.14. Porcentaje de éster etílico de DHA (EE-DHA) obtenido por biocatálisis (en una o dos etapas) para los tres tiempos de reacción (24, 48 y 72 h) utilizando *R. oryzae* comparado con los resultados obtenidos de la derivatización para estos mismos tratamientos. El color sólido representa los porcentajes de éster obtenidos en las reacciones iniciales en una o dos etapas y los colores con trama su respectiva derivatización. (a) Color azul sólido: % EE-DHA obtenido por esterificación de una etapa. (b) Color azul con trama: % EE-DHA obtenidos de la derivatización del material esterificado en una etapa. (c) Color verde sólido: % EE-DHA obtenidos por esterificación de dos etapas (d) Color verde con trama: % EE-DHA obtenidos de la derivatización del material esterificado en dos etapas. (e) Promedio del % EE-DHA contenidos en el AHR y MHHR (77).

Como se observa en la Figura 3.14. y como era de esperarse, la catálisis química logró una esterificación de casi todo el DHA contenido en el material esterificado en forma de AGL. Si se compara con el promedio del contenido de DHA en el AHR (15,6 %) y en el MHHR (20,5 %), el porcentaje de rendimiento de esterificación fue superior al 90 % del DHA. Puesto que fue más

del 15 % para todos los casos. Esto que el DHA se encontraba en forma de ácidos sin esterificar, incluso posterior a la esterificación biocatalítica realizada con *R. oryzae*. En los tres periodos de reacción estudiados se evidenció que las lipasas de *R. oryzae* no esterificaron el DHA, una eficaz manera de discriminar estos del resto de ácidos grasos presentes en el AHR y el MHHR.

La selectividad demostrada por las células en reposo de esta cepa de *R. oryzae* no ha sido reportada previamente según nuestro conocimiento. Sin embargo, Ashjaria y colaboradores (193) estudiaron la selectividad de las lipasas aisladas de *R. oryzae* e inmovilizadas por diferentes métodos en la hidrólisis del aceite de pescado. Todos los biocatalizadores inmovilizados discriminaron entre el EPA y el DHA a favor del EPA.

3.5. CONCLUSIONES

- ✓ De los métodos de agitación ensayados para extracción de AHR, el mejor fue el sistema con rodillos (RM), obteniendo los porcentajes más altos de extracción de AHR (entre 89 y 100 %) con todos los solventes estudiados. En cuanto a los solventes verdes ensayados, todos obtuvieron porcentajes de rendimientos de extracción superiores o iguales a los obtenidos con solventes tradicionales como el RF con ambos sistemas de agitación. Tras el análisis de los solventes ensayados (teniendo en cuenta, propiedades de los solventes, costes, toxicidad y seguridad de uso, riesgos para la salud humana, riesgos para el medio ambiente, porcentaje de extracción y recursos) se puede considerar que el 2-MeTHF es la mejor opción para la extracción de AHR bajo los parámetros estudiados.
- ✓ El hígado de rape contiene un 39 % de aceite, cuyo perfil lipídico determinado mediante GC-FID mostro porcentajes de AGMI's (43,7 %) y AGPI's del 26 %, donde el DHA corresponde a 15,2 %.
- ✓ La producción de *resting cells* y su uso como biocatalizador es una alternativa más barata, al uso de las enzimas comerciales. Las reacciones de hidrólisis catalizadas con las *resting cells*, obtuvieron porcentajes mayores de AGL. En los ensayos realizados para la esterificación, la enzima comercial siempre tuvo resultados de porcentajes de rendimiento más altos en la esterificación.
- ✓ Los resultados obtenidos en los ensayos de esterificación de una sola etapa muestran porcentajes de rendimiento de EE de AHR del 63, 61 y 46 % utilizando Novozym 435, *R. oryzae* y *A. flavus* respectivamente.
- ✓ En las reacciones de dos pasos, los rendimientos fueron del 85, 65 y 41 % utilizando Novozym 435, *R. oryzae* y *A. flavus*, respectivamente.

- ✓ Las *resting cells* de *R. oryzae* (CECT20476), mostraron los rendimientos más bajos de DHA-EE en las reacciones de esterificación de una o dos etapas, lo que sugiere selectividad hacia este ácido graso.
- ✓ La lipasa comercial (Novozym 435) esterificó los ácidos grasos omega-3 en porcentajes superiores al 90 % para el DHA y al 100 % para el EPA contenidos en el AHR.
- ✓ Las *resting cells* de *R. oryzae* y *A. flavus* ensayadas mostraron un alto porcentaje de hidrólisis (88 % y 93 % respectivamente), superior al de la enzima comercial (61 %). Estos resultados abren una vía para estudiar el enriquecimiento de AGPI's utilizando estas *resting cells*.

SÍNTESIS DE NUEVOS PRODUCTOS: ESPECIES ACEPTORAS DE HIDRÓGENO (HBA's) Y SOLVENTES EUTÉCTICOS (DES's)

4.1. ANTECEDENTES

Hoy en día con la revolución de la química verde y la búsqueda de sostenibilidad en los procesos industriales, se está en constante investigación para la síntesis de nuevos compuestos químicos que reemplacen a los que hasta ahora han sido usados, pero que han demostrado ser tóxicos, contaminantes y nocivos para la vida del ser humano y del planeta en general.

En el grupo de investigación de química orgánica de la Universidad de Lleida y el del Centro de Desarrollos Biotecnológicos Agroalimentarios (DBA) del cual hago parte, se ha trabajado durante muchos años con residuos de la industria alimentaria, buscando dar valor agregado y uso a productos considerados de desecho. Estudios previos de este grupo han logrado fraccionar las grasas consideradas coproductos y obtener distintos compuestos derivados con potencial industrial (194).

En la primera parte de esta tesis se explicó la posibilidad de explotar el aceite de hígado de rape (capítulo 2) considerado un coproducto o residuo. A partir de la hidrólisis realizada previa a la esterificación de en dos etapas, se pueden obtener ácidos grasos libres o ésteres de ácidos grasos y glicerol. El glicerol es un subproducto de la industria química principalmente obtenido en la producción de biodiesel (195). A partir del glicerol se pueden sintetizar compuestos químicos valiosos usados en procesos industriales como el 1,3 dicloro 2-propanol (195–199). Por este motivo se investigó el uso de este derivado del glicerol para la síntesis de compuestos aceptores de hidrógeno (HBA). Los HBA tienen diversas aplicaciones no solo en la síntesis de solventes eutécticos (DES's) o líquidos iónicos (IL's) sino también en la síntesis de compuestos de interés químico, farmacéutico e industrial entre otros (135,200,201). De esta manera se podría aprovechar los subproductos generados en procesos industriales, dentro del marco de la economía circular.

4.2. MATERIALES

4.2.1. Reactivos

Trietilamina (98 %), 1,3 dicloro-2-propanol (99 %), γ -valerolactona (≥ 99 %) se adquirieron de Sigma Aldrich (EE.UU.). 1,3 dicloro-2-propanol (99 %), glicerol (99 %), urea (99,5 %), dietilenglicol (99 %), etilenglicol ($\geq 98,5$ %), D, L ácido láctico (90 %), ácido oxálico (98 %), ácido cítrico anhidro (99 %), ácido ascórbico L+ (ACS >99 %), ácido levulínico (98 %) y fosfato disódico anhidro P.A.

(≥98 %) se adquirieron de Acros Organics (Internacional). Etanol (96 %), Metanol extra puro (99,9 %) y acetona (≥99,8 %) se adquirieron de Scharlau (España). Trimetilamina 33 % en etanol desnaturalizado con 2 % de ciclohexano de Alfa Aesar (Alemania).

4.2.2. Equipos

Para pesar los componentes se usaron las balanzas de precisión de Gram (España) y A&D Weighing (EE.UU.). Para mantener la temperatura y agitación en las reacciones se usaron placas calefactoras-agitadoras y termómetros electrónicos con sensor de temperatura de IKA® (España) y Radleys discovery technologies (U.K.). Para filtrar al vacío se usó la bomba de vacío Laboport® (España). La evaporación se realizó con el equipo de evaporación rotatoria R210 de BUCHI (Suiza). Se usó el equipo RMN, MERCURY plus NMR de 400 MHz (EE.UU.), con los distintos solventes deuterados. Para las pruebas espectrofotométricas se usó un espectrómetro Jasco FT-IR 6300 (Tokio, Japón), en un rango espectral de 4000-650 cm^{-1} , 64 barridos y resolución de 4 cm^{-1} . utilizando el accesorio de muestreo PIKE MIRacle™ ATR (Diamond / ZnSe). El medidor de punto de ebullición fue el Fisherbrand de Fisher (España) y el Gallenkamb PI106 (U.K.). Para el escalado se usó un reactor de 5L con accesorio de agitación motorizada de varilla Heidolph RZR Digital 2000 (Alemania), dos baños baño de recirculación (calentamiento/refrigeración) de Polyscience (EE.UU.) y B. Braun (Alemania) y una barra agitadora de pala basculante de politetrafluoroetileno (PTFE) de 50 cm de longitud, pala de 10 cm x 2,5 cm.

4.3. MÉTODOS

4.3.1. Síntesis Disal 1: Cloruro de 1,3 (bis)trietilamonio-2-propanol.

Para la síntesis de las disales se usó el procedimiento modificado de Beckett y colaboradores (202). Se preparó una solución 4,2 molar (M) de trietilamina etanólica (E-Et₃N 4,2M). Se probaron distintas concentraciones de mezclas entre el 1,3-dicloro-2-propanol y E-Et₃N 4,2 M, hasta obtener las condiciones de la relación estequiométrica que obtuviera mejor relación rendimiento/pureza del compuesto. En un recipiente en baño de hielo que contenía la E-Et₃N 4,2 M, se le adicionó gota a gota (aproximadamente 25 gotas/min) el 1,3 dicloro-2-propanol con agitación constante (500 rpm). Luego se añadió metanol gota a gota a una velocidad mayor a la adición anterior (aproximadamente 55 gotas/min). Una vez todos los compuestos estaban en el balón (o reactor), se llevó temperatura de 80 °C en baño de aceite (o en reactor) y se dejó reaccionar durante el tiempo determinado de los ensayos (de 24 a 72 h) con agitación constante. Pasado el tiempo de reacción se evaporó el exceso de solvente (etanol-metanol), el líquido viscoso amarillento obtenido, fue mezclado con acetona en proporción 1:5 v/v promoviendo la

cristalización, se dejó cristalizar a la temperatura indicada (se probaron desde temperatura ambiente hasta en congelación a -22 °C). Formados los cristales se procedió a filtrar a vacío con filtro de placa porosa (N° 3), el compuesto obtenido (polvo blanco) fue secado a vacío por 48 h. Los rendimientos fueron determinados por la relación entre pesos y el reactivo limitante (ecuación 4.1).

ECUACIÓN 4.1:

$$\% R = \left(\frac{g Do}{\frac{PM_{Do}}{Mu_{RI}}} \right) \times 100$$

Donde: % R = rendimiento en porcentaje, Do= Disal obtenida, PM= Peso Molecular, Mu= Moles usados, RI= Reactivo limitante.

El compuesto se analizó por RMN para la verificación de su pureza. Se realizaron otras pruebas como la determinación del punto de fusión y capacidad de absorción de agua (CAA).

4.3.2. Síntesis Disal 2: Cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol.

La síntesis siguió el procedimiento similar a la disal anterior, cambiando la solución etanólica de trietilamina 4,2 M por una solución de trimetilamina con la misma molaridad (E-TMA). La temperatura de reacción fue 70 °C y se probaron también distintas proporciones estequiométricas (p/p) entre los componentes, tiempos de reacción y temperaturas de cristalización para lograr las mejores condiciones de síntesis. Formados los cristales se filtró a vacío con filtro de placa porosa (N°3), el compuesto se secó al vacío (48 h). Se determinaron los rendimientos de la reacción de síntesis según la ecuación 4.1. El compuesto se analizó por RMN, se le determinó el punto de fusión y la capacidad de absorción de agua.

4.3.3. Caracterización de Disales

4.3.3.1. Resonancia Magnética nuclear (RMN).

Técnica y equipo descritos en el ítem 3.1.1.2. Se realizó el análisis sobre muestras de los compuestos sintetizados y los DES's, con diferentes solventes deuterados: cloroformo (CDCl₃), metanol (MeOD), agua (D₂O), dimetil sulfóxido (d-DMSO). Las RMN se analizaron con el programa MestRenova, donde a través de la identificación de las señales del espectro se

confirmó la presencia del compuesto y si este estaba acompañado o no de compuestos no deseados que afectaran su pureza.

4.3.3.2. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).

Las muestras obtenidas se dispusieron en el equipo FT-IR y se analizaron por reflectancia total atenuada (ATR). El programa Spectra Manager se utilizó para realizar el análisis de los espectros obtenidos con sus respectivas señales características.

4.3.3.3. Punto de fusión (pf)

Se dispuso una cantidad de muestra del compuesto en el tubo capilar y se llevó al medidor donde se determinó la temperatura de fusión, los ensayos se hicieron por triplicado en dos equipos diferentes (Fisherbrand y el Gallenkamb).

4.3.3.4. Capacidad de absorción de agua (CAA)

Entre 150 y 300 mg de muestra de cada uno de los materiales en estudio (previamente secados al vacío) se dispusieron en viales tarados y se le realizó seguimiento diario del peso (entre 7 y 15 días). El estudio se realizó por duplicado. Se calculó el porcentaje de agua absorbido a través de la ganancia de peso de las muestras.

A la muestra con mayor CAA, se le realizó una prueba con mayor cantidad de muestra (120 g) en un cristizador de mayor tamaño, donde se sometió a seguimiento diario de ganancia de peso hasta peso constante. Posteriormente se procedió a recuperar el agua absorbida mediante una destilación y se valoró nuevamente la CAA.

4.3.4. Escalado de la producción de las disales

Las disales sintetizadas y estandarizadas se sometieron a un proceso de escalado en un reactor de 5 L con camisa y sistema de agitación rotatorio motorizado con una barra agitadora de PTFE. Se realizaron varios lotes de producción para obtener las cantidades de compuesto deseado. Para calentar el reactor se utilizó una mezcla de etilenglicol:agua en proporción 70:30 v/v en un baño de termostático de B.Braun (baño 1). Se utilizó un baño termostático Polyscience (baño 2), conectado a un condensador, en el que se empleó agua (17 - 21 °C) como líquido refrigerante. La reacción se dividió en dos partes. En la primera parte se fijó la temperatura del baño 1 en 0 °C para el procedimiento de mezcla de compuestos. A 1 L de E-Et₃N o E-TMA se le adicionaron gota a gota 100 mL (para D1) o 200 mL (para D2) del alcohol clorado con agitación constante, posteriormente se adiciono 1,5 L (para D1) o 2,5 L (para D2) de metanol también gota a gota (las cantidades descritas son aproximadas puesto que en cada lote de producción se calculaban en

función de la Solución 4,2 M que se tenía disponible). La velocidad de mezcla de compuestos, temperatura y tiempo de reacción se realizó según lo descrito anteriormente para el (procedimiento en 4.3.1 y 4.3.2. En la segunda parte, adicionados todos los compuestos de la reacción se procedió a subir la temperatura a 70 o 80 °C (dependiendo si correspondía a la D1 o D2 respectivamente) y la reacción se mantuvo con agitación constante a esta temperatura durante 48 h. Pasado el tiempo de la reacción, se acoplo un sistema de destilación al reactor, para recuperar el mayor volumen de solventes y ahorrar tiempo en la evaporación. Se recuperó el producto sintetizado y se terminó de evaporar el solvente en un evaporador rotatorio a 40 °C y la presión indicada para cada solvente (246 y 180 mbar para el metanol y etanol respectivamente). Al producto sintetizado sin cristalizar, se adicionó acetona en exceso (1:5 v/v) 3,5 L (aproximadamente, para cada lote se calculó la cantidad) y se cristalizó a las temperaturas correspondientes (-22 °C para la Disal1 y T amb para la Disal2), posteriormente se filtró, seco y caracterizo según los parámetros ya mencionados (4.3.1 y 4.3.2).

4.3.5. Síntesis de solventes eutécticos (DES's) y escalado.

Se sintetizaron solventes eutécticos (DES's) tipo III a partir de las sales de amonio sintetizadas anteriormente (disales). Las disales sintetizadas fueron los aceptores de hidrógeno (HBA's) y como donantes de hidrógeno (HBD's) se usaron distintos tipos de compuestos orgánicos como amidas, ácidos carboxílicos o polialcoholes con grupos hidroxilo (136) mostrados en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Compuestos usados como HBA y HBD en la síntesis de DES's.

| Componente | Tipo de compuesto | Nombre del compuesto | CAS |
|-------------------|--------------------------|---|--------------|
| HBA | Sales de amonio | Cloruro de 1,3 (bis)triethylamonio-2-propanol | No reportado |
| | | Cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol | No reportado |
| HBD | Ácido orgánico | Ácido cítrico | 77-92-9 |
| | | Ácido láctico | 79-33-4. |
| | | Ácido levulínico | 123-76-2 |
| | | Ácido oxálico | 144-62-7 |
| | Alcohol | Etilenglicol | 107-21-1 |
| | | Dietilenglicol | 111-46-6 |
| | | Glicerol | 56-81-5 |

| | | | |
|--|----------|---------------------|-----------|
| | Polímero | Maltodextrina | 9050-36-6 |
| | Amida | Urea | 57-13-6 |
| | Lactona | Gamma valerolactona | 108-29-2 |

Se ensayo la síntesis de DES's mezclando los compuestos HBA's y HBD's a distintas temperaturas (90, 100 o 110 °C) y concentraciones (1:1, 1:2, 1:5, 1:10) con agitación constante. La formación de un líquido homogéneo indico la formación del DES's.

Los DES's obtenidos fueron sometidos a un proceso de escalado, para obtener un volumen de 300 mL. Se usaron entre 100 a 500 g de los componentes (HBA y HBD), puesto que se manejaron diferentes relaciones estequiométricas (entre 1:1 a 1:10, HBA:HBD respectivamente). Se uso un reactor de 1 L o en balones de 500 mL en baño de aceite (en función del volumen empleado). Los compuestos a mezclar se calentaron lentamente con agitación constante, hasta la mezcla homogénea de ambos compuestos. Posteriormente se calculó el rendimiento (relación entre el peso inicial de los compuestos y el final) y los DES's fueron sometidos a pruebas de caracterización.

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1. Síntesis y caracterización de especies aceptoras de hidrógeno (HBA).

Usualmente las sales de amonio funcionan como aceptoras de enlaces de hidrógeno (HBA's). Dentro de las sales de amonio la más usada y conocida es el cloruro de colina (ChCl), también llamado cloruro de 2-hidroxi-etil-trimetilamonio (131,133,135,136), comúnmente usada para la síntesis de los DES's. El ChCl actúa como HBA y es uno de los cationes no tóxicos más barato encontrado y puede obtenerse de manera natural (128,203). En esta tesis se han sintetizado dos nuevas disales de amonio que pueden tener las mismas propiedades del ChCl y generan otras alternativas a las escasas fuentes de cationes no tóxicos que se reportan hoy en día.

Las dos nuevas sales de amonio (no reportadas anteriormente en la literatura) sintetizadas fueron: Cloruro de 1,3 (bis)trietilamonio-2-propanol (Disal 1) y Cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol (Disal 2), a partir del derivado del glicerol 1,3 dicloro -2-propanol.

Los compuestos obtenidos (Disal 1 y Disal 2) cumplen con los requisitos para ser buenos HBA. Se ha descrito que las moléculas que pueden establecer un gran número de enlaces de

hidrógeno son potenciales HBA y en consecuencia pueden ser usados para la síntesis de los DES's, debido a que estos tipos de enlaces son clave para la formación estos solventes. En parte, porque comúnmente los DES's se forman por la complejación entre el HBA y HBD estabilizada por la deslocalización de la carga entre el anión y el HBD, todo ello como resultado de la mezcla por la formación de puentes de hidrógeno (204). La fuerza de los enlaces de hidrógeno formados entre los HBA y HBD es muy importante. Según Schwöbel y colaboradores (2009) quienes realizaron un estudio mediante un modelo químico cuántico, para predecir la fuerza del HBA y encontrando que las aminas son los grupos HBA más fuertes, seguidos por los alcoholes y éteres (205,206). Los fenoles y anisoles son grupos aceptores con una fuerza moderada mientras que los grupos funcionales unidos a sistemas aromáticos poseen HBA más débiles que los grupos alifáticos. Los átomos de carbono insaturado, halógenos y la mayoría de los grupos de azufre son grupos HBA débiles (205,206). A continuación, se describe la síntesis de los nuevos compuestos y potenciales HBA's.

4.4.1.1. Cloruro de 1,3 (bis)trietilamonio-2-propanol (Disal 1).

El esquema de síntesis del cloruro de 1,3 (bis)trietilamonio-2-propanol (Disal 1), se muestra en la Figura 4.1.

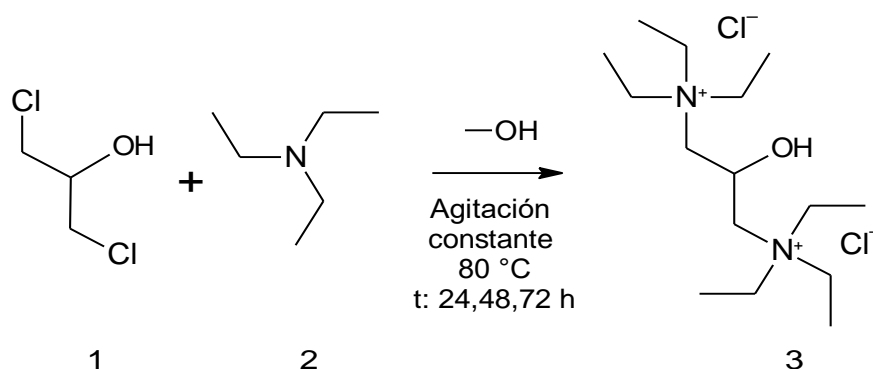


Figura 4.1. Esquema de síntesis del Cloruro de 1,3 (bis)trietilamonio-2-propanol (Disal1). Donde: **(1)**: 1,3dicloro-2-propanol. **(2)**: Solución etanólica de trietilamina 4,2 M. **(3)**: Compuesto sintetizado Disal 1.

La molécula sintetizada (3) posee en su estructura 2 aniones (Cl⁻), con lo cual puede desarrollar hasta 8 enlaces con hidrógeno, el doble que el ChCl que solo tiene un Cl⁻ y puede desarrollar cuatro enlaces de hidrógeno (207). También posee dos iones provenientes de las sales de

amonio cuaternario como componente catiónico (NH_4^+). El nitrógeno (N^+) al pertenecer al grupo 5 de la tabla periódica, es un elemento químico que recibe electrones fácilmente, considerado altamente electronegativo, que aporta a la estabilidad de los complejos formados. Además, el grupo OH cuyo oxígeno también es electronegativo puede incentivar la formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas.

Se realizaron ensayos con diferentes variables como la relación (p/p) entre el 1,3-dicloro-2-propanol (1) y la solución de trietilamina etanólica 4,2 M (2), el tiempo de reacción y la temperatura de cristalización. La temperatura de reacción fue de 80 °C. Los rendimientos se calcularon con la Ecuación 4.1 descrita en métodos. Las condiciones de reacción ensayadas se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Condiciones de reacción utilizadas en los ensayos para la síntesis de la Disal 1: Cloruro de 1,3 (bis)triethylamonio-2-propanol.

| Ensayo | Relación molar (1):(2) | Tiempo de reacción (h) | Temperatura de cristalización (°C) | Rendimiento (%) |
|--------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| A0 | 1:2 | 24 | 25 | 30 |
| A1 | 1:2 | 24 | -22 | 34 |
| A2 | 1:2 | 48 | -22 | 39 |
| A3 | 1:2 | 48 | 25 | 37 |
| A4 | 1:4 | 24 | -22 | 68 |
| A5 | 1:6 | 48 | -22 | 73 |
| A6 | 1:4 | 48 | -22 | 83 |
| A7 | 1:3 | 24 | -22 | 57 |
| A8 | 1:3 | 48 | -22 | 78 |

Donde: (1) es 1,3-dicloro-2-propanol y (2) solución de trimetilamina etanólica 4,2 M

Como se observa en la Tabla 4.2., los mayores rendimientos se produjeron con relaciones molares de 1:3, 1:4 y 1:6 con 48 h de reacción. De igual manera, la temperatura de cristalización que produjo el mayor rendimiento de producto fue en congelación a -22 °C. Las características físicas del compuesto fueron: sólido blanco higroscópico, típicas de este tipo de cloruros (202).

Las pruebas de solubilidad realizadas para determinar el solvente a usar en RMN, mostraron que la Disal 1 es soluble en agua, metanol, cloroformo y dimetilsulfóxido (DMSO) e insoluble en acetona. Considerando características como: la pureza del compuesto, el rendimiento obtenido y el menor gasto de insumos, se decidieron las condiciones para realizar el proceso de escalado de producción del compuesto deseado.

✓ RMN

Todos los compuestos obtenidos en cada ensayo fueron valorados por RMN (Anexos: Espectros RMN: Figuras A1-A7). En los espectros se identificaron las señales que indicaban la presencia del compuesto y pureza. En la Figura 4.2. se muestran los espectros correspondientes a los ensayos A1 y A6 respectivamente para la síntesis de la Disal 1.

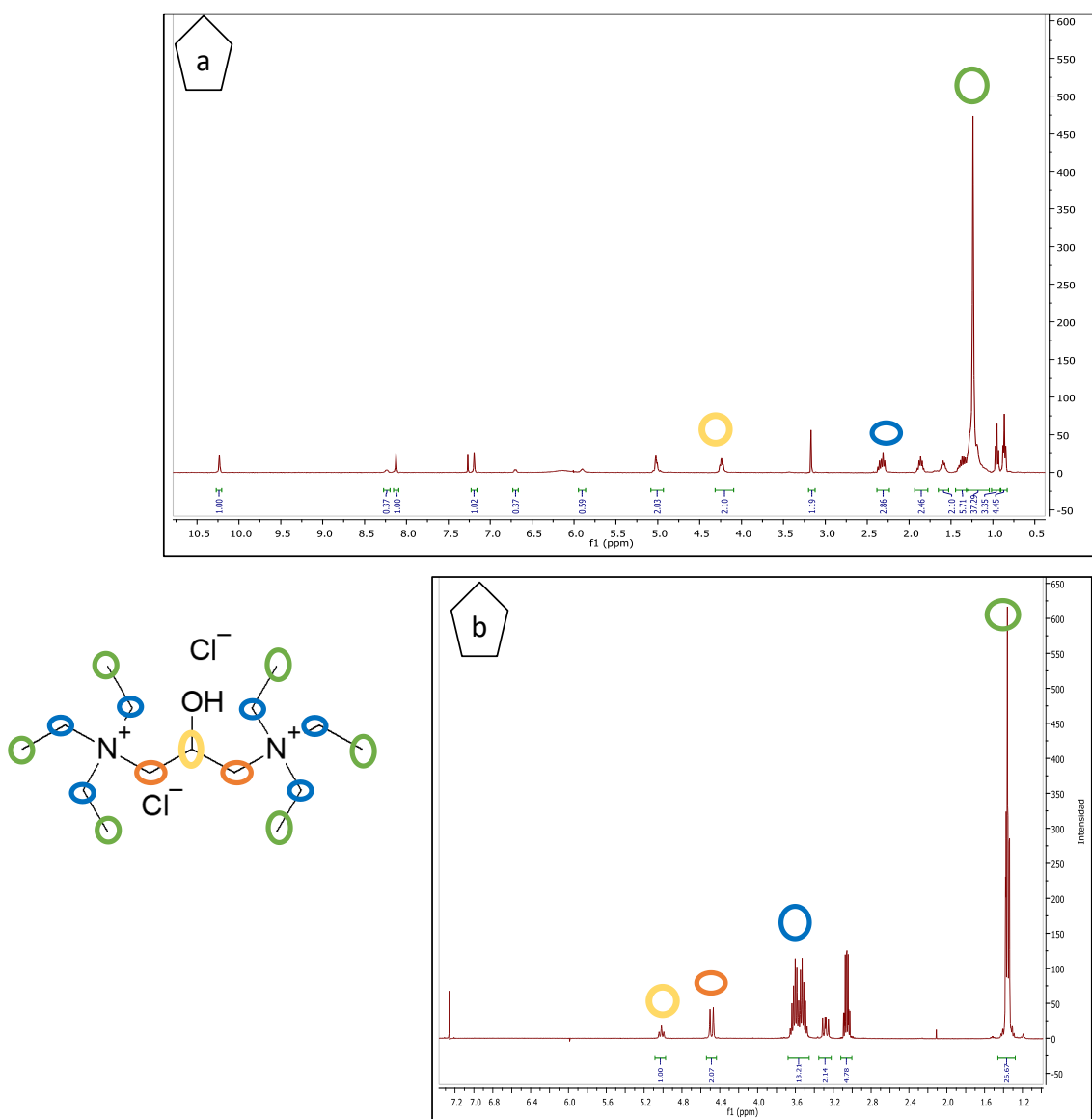


Figura 4.2. Espectros ^1H -RMN de los productos obtenidos en los ensayos para la síntesis de la Disal 1, espectro superior (a): Ensayo A1 (relación molar (1) y (2): 1:2, T: 80 °C, t: 24 h) y espectro inferior (b): ensayo A6 (relación molar (1) y (2): 1:4, T: 80 °C, t: 48 h).

En la parte a de la Figura 4.2 se observa el espectro correspondiente al producto obtenido en el ensayo de síntesis A1 de la Disal 1 relación molar 1:2, T: 80 °C, t: 24 h. En éste se pueden identificar algunas señales relacionadas con la estructura molecular de este compuesto (3). La señal más grande alrededor de 1,4 ppm y el triplete ubicado en 5 ppm se pueden asignar a los CH_3 de la molécula y al carbono enlazado con el OH respectivamente. Hay presencia de otras señales que pueden corresponder a impurezas, es el caso de las señales posteriores a 7 ppm y distintas señales pequeñas cercanas al 3 ppm, que pueden corresponder a sales (sales de amina no reaccionante) o los isómeros de la molécula de la disal 1. En este ensayo A1 el rendimiento de la reacción estuvo solo entre el 30 y el 39 %, principalmente debido al tiempo de reacción, que implica un rendimiento pobre, además el espectro no muestra una señal limpia del compuesto, lo que implica presencia de compuestos sin reaccionar. En la parte b de la Figura 4.2. se muestra el espectro RMN del ensayo A6 (relación molar 1:4, T: 80 °C, t: 48 h). Las señales mostradas por muestran un compuesto más puro y con un espectro más limpio, puesto que se ven claramente las señales que coinciden con el compuesto y no se ven impurezas como en el caso del espectro en la parte superior. En el espectro del ensayo A6, se ve claramente el triplete a 5 ppm se puede asignar al CH del carbono que esta enlazado con el OH. Y las señales entre 3,3 y 3,6 ppm se pueden asignar a los CH_2 de la molécula. Además, de la señal apantallada por los Cl^- ubicada en 1,4 ppm que corresponde a los CH_3 de la molécula de la Disal 1. Este ensayo también tuvo los rendimientos más altos (>80 %). La relación entre el alto porcentaje de rendimiento y las señales propias de este compuesto definidas en los espectros, hizo que las condiciones del ensayo A6, fueran las seleccionadas para el escalado.

4.4.1.2. Cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol (Disal 2)

La ruta de síntesis de la Disal 1: Cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol se muestra en la Figura 4.3.

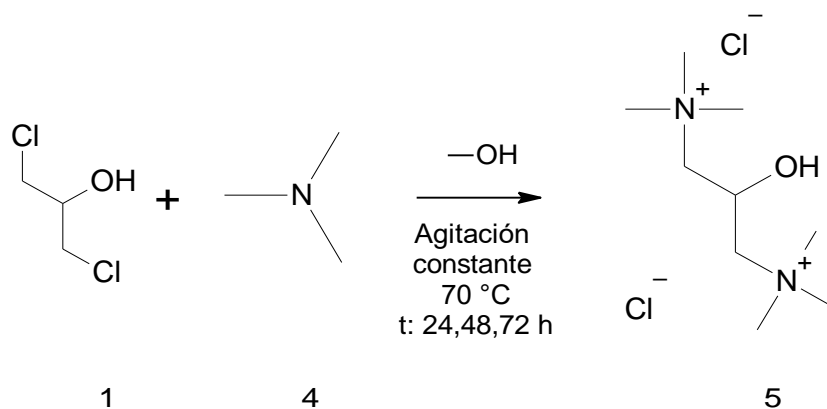


Figura 4.3. Esquema de síntesis del Cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol (Disal1). Donde: **(1)**. 1,3dicloro-2-propanol. **(4)**. Solución etanólica de trimetilamina 4,2 M. **(5)**: Compuesto sintetizado Disal 2.

Esta nueva molécula sintetizada (5), también posee en su estructura 2 aniones (Cl⁻), 2 cationes (N⁺) y un grupo OH. Por lo que teóricamente posee los grupos HBA fuertes que pueden desarrollar diversos enlaces de hidrógeno (hasta 8 enlaces por parte de los aniones) (205,206). Además, posee elementos electronegativos como los N⁺, que aporta estabilidad a los complejos formados y el grupo el grupo OH que puede incentivar la formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas (207). La diferencia con el anterior compuesto es debida a los compuestos reaccionantes y sus cadenas hidrocarbonadas unidas a la amina. En la primera disal se parte de una amina donde el N esta unido a 3 grupos etilo, y en el segundo a 3 grupos metilo.

Para la síntesis de la Disal 2, también se realizaron ensayos con distintas proporciones de los compuestos involucrados en la síntesis. (1) 1,3-dicloro-2-propanol y (4) solución de trimetilamina etanólica 4,2 M y el tiempo de reacción. Para este compuesto la cristalización desde el primer ensayo se dio de manera espontánea al adicionar la acetona a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), motivo por el cual esta no fue una variable a ensayar. Muchos aspectos pueden influir en la cristalización (condiciones físicas, químicas y hasta biológicas) y es difícil discernir cuál de las variables determinó el momento de cristalización (temperatura, pH, presión, campos magnéticos y eléctricos, saturación, etc) (21).

La temperatura de reacción fue de 70 °C y la proporción de compuestos ensayada, el tiempo de reacción y los rendimientos obtenidos se muestran en la Tabla 4.3. Los rendimientos se determinaron según la ecuación 4.1. descrita en los métodos

Tabla 4.3. Condiciones utilizadas en los ensayos para la síntesis de la Disal 2: Cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol. Temperatura de síntesis 70 °C y cristalización a 25 °C.

| Ensayo | Relación molar (1):(4) | Tiempo de reacción (h)* | Rendimiento (%) |
|--------|---------------------------|----------------------------|--------------------|
| B1 | 1:2 | 24 | 65 |
| B2 | 1:2 | 48 | 99 |
| B3 | 1:4 | 24 | 94,5 |
| B4 | 1:4 | 48 | 98 |
| B5 | 1:4 | 72 | 98 |
| B6 | 1:6 | 24 | 2,2 |
| B7 | 1:6 | 48 | 1,2 |
| B8 | 1:6 | 72 | 1,5 |
| B9 | 1:8 | 24 | 6,8 |
| B10 | 1:8 | 48 | 100 |
| B11 | 1:8 | 72 | 100 |

Donde: (1) es 1,3-dicloro-2-propanol y (4) solución de trimetilamina etanólica 4,2 M

*Posterior al tiempo de reacción la cristalización a temperatura ambiente (25°C aproximadamente).

Como se observa en la Tabla 4.3. con las condiciones de síntesis B2, B3, B4, B5, B10 y B11 se obtienen rendimientos mayores >90 %. Según García Calvo-Flores y su tabla de eficiencia de las reacciones según el porcentaje de rendimiento estos resultados se consideran excelentes para las reacciones de síntesis (208). Los rendimientos altos sugieren una reacción eficiente al igual que la pureza determinada con el análisis RMN. En todos los ensayos se obtuvo un compuesto con las siguientes características: sólido, blanco cristalino, higroscópico, típicos de este tipo de cloruros (202), soluble en agua, metanol, cloroformo e insoluble en acetona y DMSO. Para este caso, el principal criterio a considerar para elegir las condiciones de reacción a escalar, es escoger aquella que implique ahorro de reactivos, puesto que los rendimientos han sido excelentes.

✓ RMN

Todos los compuestos obtenidos en ensayos realizados para la síntesis de la Disal 2, fueron analizados por RMN (Anexos: Espectros RMN, Figuras A8-A13). En la Figura 4.4. podemos observar el espectro correspondiente al ensayo B2 para la síntesis de la Disal 2.

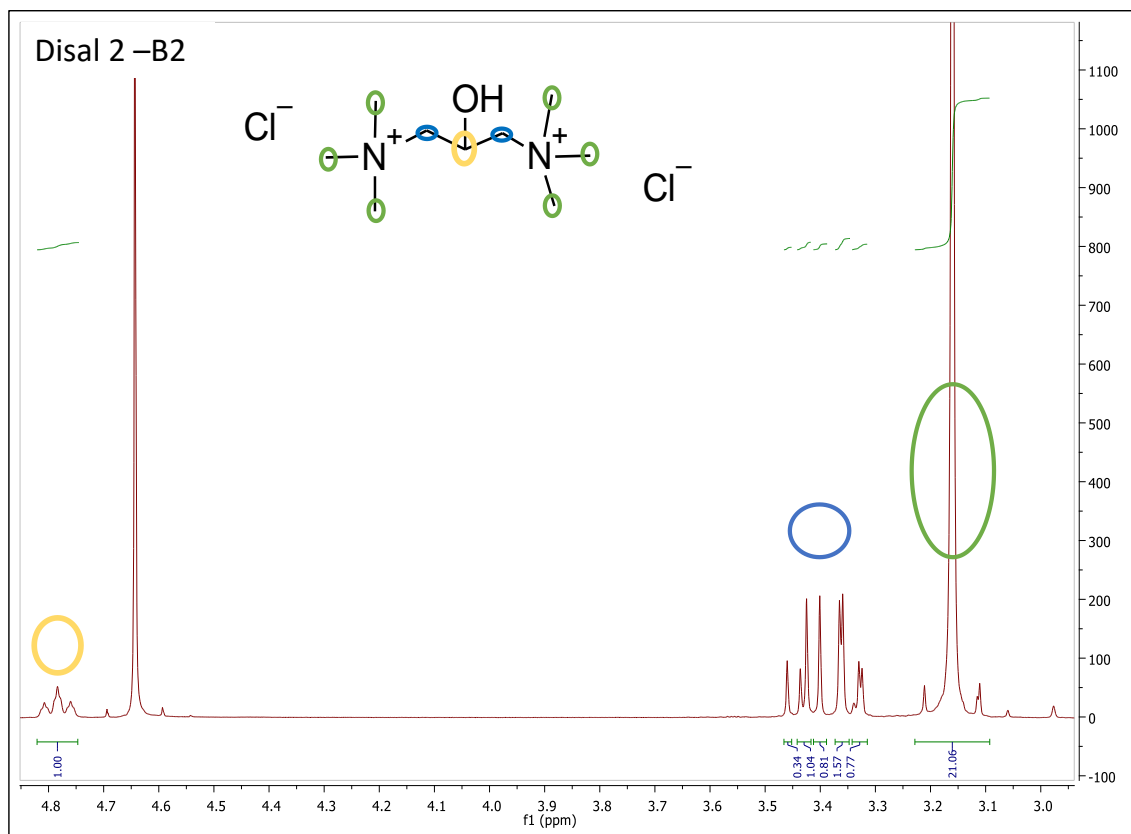


Figura 4.4. Espectro ^1H -RMN del compuesto obtenido en el ensayo B2 (relación molar entre (1) y (4): 1:2, T: 70 °C, t: 48 h) para la síntesis de la Disal 2 (5), con las señales características para la molécula. Amarillo (C1), naranja (C2 y C3) y verde corresponde a los metilos (C y C')

En la Figura 4.4. evidenciamos el espectro de ^1H -RMN realizado con D_2O para la Disal 2, el cual es acorde con lo esperado para la estructura de la molécula. El triplete a 4,9 ppm corresponde al CH del carbono enlazado con el OH. Y las señales entre 3,45 y 3,65 ppm se pueden asignar a C2 y C3, es decir a los CH_2 . Además, la señal en 3,3 se identifica como la correspondiente a los CH_3 (metilos). Teniendo en cuenta las señales claras mostradas por el espectro la pureza mostrada por el compuesto en este ensayo (ensayo 2, relación molar 1:2, t: 48 h) se seleccionó como el más apropiado para escalar, además de contar con un rendimiento excelente (99 %) casi cuantitativo para la síntesis de la Disal 2.

Los demás ensayos realizados para la síntesis de la Disal 2, también fueron analizados pro RMN identificando en todas las señales características del compuesto que fueron integradas para su

corroboración con el número de protones. En la Figura 4.5., se observa otro espectro de estos ensayos, esta vez correspondiente al ensayo B10.

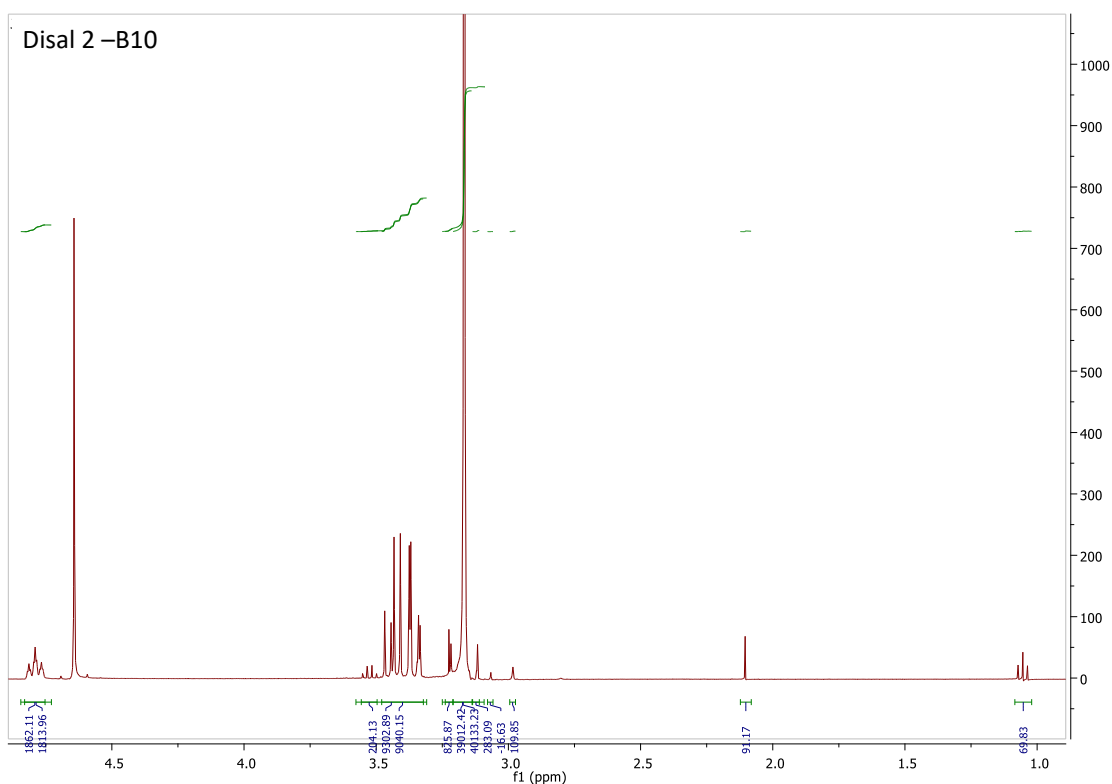


Figura 4.5. Espectro ^1H -RMN del ensayo B10 para la síntesis de la Disal 2 (relación molar entre (1) y (4): 1:8, t: 72h; 100 % R).

Como se observa en la Figura 4.5., el espectro contiene señales similares a las vistas anteriormente para la Disal 2, salvo por la presencia de unas pequeñas señales extra en la zona de 1 a 3 ppm. La presencia de otras señales usualmente denota impurezas, que, para este caso, pueden provenir del exceso de trietilamina no reaccionante por las proporciones manejadas.

Por otro lado, los análisis de las RMN denotaron que todos los ensayos obtuvieron el compuesto deseado, pero el ensayo a escalar se eligió teniendo en cuenta el espectro, el rendimiento, pero sobre todo el gasto de insumos y energía. Para la disal 2, el ensayo seleccionado fue el B2.

4.4.1.3. Caracterización las Disales

Uno de los objetivos de los nuevos compuestos sintetizados (Disales 1 y 2) es su uso como HBA. La caracterización es parte importante de la identificación de un compuesto por esto se usaron métodos como RMN (descrito anteriormente), FT-IR, CCA y pf.

4.4.1.3.1. FT-IR

Los resultados de los ensayos de la síntesis de las disales se analizaron por FT-IR y los espectros obtenidos se procesaron con el programa Spectra-manager. En los Anexos se presenta la Tabla A3 de asignaciones de las señales más comunes de los grupos funcionales y enlaces de los compuestos de los espectros de FT-IR en relación a la longitud de onda (cm^{-1}) (167,194,209–212). Las señales mostradas en los espectros FT-IR corresponden por definición a los movimientos de los átomos de las moléculas y sus enlaces. Hay 6 tipos de movimientos principales correspondientes a vibraciones de estiramiento (ν_e), que pueden ser simétricas o asimétricas y vibraciones de flexión (ν_f) que pueden ser de tijera, balanceo, meneo o torsión (213). En la Figura 4.6. se observan los espectros FT-IR de las nuevas sales de amonio sintetizadas, la Disal 1 y la Disal 2.

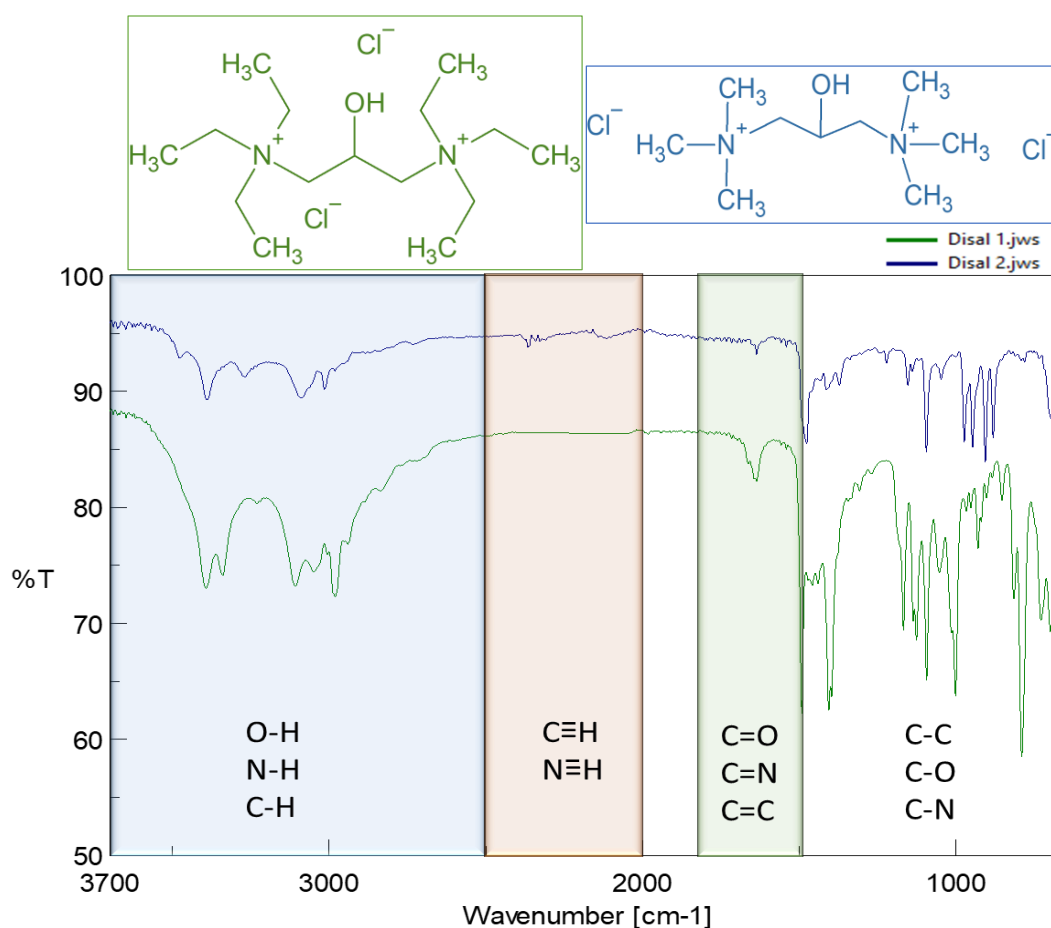


Figura 4.6. Estructura y espectro FT-IR de las Disal 1 (verde) y Disal 2 (azul) con las zonas de los enlaces demarcadas. Franja azul: enlace simple O-H, N-H, C-H; franja naranja: dobles enlaces y franja sin color (menos de 1500 cm^{-1}) zona de la huella dactilar de los compuestos (enlaces simples C-C, C-O, C-N).

En la Figura 4.6., se identifican las señales características para la molécula de la Disal 1 (D1) y Disal 2 (D2), que poseen un O-H y 2 aminas con sus enlaces C-N. En este espectro se evidencian las señales de la ν del O-H alrededor de 3395 y 3476 cm^{-1} para la D1 y D2 respectivamente. Las bandas en la región de 3700-3100 cm^{-1} pueden atribuirse típicamente a las diversas ν del hidroxilo (O-H) lo cual ya ha sido descrito por varios autores (194,211,213,214). Ambas disales muestran la señal alrededor de 1636 cm^{-1} correspondiente a la ν simétrica de flexión del N-H, en 1391 y 1370 cm^{-1} la ν de torsión del enlace C-N (211) para la D1 y D2. Además, se evidencian las señales en 1094 cm^{-1} correspondientes a la ν asimétrico del enlace C-N (amina alifática) y en 3000 y 2981 cm^{-1} para la ν asimétrico y simétrico de los $-\text{CH}_3$ para ambas disales. Para la D1, las señales en 2900 y 2898 cm^{-1} son asociadas al ν simétrico y asimétrico del grupo $-\text{CH}_2$ y la ubicada en 1492 cm^{-1} es la señal de ν deformación del $-\text{CH}_2$. (194,211,213,214).

4.4.1.3.2. Punto de fusión nuevas Disales (HBA's) sintetizados

Dentro de los compuestos usados como HBA's las sales de amonio son muy usadas principalmente en la síntesis de algunos tipos de DES's. Las más conocidas son el ChCl principalmente, pero también otros cloruros como el de tetrametilamonio, metiltrioctilamonio, dodeciltrimetilamonio, tetraetilamonio y tetrabutilamonio. Además de bromuros como el de tetrabutilfosfonio, tetraetilamonio y tetrapropilamonio (215). En general, la mayoría de las sales de amonio tienen puntos de fusión más altos en comparación con otro tipo de compuestos y prácticamente no tienen olor (216).

Para medir el punto de fusión se utilizaron 2 equipos diseñados para esto, el llamado Gallenkamb y Fisherbrand. La diferencia entre uno y otro es que el primero es un equipo muy antiguo (básico y de menor tecnología) y el otro es un equipo nuevo. Las medidas se realizaron por triplicado, dando como resultado el promedio (que para estos casos fue el mismo). Con el equipo de Gallenkamb, el procedimiento consistió en poner la muestra en el vial capilar, ponerla en el espacio destinado para lectura del equipo y luego activar la subida de temperatura e ir mirando por el visor el momento en que se ve la primera gotilla fundida del compuesto e inmediatamente revisar la temperatura que era marcada en un termómetro de mercurio con capacidad hasta de 300 °C (Se utilizó este termómetro porque normalmente las sales de amonio tienen puntos de fusión mayor a 200 °C). Una vez tomada la temperatura, se debía dejar enfriar el equipo y luego volver a repetir la medida, con otro capilar, normalmente el equipo se enfriaba en varias horas, por lo que las medidas se realizaron una vez al día hasta tener 3 para cada compuesto. El punto de fusión del HBA más usado comúnmente, el ChCl es de 302 °C, otras sales

de amonio poseen puntos de fusión mucho más altos como el cloruro de tetrametilamonio cuyo punto de fusión es de 425 °C. Con el equipo de Fisherbrand no era necesario el uso de un termómetro, puesto que este digital y tiene una pantalla digital donde puedes indicar la ratio de temperatura y guardar los datos cuando tomas la medida. En este equipo, las 3 muestras de cada compuesto se midieron al tiempo, colocando cada una en un capilar y se introdujo en el equipo y se midió la temperatura de fusión.

El promedio de los puntos de fusión medidos para cada compuesto en ambos equipos fue de 235 °C para la disal 1 y 255 °C para la disal 2. Estas medidas están dentro del orden normal para este tipo de compuestos, comparados con el ChCl son puntos de fusión más bajos. También son más bajos el punto de fusión del bromuro de tetraetilamonio (286 °C) y el bromuro de tetrapropilamonio (266 °C). Sin embargo, estos puntos de fusión son más altos que el bromuro de metiltrifenilfosfonio (234 °C).

4.4.1.3.3. Capacidad de absorción de agua (CAA)

La capacidad de absorción de agua es una característica muy valorada para algunos compuestos, puesto que la extracción de agua del aire es una prometedora forma de suministrar agua dulce, especialmente en regiones remotas y áridas que carecen de suministro hídrico (217). Hoy en día existen diversos materiales que son capaces de absorber agua del ambiente, pero estos suelen ser costosos.

Los compuestos (HBA's) sintetizados son altamente higroscópicos, uno de los motivos por los cuales se puso a prueba su CCA. Se realizaron ensayos poniendo en un vial una cantidad determinada de cada compuesto y dejándolo destapado en ambiente controlado (temperatura 25 °C y humedad relativa 50 %), consiguiendo diario de peso durante 15 días. El porcentaje de absorción de agua se calculó por diferencia de pesos. Los resultados de los ensayos realizados durante 15 días se muestran en la Figura 4.7.

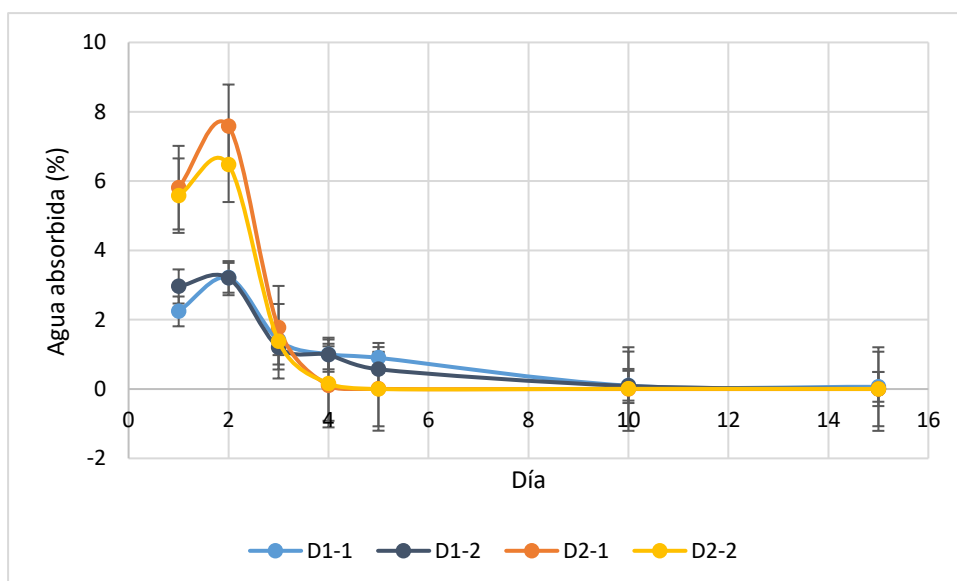


Figura 4.7. Porcentaje de absorción promedio de agua obtenidos por la Disal 1 (ensayo y duplicado, azul claro y oscuro, respectivamente) y la Disal 2 (ensayo y duplicado, naranja y amarillo respectivamente) durante 15 días.

Como se observa en la Figura 4.7., la absorción de agua por parte de la Disal 2 es más del doble que la de la Disal 1. Y el mayor porcentaje de absorción de agua para ambas disales se da en los 2 primeros días. Luego del tercer día la absorción de agua cae a 1 % tanto en la Disal 1 como en la Disal 2. Para el cuarto día la absorción de agua de la Disal 2 es cercana a 0 (los valores están alrededor de 0,0097 y por debajo) y así se mantiene hasta completar los 15 días. Mientras que la Disal 1 parece absorber un porcentaje de agua cercano al 1 % hasta el 8 día que es cuando los valores disminuyen hasta convertirse en 0 % también en el día 10. Con estos ensayos queda claro que la Disal 2 absorbe mayor cantidad de agua que la Disal 1. Además, durante los primeros 8 días se mantiene la absorción de agua por parte de los compuestos, pero es en los primeros 3 días que se absorbe la mayor cantidad de agua (95 % aproximadamente) que pueden absorber estas Disales. En la Tabla 4.4., se muestran los valores totales de absorción de agua obtenidos en estos ensayos.

Tabla 4.4. Porcentaje de absorción de agua (% R) para las disales sintetizadas: Disal 1: cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol y Disal 2: cloruro de 1,3 (bis)trietilamonio-2-propanol (desviación estándar (s.d.), n=2).

| Disal | % R | Absorción de H ₂ O | s.d. |
|-------|-----|-------------------------------|------|
|-------|-----|-------------------------------|------|

| | | |
|---|-------|------|
| 1 | 8,97 | 0,06 |
| 2 | 14,44 | 1,18 |

La Disal 2 presenta mayor porcentaje de absorción de agua en comparación con la Disal 1, casi del doble, es decir que la Disal 2 podría tener mayor potencial de CCA. Los compuestos como las sales higroscópicas pueden ser incorporados en matrices (de materiales como alginatos) que permitan recoger de manera más estable el agua absorbida. Como lo evidenció el estudio de Kallenberger y colaboradores (217) que uso sales de cloruro de calcio incorporadas en una matriz derivada de alginato, con la que obtuvo perlas esféricas del compuesto con el agua incorporada (217). Los usos de los materiales con CCA deben cumplir con tres aspectos importantes: el material tiene que adsorber o absorber grandes cantidades de agua con respecto al peso y/o volumen, la captación de agua debe ser posible a humedad relativa baja, y el agua debe ser liberada a bajas temperaturas (217).

Para verificar el potencial de la Disal 2 para absorber agua, se sometió a seguimiento individual durante 15 días, con una superficie de exposición mayor. Se sabe que la dinámica de equilibrio del agua (por ejemplo, la difusividad), así como la dinámica colectiva de los enlaces de hidrógeno) y las interacciones que media están a su vez influidas por la superficie (218).

En la Figura 4.8, se muestran los resultados de los 15 días de seguimiento. El porcentaje de absorción de agua (CCA %) se graficó en relación con el tiempo.

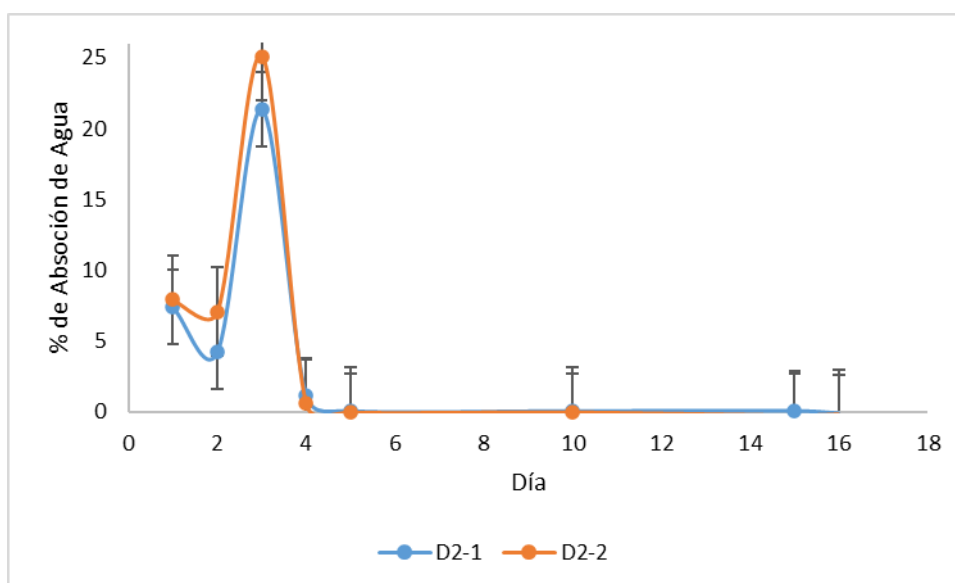


Figura 4.8. Porcentaje de absorción de agua Disal 2 durante 15 días. Los colores corresponden al ensayo y su duplicado (Azul y naranja respectivamente).

En este ensayo la Disal 2 absorbió en total un 37,3 % de agua ($n=2$, s.d. = 4,35). Es decir, en total paso de 14 a 37 %. Como se evidencia en la Figura 3.6. durante primeros 5 días se absorbe agua y la mayor cantidad de agua durante los primero 3 días, a partir de los cuales el porcentaje absorbido es mínimo. El aumento del porcentaje de absorción de agua, al aumentar su superficie de exposición al ambiente, concuerda con lo mencionado por Monroe y colaboradores (218) que al exponer mayor superficie del compuesto higroscópico ayuda a mayor absorción de agua. La absorción de agua fue evidenciada además del diferencial gravimétrico por el cambio de estado del compuesto, ya que paso de ser un sólido blanco a un líquido transparente.

El compuesto líquido obtenido se sometió a destilación, esto para evidenciar la posibilidad de recuperación útil del agua absorbida (desorción). Para esto se utilizó un sistema de destilación (Figura 4.9.). La destilación permitió recuperar un 36,2 %, es decir que de los 44 g de agua absorbida por la Disal 2, se recuperaron 16,3 g.



Figura 4.9. Montaje de destilación usado para extraer el agua absorbida por la Disal 2.

Una de las características importantes para los compuestos que pueden absorber agua, es que tengan buena permeabilidad al vapor, que el agua recogida pueda liberarse a máximo 100 °C (puesto que potencialmente permitiría una aplicación con energía solar) y que posean una ruta sintética con materiales baratos, no tóxicos y de fácil acceso (217). Las dos últimas podrían ser valoradas para el compuesto sintetizado ya que proviene de un derivado del glicerol que puede ser extraído de residuos de la agroindustria. Además, el agua absorbida por la disal 2 puede liberarse a temperaturas alrededor de 100 °C, estas temperaturas podrían ser proporcionadas por radiación solar o por ejemplo, tubos solares de vacío (217).

De la destilación se obtuvo una parte de Disal 2 diluida en agua (D2+H₂O) que no destiló y la fracción del destilado (agua). La parte de D2+H₂O se sometió a la misma prueba de absorción de agua y fue capaz de reabsorber otro 10 % de agua. Es decir que este compuesto podría llegar a absorber alrededor de un 46 % de agua en total con porcentaje de recuperación del 35 % en humedades relativas entre el 60-100 %. El hecho de que absorba agua en humedades relativas media-altas, sería un aspecto negativo para su uso en lugares áridos, al igual que en otros compuestos que han reportado captación de mucho mayor pero por encima del 50 % de humedad relativa (217).

4.4.1.4. Escalado de las mejores condiciones de síntesis para la producción de las disales.

Las nuevas disales sintetizadas fueron escaladas en un reactor de 5 L, para obtener al menos 1 Kg de cada disal (para las pruebas de síntesis de los DES's). Los ensayos seleccionados para el escalado fueron para la D1 el A6 y para la D2 el B4, en estos ensayos inicialmente se habían 11 y 10 g respectivamente. Para el escalado de la Disal 1 se usaron las condiciones de síntesis del ensayo A6 (relación molar (1) y (2): 1:4, T: 80 °C, t: 48 h). Para la Disal 2 se usaron las condiciones del ensayo B2 (relación molar entre (1) y (4): 1:2, T: 70 °C, t: 48 h). El montaje usado para la producción en mayor escala se muestra en la Figura 4.10.

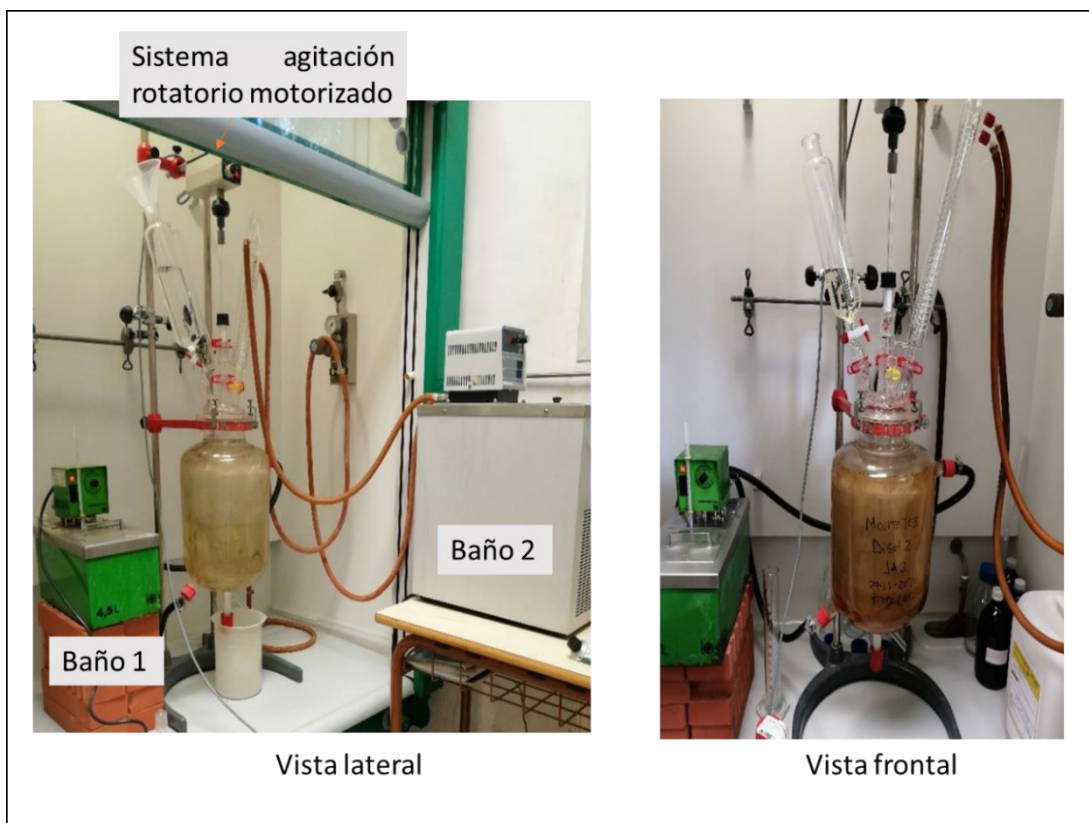


Figura 4.10. Foto del montaje usado para el escalado de la producción de las Disales 1 y 2.

El reactor con camisa usado fue cuidadosamente limpiado para cada cambio de producto a sintetizar al igual que la barra agitadora de pala basculante de PTFE. La mezcla de solventes que envolvía la camisa fue etilenglicol:agua en proporción 70:30. La temperatura del baño 1 se mantuvo en $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la primera parte de la reacción que requería la mezcla de los compuestos reactantes y en $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la segunda parte (síntesis por 48 h). El sistema de reflujo se llevó a cabo conectando el condensador al baño 2 (el solvente usado fue agua), en el controlador se limitó la temperatura a la que se deseaba tener el sistema (10 o $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ según la estación del año en la que se realizaron los ensayos).

Los rendimientos obtenidos de los ensayos de escalado se calcularon según la Ecuación 4.1. y se realizaron en varios lotes de producción, la pureza de los compuestos también fue valorada con los espectros de RMN. Los resultados se pueden observar en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Escalado de producción de las disales 1 y 2.

| Disal | Lote | Cantidad obtenida (g) | Rendimiento (%) | Cantidad total |
|-------|------|-----------------------|-----------------|----------------|
|-------|------|-----------------------|-----------------|----------------|

| Sintetizada (g) | | | | |
|-----------------|---|--------|-------|---------|
| D1 | 1 | 288,33 | 86,46 | 1200,41 |
| | 2 | 299,85 | 89,91 | |
| | 3 | 305,32 | 91,55 | |
| | 4 | 306,91 | 92 | |
| | | | | |
| D2 | 1 | 247,21 | 100 | 1046,51 |
| | 2 | 540,12 | 100 | |
| | 3 | 259,18 | 100 | |

Se escaló en el reactor de 5 L y se realizaron 4 lotes de producción de la Disal 1. Los rendimientos obtenidos estuvieron entre el 86 y el 92 % (y fueron diferentes en los 4 lotes de escalado), siendo mayores a los reportados inicialmente en el ensayo A6 (83 %). Se obtuvo aproximadamente 1200 g en total de la disal 1 que se usaron para la síntesis DES's.

Para el escalado de la Disal 2 se usaron las condiciones de síntesis del ensayo B4, se realizaron 3 lotes de producción del compuesto en el reactor de 5 L. Se obtuvo aproximadamente 1050 g de la Disal 2 en total, que fueron usados para la síntesis DES's. Los rendimientos del producto obtenido puro en los ensayos de escalado fueron cuantitativos (100 %).

4.4.2. Síntesis de DES

Se ha definido a los DES's como una mezcla altamente no ideal de dos componentes biodegradables (HBA y HBD) asociados con fuertes interacciones de enlace de hidrógeno, que tendrán un punto de fusión inferior a los puntos de fusión del HBA y del HBD. Al ser usualmente líquidos, los DES'S se puede definir como líquidos producidos por una mayor depresión del punto de congelación (215). Los DES's tienen características únicas que los hacen muy llamativos para la industria. Primero pueden ser diseñados y además a partir de combinaciones de dos compuestos fácilmente biodegradables. Segundo son más baratos que los solventes tradicionales y no suelen necesitar purificación. Además, son biocompatibles y biodegradables. Por estas razones, se ha observado un crecimiento considerable en el diseño y las aplicaciones de los DES's (215).

Las aplicaciones de los DES's son innumerables, estas van desde el uso como solventes, medios de reacción, para la extracción de compuestos y biocompuestos, en cromatografía, hasta la

aplicación en procesos biomédicos, donde ya se han usado como vehículos para el transporte de medicamentos (133,146).

Entendiendo la importancia de los DES's en las nuevas necesidades de industrialización. Las NUEVAS Disales sintetizadas son compuestos que por su estructura molecular se pueden usar como compuesto aceptor de hidrógeno (HBA). Para la síntesis de los NUEVOS DES's se usaron la Disal 1 (Cloruro de 1,3 (bis)triethylamonio-2-propanol) y la Disal 2 (Cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol) como HBA's. Además, se usaron compuestos orgánicos típicamente reportados como donadores de hidrógenos (HBD's) como el ácido cítrico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido levulínico, glicerol, urea, dietilenglicol, etilenglicol y maltodextrina, para ser mezclados con los HBA's en distintas concentraciones y tratar de obtener NUEVOS DES's

4.4.2.1. DES a partir de disal 1.

Para la síntesis de NUEVOS DES's se usó la Disal 1 (Cloruro de 1,3 (bis)triethylamonio-2-propanol) como HBA y compuestos orgánicos típicamente reportados como el ácido cítrico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido levulínico, glicerol, urea, dietilenglicol, etilenglicol y maltodextrina, como compuestos donadores de hidrógenos (HBD's). Los DES's se caracterizan por formar una red supramolecular tridimensional mediante enlaces de hidrógeno intermoleculares (219) y son usualmente líquidos. El procedimiento de síntesis de los DES's consistió en mezclar la Disal 1 (HBA) con los HBD's, bajo agitación constante, a una temperatura indicada hasta la formación de un líquido homogéneo. Se realizaron más de 40 ensayos con distintas mezclas entre la Disal 1 y HBD's. En la Tabla 4.6. se muestran los ensayos realizados y sus condiciones (proporción p/p, temperatura y tiempo).

Tabla 4.6. Ensayos para la síntesis de nuevos DES's usando como HBA la Disal 1, proporciones de sus componentes, tiempo y temperaturas de reacción.

| Ensayo | HBD | Proporción HBA:HBD | Temperatura (°C) | Tiempo | Formación de DES |
|--------|---------------|-----------------------|------------------|--------|------------------|
| 1-2-3 | Ácido cítrico | 1:2 | 90/100/110 | 8 h | NO |
| 4-5-6 | Ácido cítrico | 1:5 | 100 /110 | 8 h | NO |
| 7 | Ácido cítrico | 1:10 | 110 | 8 h | NO |
| 8-9-10 | Glicerol | 1:1 | 90/100/110 | 8 h. | NO |

| | | | | | |
|--|-----------------------|-------------|-------------------|----------------|-----------|
| 11 | Glicerol | 1:2 | 90 | 15 min. | SI |
| 12 | Glicerol | 1:5 | 90 | 15 min. | SI |
| 13-14-15 | Ácido láctico | 1:1 | 90/100/110 | 8 h | NO |
| 16 | Ácido láctico | 1:2 | 90 | 15 min. | SI |
| 17 | Ácido láctico | 1:5 | 90 | 15 min. | SI |
| 18-19-20 | Dietilenglicol | 1:1 | 90/100/110 | 8 h | NO |
| 21 | Dietilenglicol | 1:2 | 90 | 15 min. | SI |
| 22 | Dietilenglicol | 1:5 | 90 | 15 min. | SI |
| 23-24-25 | Maltodextrina | 1:2, | 90/100/110 | 8 h | NO |
| 26-27-28 | Maltodextrina | 1:5 | 90/100/110 | 8 h | NO |
| 29-30-31 | Maltodextrina | 1:10 | 90/100/110 | 8 h | NO |
| 32-33 | Urea | 1:2 | 90 /110 | 8 h | NO |
| 34-35 | Urea | 1:5 | 90 /110 | 3 h | SI |
| 36 | Urea | 1:10 | 110 | 3 h | SI |
| 37 | Ácido levulínico | 1:2 | 90 | 8 h. | NO |
| 38 | Etilenglicol | 1:2 | 90 | 15 min. | SI |
| 39 | Etilenglicol | 1:5 | 90 | 15 min. | SI |
| 40-41-42 | Ácido oxálico | 1:2 | 90/100/110 | 8 h | NO |
| 43-44-45 | Ácido oxálico | 1:5 | 90/100/110 | 3 h. | SI |
| Subrayados en negrilla las condiciones que obtuvieron formación de los DES | | | | | |

Como se muestra en la Tabla 4.6. subrayados en negrilla se muestran los 11 DES's formados a partir de la Disal 1 como HBA y los HBD's: ácido láctico, glicerol, dietilenglicol, urea, etilenglicol y ácido oxálico con distintas proporciones (1:2, 1:5 y 1:10). Las mezclas con agitación constante se sometieron a temperaturas diferentes (de ser necesario) para la formación del DES. Se ensayaron hasta 3 temperaturas, se comenzó con 90 °C y el tiempo de reacción fue de 8 h, en el cual si no se formaba el DES (líquido homogéneo) se pasó a la segunda temperatura 100 °C. Se repitió el tiempo de reacción (8 h) y si no se formaba el DES se pasó a la temperatura de 110 °C que fue la máxima utilizada en la que se mantuvo las reacciones al menos 8 h. El tiempo mínimo de reacción de la mezcla con temperatura y agitación constante fue de 8 h.

Para los 11 DES's formados la tendencia general que fueron líquidos a temperatura ambiente, si el HBD que lo conformaba era líquido. Este es el caso de los 2 DES's formados entre la Disal 1 y los HBD's líquidos: glicerol, ácido láctico, dietilenglicol y etilenglicol que se formaron en proporciones 1:5 y 1:10 entre el HBA y HBD. Dada esta tendencia casi todos los DES's fueron

líquidos excepto los formados por urea y ácido oxálico como HBD. Los DES's formados con urea como HBD formaron un líquido incoloro homogéneo a temperatura de 110 °C, pero a temperatura ambiente fueron sólidos y de color blanco. Por su parte el DES's formado con ácido oxálico era líquido a temperatura de 110 °C, pero al enfriarse formo un material pastoso.

Como se observa en la tabla, la formación de los DES's no se dio entre todas las mezclas del HBA (Disal 1) y los HBD's. No fue posible la formación de DES's con el ácido cítrico ni la maltodextrina en ninguna de las 3 relaciones p/p probadas (1:2, 1:5 y 1:10) entre el HBA y HBD. Tampoco se formó entre la Disal 1 y ácido levulínico, que pesé a ser líquido no se veía homogéneo. Con el ácido láctico, glicerol, dietilenglicol, urea y ácido oxálico, se ensayaron relaciones molares 1:1 y 1:2 entre el HBA y el HBD sin obtener formación de ningún DES. En general no se observaron cambios físicos en las mezclas que no se convirtieron en DES, salvo para el ácido cítrico, donde en el ensayo con la mayor temperatura (110 °C) y la relación 1:10 entre HBA:HBD, se manifestó un cambio de color (de blanco a naranja) y textura (esponjosa) en los productos de la reacción. Esto debido posiblemente a que se comenzó a dar una polimerización del ácido cítrico con la disal. La reacciones de polimerización del ácido cítrico con otros compuestos son usadas para la obtención de polímeros y como materiales adhesivos (220,221). Estas reacciones pueden darse en un rango amplio de temperaturas que incluye los 110 °C (222). Dada la posibilidad mostrada por estos estudios, se realizaron una serie de ensayos con el polímero formado como material adhesivo, consistieron en intentar unir distintos materiales como madera y papel con una capa del polímero. El resultado de estos ensayos arrojo que el polímero formado no tiene efecto adhesivo. En algunas mezclas que no llegaron a ser líquidos homogéneos, hubo solubilización parcial de los componentes, pero pasado el tiempo de reacción a la temperatura constante no se logró la mezcla homogénea, este fue el caso para la maltodextrina y el ácido levulínico.

4.4.2.2. DES a partir de disal 2.

Continuando con los ensayos para la obtención de NUEVOS DES's se usó la Disal 2 (Cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol) como HBA y compuestos orgánicos típicamente reportados como el ácido cítrico, ácido láctico, ácido oxálico, glicerol, urea, dietilenglicol, etilenglicol, maltodextrina y valerolactona, como compuestos donadores de hidrógenos (HBD's). El procedimiento de síntesis de los DES's consistió en mezclar la Disal 2 (HBA) con los HBD's, bajo agitación constante, a una temperatura indicada hasta la formación de un líquido homogéneo. Se realizaron más de 60 ensayos con distintas mezclas entre la Disal 2 y HBD's. En la Tabla 4.7. se muestran los ensayos realizados y sus condiciones (proporción p/p, temperatura y tiempo).

Tabla 4.7. Ensayos para la síntesis nuevos DES's usando como HBA la Disal 2, proporciones de sus componentes, tiempo y temperaturas de reacción.

| Ensayo | HBD | Proporción HBA:HBD | Temperatura (°C) | Tiempo | Formación de DES |
|----------|----------------|-----------------------|---------------------|---------|------------------|
| 1-2-3 | Ácido láctico | 1:2 | 90/100/105 | 2 h | SI |
| 4-5-6 | Ácido láctico | 1:5 | 90/100/105 | 2 h | SI |
| 7-8 | Glicerol | 1:2 | 90/100 | 3 h | SI |
| 9 | Glicerol | 1:5 | 100 | 59 min. | SI |
| 10-11-12 | Dietilenglicol | 1:2 | 90/100/110 | 72 h | NO |
| 13-14-15 | Dietilenglicol | 1:5 | 90/100/110* | 55 min. | SI |
| 16 | Dietilenglicol | 1:10 | 110* | 45 min. | SI |
| 17-18-19 | Urea | 1:2 | 90/100/110 | 72 h | NO |
| 20-21-22 | Urea | 1:5 | 90/100/110 | 24 h | SI |
| 23 | Urea | 1:10 | 110 | 24 h | SI |
| 24-25-26 | Etilenglicol | 1:2 | 90/100/110 | 72 h | SI |
| 27 | Etilenglicol | 1:5 | 110 | 12 h | SI |
| 28-29-30 | Acido oxálico | 1:2 | 90/100/110 | 4 h | SI |
| 31-32-33 | Acido oxálico | 1:5 | 90/100/110 | 72 h | NO |
| 34-35-36 | Acido oxálico | 1:10 | 90/100/110 | 24 h | NO |
| 37-38-39 | Ácido cítrico | 1:2 | 90/100/110 | 48 h | NO |
| 40-41-42 | Ácido cítrico | 1:5 | 90/100/110 | 72 h | NO |
| 43-44-45 | Ácido cítrico | 1:10 | 90/100/110 | 72h | NO |
| 46-47-48 | Maltodextrina | 1:2 | 90/100/110 | 72 h | NO |
| 49-50-51 | Maltodextrina | 1:5 | 90/100/110 | 72 h | NO |
| 52-53-54 | Maltodextrina | 1:10 | 90/100/110 | 72 h | NO |
| 55-56-57 | Valerolactona | 1:2 | 90/100/110 | 72 h | NO |
| 58-59-60 | Valerolactona | 1:5 | 90/100/110 | 72 h | NO |
| 61-62-63 | Valerolactona | 1:10 | 90/100/110 | 72 h | NO |

Como se muestra en la Tabla 4.7 subrayados en negrilla se ven los 11 DES's formados a partir de la Disal 2 (HBA) y los HBD's: ácido láctico, glicerol, dietilenglicol, urea, etilenglicol y ácido oxálico con distintas proporciones (1:2, 1:5 y 1:10). Las mezclas con agitación constante se sometieron a diferentes temperaturas (90, 100 y 110 °C). Similar a los ensayos realizados para los DES's a partir de la Disal 1, si una temperatura no funcionaba, se pasaba a la siguiente y así sucesivamente. Para estos ensayos se amplió el máximo de reacción de 8 hasta 72 h para algunos casos.

En estos ensayos, la tendencia general que fueron similar en cuanto a que los DES's formados fueron líquidos a temperatura ambiente, si el HBD que lo conformaba era líquido. Este es el caso de los DES's formados entre la Disal 2 y los HBD's líquidos: glicerol, ácido láctico, dietilenglicol y etilenglicol que se formaron en proporciones 1:2, 1:5 y 1:10 entre el HBA y HBD. Solo los DES's formados por urea y ácido oxálico como HBD, no fueron líquidos. Los DES's formados con urea como HBD formaron un líquido incoloro homogéneo a temperatura mientras permanecieron a temperatura superior a 100 °C, pero al bajar la temperatura a 25 °C se volvieron sólidos y de color blanco. El DES's formado con ácido oxálico paso también de ser líquido a alta temperatura (110 °C) a ser pastoso al enfriarse. El tiempo mínimo de formación de un DES fue de 45 minutos (con dietilenglicol) y el máximo de 48 h. (con urea), como se observa en la Tabla 4.7. La temperatura predominante de formación de los DES's con la disal 2 fue 110 °C, lo cual puede estar relacionado con que el punto de fusión del cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol es más alto que el del cloruro de 1,3 (bis)triethylamonio-2-propanol.

No todas las mezclas entre HBA's y HBD's formaron un DES. Los ensayos con ácido cítrico, maltodextrina y γ -valerolactona en relaciones molares 1:2, 1:5 y 1:10 no formaron ningún DES. De igual manera no se observó formación de DES cuando se usaron como HBD el dietilenglicol y la urea en la relación molar 1:2. Lo mismo ocurrió con el ácido oxálico en las relaciones molares 1:5 y 1:10.

Al igual que con la Disal 1, los ensayos para las mezclas entre el HBA: Disal 2 y los HBD's: maltodextrina y ácido cítrico no se obtuvo formación de ningún DES. Los ensayos con la γ -valerolactona tampoco fueron viables, este compuesto se probó como HBD por las posibilidades de formación de DES's reportadas por algunos autores, además de ser un compuesto que se puede obtener a partir de BML, lo que le aportaría mayor valor como solvente verde (223).

En relación con los DES's sintetizados (Tablas 4.6. y 4.7.) se puede decir que los diferentes tipos de interacciones moleculares con energías similares que contribuyen a las propiedades fisicoquímicas de un DES, surgen de la gran variedad de estructuras químicas del donante (HBA) y el aceptor de enlaces de hidrógeno (HBD) (130,224).

La energía libre de solvatación que es una propiedad característica de varias moléculas estudiada en las ciencias materiales, biológicas y farmacéuticas (225), influye en la formación del DES. En el proceso de solvatación (reorganización de las moléculas de soluto y solvente en complejos de solvatación), los iones están rodeados por una capa concéntrica de solvente. La caracterización de la capacidad de solvatación de los DES's y otros solventes iónicos, así como la de la interacción de estos con diversos solutos moleculares son de gran importancia (226). La solvatación implica la formación de enlaces, enlaces de hidrógeno y Fuerzas de van der Waals. Diversos estudios han demostrado las diversas interacciones electrostáticas y de Van der Waals que se dan a lo largo la longitud de la cadena, la capacidad de formar enlaces de hidrógeno y la importancia de la correlación entre el catión y anión en los solventes iónicos (226,227). De las distintas técnicas que existen para analizar los enlaces de hidrógeno, la espectroscopia FT-IR y RMN son los más eficaces y ampliamente utilizados para investigar los enlaces de hidrógeno (228).

Todas las moléculas (ionizadas o no) interactúan fuertemente con el solvente, la fuerza y la naturaleza de esta interacción influye en las propiedades del soluto. Es así, como las características físicas como el color, las propiedades del solvente (viscosidad, densidad, etc), la solubilidad y reactividad de un solvente como un DES se ven influidas por las interacciones moleculares. En estudios como el de Bonab y colaboradores (2021) han encontrado como la temperatura puede influir en las energías de interacción de las moléculas de un DES compuesto por ácido fenilpropiónico y ChCl y en su estabilidad (219). El estudio exhaustivo de las variables y los componentes de los DES's son de utilidad, por ejemplo pueden llegar a anticipar el punto eutéctico si se logran determinar las interacciones dominantes en las moléculas que conforman los DES's (219).

Hoy en día hay numerosas investigaciones sobre simulaciones de la dinámica molecular de los DES's, los hallazgos más importantes en este tema, confirman que el enlace de hidrógeno desempeña un papel fundamental en la determinación de las propiedades fisicoquímicas de los DES's, pero además muestran la complejidad de las interacciones que pueden afectar el sistema (204,219).

4.4.2.3. Escalado de la producción de los DES's

En total fueron 22 las mezclas homogéneas consideradas como nuevos DES's, formados a partir de los Nuevos HBA's (disales 1 y 2) y los HBD's comúnmente usados. Se formaron 11 DES's con cada disal como se muestra en la Tabla 4.8. Las condiciones de síntesis de estos DES's (descritos en las Tablas 4.6. y 4.7.) fueron escaladas, para obtener un volumen de DES mínimo 300 mL.

Tabla 4.8. DES's sintetizados con las disales 1 y 2 y proporciones de sus componentes.

| DES N° | HBA | HBD | Relación (p/p) | DES N° | HBA | HBD | Relación (p/p) |
|--------|------------|----------------|----------------|--------|------------|---------------------|----------------|
| 1 | Disal 1 | A. Láctico | 1:5 | 12 | Disal 2 | A. Láctico | 1:2 |
| 2 | | A. Láctico | 1:10 | 13 | | A. Láctico | 1:5 |
| 3 | | Glicerol | 1:5 | 14 | | Glicerol | 1:2 |
| 4 | | Glicerol | 1:10 | 15 | | Glicerol | 1:5 |
| 5 | | Dietilenglicol | 1:5 | 16 | | Dietilenglicol I | 1:5 |
| 6 | | Dietilenglicol | 1:10 | 17 | | Dietilenglicol I | 1:10 |
| 7 | | Urea | 1:5 | 18 | | Urea | 1:5 |
| 8 | | Urea | 1:10 | 19 | | Urea | 1:10 |
| 9 | | Etilenglicol | 1:2 | 20 | | Etilenglicol | 1:2 |
| 10 | | Etilenglicol | 1:5 | 21 | | Etilenglicol | 1:5 |
| 11 | | A. oxálico | 1:2 | 22 | | A. oxálico | 1:2 |

Las reacciones de escalado se llevaron a cabo en un sistema convencional empleando un matraz, agitador magnético, un baño de aceite y una placa calefactora, montaje mostrado en la Figura 4.11. Solo para los DES 7 se usó un reactor de 1 L para facilitar la agitación, debido a la viscosidad de la muestra. Para cada DES, se utilizó en montaje en el que se mezclaron las cantidades proporciones de los HBA y HBD descritas anteriormente en la Tablas 4.6. (para Disal 1) y Tabla 4.7. (para Disal 2), mediante agitación magnética y bajo las condiciones de temperatura para cada DES's (90-100-110°C) descritas también en las mismas tablas.



Figura 4.11. Montaje empleado en el proceso para el escalado de la producción de los DES's en matraces.

Las cantidades de mínimas de Disales usadas fueron 100 g, el HBD se calculó en función de esta proporción. El manejo de cantidades mayores, aumento el tiempo de reacción reportado en los ensayos de síntesis (Tablas 4.6.y 4.7.) hasta la formación del DES, llegando a ser incluso de 72 h. Para la síntesis de los DES's con urea (indistintamente de los HBA) se utilizó un reactor de 500 mL, puesto que la temperatura no lograba ser homogénea para la formación del DES's debido al espesor de la mezcla.

Los DES's obtenidos en el proceso de escalado presentaron características similares a los obtenidos en los ensayos de síntesis donde se usaron volúmenes menores. En su gran mayoría estos fueron incoloros y líquidos más o menos densos a temperatura ambiente, excepto por los DES's compuestos urea y ácido oxálico como HBD's.

Las combinaciones únicas de HBA:HBD y sus interacciones dieron como resultado los nuevos DES's (no reportados), los cuales tienen diferentes propiedades fisicoquímicas que deben ser descritas. Los DES's se han utilizado como disolventes potenciales en la industria, debido a sus numerosas propiedades fisicoquímicas, como la densidad, la temperatura de congelación, la viscosidad, la tenencia de superficie, la miscibilidad, la conductividad y la polaridad, etc (215).

Este estudio ha comprobado que la flexibilidad del diseño de los solventes iónicos (entre los que se incluyen los DES's), es una ventaja. Sin embargo, se deben estudiar muy cuidadosamente las variables (relaciones entre HBA y HBD, temperatura, soluto para el que se está diseñando, etc) para garantizar su efectividad. Esto significa que cuando se busca la adaptación del solvente a una reacción específica se introducen muchas más variables para investigar, lo que hace que su diseño sea complejo (229).

4.5. CONCLUSIONES

- ✓ Se sintetizaron y caracterizaron DOS NUEVOS compuestos a partir de un derivado del glicerol: el Cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol (Disal 1) y Cloruro de 1,3 (bis)triethylamonio-2-propanol (Disal 2). El análisis de los espectros obtenidos mediante RMN y FT-IR permitió identificar las señales características de los compuestos.
- ✓ Se determinaron los puntos de fusión de la Disal 1 es 235 °C y el de la Disal 2 es 255 °C. Los puntos de fusión altos son normales en las sales de amonio.
- ✓ La capacidad de absorción de agua de las Disales fue determinada. La Disal 2 (14,4 %) tiene mayor capacidad de absorción de agua que la Disal 1 (8,87 %) donde la mayor cantidad de agua se absorbe los 3 primeros días para la ambas Disales. En el ensayo realizado para la Disal 2, se puede aumentar la absorción de agua aumentando la superficie de exposición al ambiente hasta un 37 %.
- ✓ Se sintetizaron y escalaron 22 nuevos DES's a partir de los nuevos compuestos sintetizados usados como HBA's.

5. CARACTERIZACIÓN DE LOS SOLVENTES EUTÉCTICOS (DES's)

5.1. ANTECEDENTES

La aplicabilidad industrial de los solventes eutécticos (DES's) depende en gran medida de sus propiedades. En la literatura se encuentra mucha información referente a la caracterización de los DES's sintetizados a partir de ChCl usado como aceptor de hidrógeno (HBA) y diversos donadores de hidrógeno (HBD's). La influencia de los HBA's y HBD's en las distintas propiedades de los DES's está dada principalmente por las interacciones con el hidrógeno (215,230). Los DES's sintetizados en este trabajo al ser nuevos no tienen reportadas sus propiedades físicas (como la densidad, viscosidad, conductividad, etc.). Por lo tanto, se deben caracterizar para poder identificar sus propiedades y posibles aplicaciones. Debido al gran número de combinaciones de materiales de partida utilizados en su preparación (HBA's y HBD's) se hace imposible generalizar sus propiedades físicas y químicas (como la toxicidad, la estabilidad, la biodegradabilidad, la inflamabilidad) (120). Las principales propiedades de los DES's son densidad, viscosidad, conductividad, pH, toxicidad, entre otras.

5.2. MATERIALES

5.2.1. Reactivos

Para las pruebas de toxicidad de los DES producidos frente a diferentes microorganismos se usaron diferentes productos que se mencionan a continuación. Cloruro de sodio (>99,5 %), captán grado analítico y clorhidrato de oxitetraciclina (<95 %) de Sigma Aldrich (EE.UU.). Para preparar los medios de cultivo se usó: Peptona, extracto de carne y agar potato dextrosa de Biokar (España), fosfato de potasio anhidro y sulfato de magnesio anhidro de Panreac (España), agar bacteriológico de Condolab (España). Las siguientes cepas de microorganismos se encuentran en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Burjassot, Valencia-España), las bacterias: *Bacillus cereus* (CECT131), *Staphylococcus aureus* (CECT240), *Listeria monocytogenes* (CECT934), *Escherichia coli* (CECT434), *Salmonella entérica* (CECT4155), *Proteus mirabilis* (CECT4168), la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (CECT1170) y del hongo *Rhizopus oryzae* (CECT20476). La cepa del hongo *Aspergillus niger* se encuentra en la colección propia del laboratorio de microbiología, del departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Lleida.

5.2.2 Equipos

Se usaron las balanzas de precisión de Gram (España) y A&D Weighing (EE.UU.). Se usaron placas calefactoras-agitadoras y termómetros electrónicos con sensor de temperatura de IKA® (España) y Radleys discovery technologies (U.K.) para mantener la temperatura. El pH fue medido con el pH metro: pH meter Basic 20+ de Crison (España). Las caracterizaciones FT-IR se realizaron en un equipo Jasco (FT-IR 6300) (Japón) utilizando el accesorio de muestreo PIKE MIRacle™ ATR (Diamond / ZnSe), rango espectral de 4000 a 650 cm⁻¹, 64 barridos y resolución de 4 cm⁻¹. El equipo de ultrasonido usado fue “Ultrasonic cleaner Bransonic®” de Branson Ultrasonic Corporation (EE.UU.). También se usó el equipo RMN, MERCURY plus NMR de 400 MHz (EE.UU.) con los distintos solventes deuterados. La viscosidad se midió con el viscosímetro rotacional P Selecta modelo ST 2001L. JP Selecta S.A (España). El punto de fusión fue medido con el aparato de Gallenkamb PI106 (U.K.) y el Fisherbrand de Fisher (España).

5.3. MÉTODOS

5.3.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

En el equipo correspondiente, los DES's sintetizados disueltos en solventes deuterados se analizaron con RMN y los espectros obtenidos se analizaron con el programa MestRenova.

5.3.2. Punto de fusión (pf)

En el equipo medidor, se puso el capilar que contenía una cantidad de muestra de los DES's sólidos. Se determinó la temperatura de fusión, los ensayos se hicieron por triplicado.

5.3.3. Capacidad de absorción de agua (CAA)

Entre 150 y 300 mg de muestra de cada uno de los materiales en estudio (DES's) se dispusieron en viales tarados y se le realizó seguimiento diario del peso (entre 7 y 15 días). El estudio se realizó por duplicado. Se calculó el porcentaje de agua absorbido a través de la ganancia de peso de las muestras y se determinó cuál de las muestras tuvo mayor capacidad de absorción de agua (CAA).

5.3.4. Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).

Los DES's sintetizados fueron sometidos a espectrofotometría con el equipo FT-IR y se analizaron por reflectancia total atenuada (ATR). Los espectros se analizaron con el programa Spectra Manager.

5.3.5. Densidad (δ)

La densidad fue medida gracias a la relación en g/mL entre el peso determinado en un matraz aforado de 5 mL y el volumen. Las medidas se realizaron por triplicado.

5.3.6. pH

La medición del pH se realizó con un medidor de pH y los valores de pH se evaluaron directamente introduciendo el electrodo en el DES. Se utilizaron soluciones tampón de pH (a pH 4, 7 y 9) para comprobar y calibrar las mediciones del electrodo.

5.3.7. Viscosidad cinemática (μ)

En el viscosímetro rotatorio se dispuso el vaso de precipitado con la muestra (alrededor de 200 a 250 mL) que fueron sometidos con los distintos usos a temperatura ambiente, hasta lograr un porcentaje de estabilidad cercano a 100 %. La unidad de medida fueron centipoises (cP). En algunos casos se usó una temperatura diferente para la medición de la μ .

5.3.8. Conductividad (σ)

La muestra líquida fue sometida a agitación, posteriormente se introdujeron los electrodos de temperatura y conductividad, se tomó la medida estable a la temperatura ambiente indicada ($^{\circ}$ C). Las unidades de medida fueron S y mS.

5.3.9. Determinación de actividad antimicrobiana de los compuestos.

La actividad biológica de los compuestos frente a diferentes bacterias, levaduras y hongos se evaluó en ensayos de crecimiento radial por otros autores (231). El crecimiento o no de los microorganismos o comúnmente llamado actividad antimicrobiana fue determinado para los HBA y HBD usados. Los microorganismos empleados se describen en la Tabla 5.1 y en función del tipo de microorganismos se siguieron procedimientos ligeramente diferentes. Todas las pruebas se realizaron en ambiente estéril y por triplicado.

Tabla 5.1. Microorganismos usados en las pruebas de toxicidad.

| Tipo de microorganismo | Nombre | Abreviatura | Código CECT |
|------------------------|---------------------------------|-------------------------|-------------|
| Bacteria (Gram +) | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>S. aureus</i> | 240 |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>L. monocytogenes</i> | 934 |
| | <i>Bacillus cereus</i> | <i>B. cereus</i> | 131 |
| Bacteria (Gram -) | <i>Escherichia coli</i> | <i>E. coli</i> | 434 |
| | <i>Proteus mirabilis</i> | <i>P. mirabilis</i> | 4168 |
| | <i>Salmonella entérica</i> | <i>S. enterica</i> | 4155 |
| Levadura | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | 1170 |
| Hongo | <i>Rizhopus oryzae</i> | <i>R. oryzae</i> | 20476 |
| | <i>Aspergillus niger</i> | <i>A. niger</i> | * |

Todos los microorganismos se encuentran en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), excepto la cepa de *Aspergillus niger** que pertenece a una colección propia del departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la UdL.

5.3.9.1. Preparación de medios de cultivo.

- ✓ Caldo nutritivo: se pesaron 10 g de peptona, 5 g de extracto de carne, 5 g de cloruro sódico (o su correspondiente peso para el volumen preparado) y se diluyeron en 1 L de agua destilada con agitación. Se ajustó el pH a $7,1 \pm 0,2$ y se esterilizó el medio líquido en botellas de 25 mL en autoclave a 121 °C durante 15 min.
- ✓ Agar nutritivo: se usó la misma formulación del caldo nutritivo más 15 g de agar (para 1 L) y se envasó en botellas de 500 mL para su esterilización en autoclave. Posteriormente, previo a su uso se calentó en autoclave durante 3 min para fundirlo y servir en placa de Petri o en tubo de ensayo.
- ✓ Agar Potato Dextrosa (PDA): se pesaron 39,5 g de medio PDA (o su correspondiente peso para el volumen preparado) y se diluyeron en 1 L de agua destilada con agitación. El medio se sirvió en tubos de ensayo (9 mL de medio por tubo) y se esterilizó en autoclave. Antes de su uso se calentó en autoclave y se fundió para ser mezclado con las diluciones de los compuestos a ensayar.

5.3.9.2. Preparación de las diluciones de los compuestos a ensayar.

Los compuestos ensayados fueron: Disal 1, Disal 2, ácido láctico, glicerol, etilenglicol, urea, dietilenglicol y ácido oxálico. Las concentraciones de las disoluciones preparadas para cada compuesto fueron 2000, 200, 150, 100 y 50 ppm. Se pesó la cantidad de compuesto y se diluyó en agua destilada y posteriormente se esterilizó en autoclave en botellas de 50, 100 o 250 mL. Se usaron distintas concentraciones en función de los resultados obtenidos en el primer ensayo realizado con la mayor concentración y para cada microorganismo. La concentración más alta empleada en placa de Petri fue de 200 mg /L, puesto que la solución más concentrada que se preparó fue de 2000 ppm y se tomó 1 mL para incluir en el medio, con lo cual se diluyó 10 veces. Esta concentración en placa, es considerada lo suficientemente alta si se tienen en cuenta los valores usuales usados para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) usada para la determinación de sustancias antimicrobianas (232,233).

Las disoluciones de los controles (antibiótico y antifúngico) se prepararon en ambiente estéril y con materiales estériles.

5.3.9.3. Actividad biológica para bacterias

En las condiciones del ensayo para bacterias se incluyó a la levadura (pese a ser un hongo unicelular), debido a las condiciones requeridas y el tipo de crecimiento.

- ✓ Activación de los microorganismos: los microorganismos provenientes de las cepas seleccionadas que se encontraban sembrados en tubos de ensayo se activaron. Para esto se sacaron del congelador y se atemperaron. Luego se sembraron en el medio líquido (con asa de anillo). El crecimiento se realizó en un incubador con agitación, a 25 °C para todas las bacterias excepto para *B. cereus* y la levadura *S.cerevisae*, que fue a 30 °C. El tiempo de crecimiento fue 18 h, ya que es el periodo de tiempo donde las bacterias están en crecimiento exponencial (231,234).
- ✓ Siembra: Los microorganismos activados se sembraron en placa de Petri por el método de inclusión. Previa agitación del cultivo del medio líquido, 1 mL se llevó a placa de Petri y se adicionó 9 mL de agar nutritivo, se agitó suavemente hasta homogenizar el medio y se dejó atemperar hasta la solidificación del agar. Se realizó un blanco para comparar (destinado solo al crecimiento del microorganismo para verificar si había crecido de forma óptima). El ensayo se realizó por triplicado. Se dejó enfriar y solidificar el medio en ambiente estéril. Cuando el medio con el cultivo estuvo sólido, con un sacabocados estéril de 5 mm se realizaron pozuelos sobre las respectivas marcas para los productos a probar (se incluyeron 5 pozuelos por cada placa de 100 mm de diámetro).
- ✓ Posteriormente, con una micropipeta se adicionaron 100 µl de las diferentes disoluciones de los compuestos a ensayar (previamente preparadas) en los pozuelos realizados en las placas. Se usaron dos controles positivos (+) y uno negativo (-). Uno de los controles positivos era la placa sin pozuelos, para evidenciar que el cultivo sembrado por inclusión se había desarrollado bien. El otro control + fue uno de los pozuelos con agua estéril. El control negativo fue un pozuelo con terramicina (antibiótico de amplio espectro).
- ✓ Incubación: El crecimiento se realizó en el incubador, la temperatura correspondiente de crecimiento (25 o 30 °C según el requerimiento del microorganismo).
- ✓ Halos de inhibición: La observación de los halos de inhibición se realizó entre las 18 y 24 horas posteriores. Con una regla se midió el diámetro del halo transparente alrededor del

pozuelo (si había) y se calculó el porcentaje de inhibición relacionándolo con los controles. El cálculo de porcentaje de inhibición de crecimiento bacterias (ICbac) se realizó siguiendo la siguiente ecuación (5.1.).

Ecuación 5.1.

$$\% ICbac = \left(\frac{\phi mb - \phi p}{\phi mc - \phi pc} \right) * 100$$

Donde: % ICbac es el porcentaje de inhibición de crecimiento de la bacteria, ϕmb : diámetro del halo de inhibición medido (correspondiente a la solución en la concentración ensayada); ϕp : diámetro del pozuelo; ϕmc : diámetro del halo de inhibición medido correspondiente al control; ϕpc : diámetro del pozuelo correspondiente al control.

5.3.9.4. Actividad biológica para hongos

- ✓ Preparación de placas: en placas Petri de 5 cm, se incorporaron las diluciones de los compuestos seleccionados en medio de cultivo mediante el método dilución en agar (235). A los 9 mL del medio de cultivo PDA dispuesto en tubos de ensayo (estériles) se adiciono 1 mL de la disolución de los compuestos a ensayar (la primera prueba se realizó con la concentración más alta de 2000 ppm), se agito vigorosamente con vórtex para homogenizar y se llevó a las placas de Petri, se dejó atemperar hasta solidificar en ambiente estéril. De esta manera se obtuvo una concentración final del producto en el agar de 200 ppm (200 µg/mL). Las placas se identificaron con el nombre del hongo, compuesto a ensayar y replica, las pruebas se realizaron por triplicado. Se prepararon dos placas control por cada microorganismo sembrado. El control positivo fue el agua destilada y el control negativo fue un producto antifúngico (captan).
- ✓ Activación de los microorganismos: Las cepas de los hongos filamentosos seleccionados fueron activadas en placas de Petri con medio PDA. Verificando que el cultivo correspondía al indicado y que creció apropiadamente (3 días de incubación, crecimiento total en placa de 5 cm) se procedió a sembrar en las placas preparadas con los compuestos. Con un bisturí se cortó un trozo del cultivo del hongo respectivo y se insertó en la mitad de las placas de Petri.
- ✓ Crecimiento y seguimiento: el crecimiento se realizó por 5 días con seguimiento diario. En el seguimiento se verificaban las placas evaluar el crecimiento de microorganismos y/o

inhibición. La medida se tomaba con una regla trazando una línea diametral, desde el punto donde se sembró el hongo (en la mitad).

- ✓ Halos de inhibición: Se midieron los halos de inhibición alrededor del hongo sembrado (si los había) y se calculó el porcentaje de inhibición en función de las medidas realizadas relacionándolas con los controles. El cálculo de porcentaje de inhibición de crecimiento hongos (IChon) se realizó siguiendo la siguiente ecuación (5.2.).

Ecuación 5.2.

$$\% IChon = \left(\frac{\varnothing mh}{\varnothing mc} \right) * 100$$

Donde: % IChon es el porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo; $\varnothing mh$: diámetro del halo de inhibición medido; $\varnothing mc$: diámetro del halo de inhibición medido correspondiente al control.

5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1. Propiedades de los DES's

Los NUEVOS DES's sintetizados a partir de mezclas entre HBA's (nuevos) y distintos HBD's fueron sometidos a ensayos para determinar sus propiedades y caracterizarlos. Para determinar el uso que se le puede dar a los DES's es necesario tener un conocimiento preciso y fiable de sus propiedades, puesto que tienen relación directa con las ventajas y desventajas que pueda poseer el solvente. Entre las propiedades más importantes de los DES están la solubilidad, densidad, viscosidad, pH, conductividad, estado de la materia, punto de fusión, capacidad de absorción de agua entre otras.

En la Tabla 5.2 se observan los resultados de las propiedades más comunes de los DES's. Para el análisis de cada propiedad, los valores obtenidos se compararon con diferentes DES's sintetizados principalmente a partir de ChCl como HBA y distintos HBD's.

Tabla 5.2. Propiedades medidas en los nuevos DES's sintetizados (valor promedio de triplicado).

| DES N° | HBA | HBD's | Densidad | Viscosidad | pH | Conductividad σ (S/cm) | Estado | | Punto de Fusión °C |
|--------|---------|---------------|-------------------------------|------------|------|-------------------------------|---------|--------|--------------------|
| | | | δ (g/cm ³) | μ (cP) | | | Líquido | Sólido | |
| 1 | Disal 1 | Ácido láctico | 1,15 | 830 | 0,8 | 215 | X | | NA |
| 2 | | Ácido láctico | 1,16 | 417 | -0,4 | 421 | X | | NA |
| 3 | | Glicerol | 1,19 | 1685 | 5,5 | 122 | X | | NA |

| | | | | | | | | | |
|---|---------------|----------------|------|-------|------|-------|---|----|----|
| 4 | | Glicerol | 1,21 | 3206 | 4,3 | 147 | X | | NA |
| 5 | | Dietilenglicol | 1,12 | 322 | 6,1 | 302 | X | | NA |
| 6 | | Dietilenglicol | 1,12 | 161 | 5,9 | 517 | X | | NA |
| 7 | | Urea | NA | NA | NA | NA | | X | 95 |
| 8 | | Urea | NA | NA | NA | NA | | X | 75 |
| 9 | | Etilenglicol | NA | NA | NA | NA | | X | ND |
| 10 | | Etilenglicol | 1,11 | 408,3 | 8,15 | 1105 | X | | NA |
| 11 | | Ácido oxálico | NA | NA | NA | NA | | X | ND |
| 12 | Disal 2 | Ácido Láctico | 1,18 | 134,8 | 1,7 | 148,4 | X | | NA |
| 13 | | Ácido Láctico | 1,19 | 690,2 | 0,2 | 555 | X | | NA |
| 14 | | Glicerol | 1,19 | 13510 | 5,4 | 127,7 | X | | NA |
| 15 | | Glicerol | 1,22 | 24063 | 4,7 | 301 | X | | NA |
| 16 | | Dietilenglicol | 1,13 | 141,1 | 6,89 | 969 | X | | NA |
| 17 | | Dietilenglicol | 1,12 | 83,5 | 6,58 | 944 | X | | NA |
| 18 | | Urea | NA | NA | NA | NA | | X | ND |
| 19 | | Urea | NA | NA | NA | NA | | X | 80 |
| 20 | | Etilenglicol | NA | NA | NA | NA | | X | ND |
| 21 | | Etilenglicol | 1,14 | 159,5 | 5,03 | 2670 | X | | NA |
| 22 | Ácido oxálico | NA | NA | NA | NA | | X | ND | |
| NA: No aplica ND: No determinado (por las características físicas del compuesto: pastoso e higroscópico). | | | | | | | | | |

De los 22 DES's sintetizados, catorce fueron líquidos a temperatura ambiente (DES's 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 21). Cuatro (DES's 9, 11, 20 y 22) presentaron un grado de cristalización mínimo con una consistencia sólida (pastosa). Las propiedades de los DES's están determinadas por la relación molar entre sus HBA y HBD y sus interacciones (215).

5.4.2. Punto de fusión

Un punto de fusión igual o inferior a la temperatura ambiente es una propiedad esencial de los líquidos iónicos considerados como disolventes de sustitución no volátiles (229).

Cinco de los DES's sintetizados (7, 8, 9, 18, 19 y 22) fueron sólidos a temperatura ambiente. Sin embargo, sólo 3 fueron aptos para medir el punto de fusión (pf) ya que los demás tenían una estructura cremosa que imposibilitaba llenar los capilares del equipo y realizar la medida.

Los DES's no líquidos ya han sido reportados por diversos autores. En la revisión de Kalhor y colaboradores (2019) se recogen al menos 14 DES's a partir de ChCl y distintos HBD's (tiourea, 1-metil urea, 1,3-dimetil urea, acetamida, benzamida y ácidos como adípico, benzoico, cítrico y oxálico) (152) que no son líquidos y otros autores como Tang y colaboradores reportan muchos otros (236).

Los DES's sólidos a los que se le midió el punto de fusión fueron los sintetizados con urea como HBD. Las medidas se realizaron por triplicado en los equipos Gallenkamb y Fiserbrand, obteniendo el mismo resultado en todas las mediciones. Los DES 7 y 8 tuvieron pf de 95 y 75 °C respectivamente, ambos tenían como HBA a la disal 1. Para el DES 19 el pf fue de 80 °C, este DES estaba conformado por la disal 2 y urea. Los puntos de fusión medidos cumplen con una de las características del DES, tener un punto de fusión < 100 °C y menor que sus componentes (119,128,136,148) (el punto de fusión de la urea que es 133°C y de las disales que son > 200 °C). Cuanto más bajo es el punto de fusión mayor aplicabilidad pueden tener los DES's (152). De los 22 DES's sintetizados, catorce fueron líquidos a temperatura ambiente (DES's 1, 2, 3, 4,

5.4.3. Densidad (δ)

La densidad (δ) de los DES's sintetizados oscila entre 1,11 y 1,22 g/cm³, lo que está dentro del rango reportado para solventes de este tipo (entre 1,04 y 1,63 g/cm³ a temperatura ambiente). Los DES's compuestos por sales metálicas pueden tener densidades entre 1,3 y 1,6 g/cm³ (127,236). Normalmente las densidades de los DES's son mayores a la del agua y se ven muy afectados por la relación molar sal orgánica/HBD (127,148,237). Es por este motivo que los DES's sintetizados con mayor δ corresponden a los compuestos por glicerol como HBD's (con ambas disales como HBA's). La densidad de los DES's compuestos por glicerol que oscila entre 1,19 y 1,22 g/cm³ es menor que la del glicerol (1,26 g/cm³) lo que es normal en la formación de este tipo de solventes y ya ha sido reportado por diversos autores. El mayor número de grupos funcionales -OH que presenta el glicerol (tiene 3 mientras que los demás compuestos HBD's tienen 2, 1 o 0), dan lugar a la formación de más enlaces H, disminuyendo el volumen libre disponible en el líquido lo que se traduce en el aumento de la viscosidad y por ende de la densidad. (127,128,136,138).

Está claro que la viscosidad presenta una relación directamente proporcional con la densidad, mientras que la temperatura tiene una relación inversa. La temperatura también puede afectar la densidad de los DES's esto pudo ser notado ya que cuando el DES tenía una temperatura más fría se comenzaba a poner más denso. Todas las densidades fueron tomadas a 25 °C. Autores como Shahbaz y colaboradores (2012), estudiaron DES's basados en ChCl, cloruro de amonio *N,N*-dietilnetanol y en bromuro de metil trifenil fosfonio y demostraron un comportamiento dependiente de la temperatura puesto que la densidad del líquido disminuyó linealmente con el aumento de la temperatura (237). Siongco y colaboradores (2013) obtuvo resultados similares con DES's que usaban cloruro de amonio *N,N*-dietanol como HBA, glicerol y dietilenglicol como HBD's (238).

Otro de los factores que puede afectar la densidad es el contacto con el agua, ya que un DES's saturado con agua presenta una densidad ligeramente inferior a la que tiene en un estado insaturado, esto ha sido mencionado por Florindo y colaboradores (2014) (143). Dhawal y colaboradores (2014) también observaron la variación de la densidad al añadir agua a un DES compuesto por ChCl:urea (127,239). Los resultados obtenidos para las densidades de los DES's sintetizados corresponden a las que poseen los DES's hidrofóbicos que son menores a las presentadas por los DES's con sales metálicas (1,3 g/ cm³) (127,143).

El valor de la δ para los DES's 10 y 21 conformados por Disa1:etilenglicol y la Disal2:etilenglicol (1:5 molar) son similares a los reportados por Lapeña y colaboradores (2019), aunque el DES 21 tiene valores un poco por encima del rango medido encontrado en su estudio de caracterización para DES's compuestos por ChCl y etilenglicol-agua (1,08 y 1,13 g/cm³), lo cual es lógico ya que el agua puede disminuir la densidad en los DES'S (240).

5.4.4. pH

El pH del DES está definido principalmente por su composición puesto que varía en función de la acidez relativa de las especies aniónicas y catiónicas que lo componen (136). Como se observa en la Tabla 5.2, en los DES's con HBD's como el ácido láctico los pH son ácidos. Para estos DES's (1, 2, 12 y 13) el rango de pH esta entre -0,4 y 1,7. HBD's como el glicerol aportan para que los DES's muestren un pH entre 4,3 y 5,5. Los HBD's tipo alcohol aportan un pH más cercano a la categoría neutra, los DES's formados con HBD's como etilenglicol y dietileglicol presentan pH por encima de 5, e incluso en el DES 10 llega a ser básico con pH de 8,5. La influencia del tipo de HBD en el pH del DES ya ha sido observada Tang y colaboradores (2013) (236).

El pH es un parámetro importante para algunas aplicaciones farmacológicas por ejemplo según algunos autores este parámetro y la fuerza iónica son relevantes para la liberación controlada de fármacos en sistemas eutécticos (133,135). En el uso del DES como solvente para descomponer BML, al igual que las otras condiciones como el tipo de DES, la temperatura y la presión, el pH puede influir en las estructuras componentes de la BML (152). El pH es fundamental no sólo a la hora de definir características de un sistema de extracción, sino que también en aplicaciones industriales, principalmente para la elección del material de las tuberías en un proceso industrial (debido a la cinética de las reacciones químicas, la corrosión, etc.) (136).

5.4.5. Viscosidad (μ)

La viscosidad es un parámetro muy importante de los DES's, ya que afecta su idoneidad para diversas aplicaciones, entre estas para el almacenamiento y conversión de energía, puesto que tiene un fuerte efecto en el transporte de masa dentro de los DES's (129).

Este parámetro está estrechamente relacionado con las interacciones intermoleculares en los componentes del DES's, por ejemplo, algunos aniones de mayor tamaño pueden presentar deslocalizaciones de la carga que cambian su cinética y por ende su viscosidad haciéndola mayor o menor. Las viscosidades muy altas obtenidas por los DES's sintetizados, están muy relacionados con su composición. Los DES's 3 ,4, 14 y 15 compuestos por glicerol son los que presentan viscosidades más altas. Para los DES's 3 y 4 son de 1685 y 3206 cP respectivamente, los cuales se prepararon empleando una relación molar de 1:5 y 1:10, respectivamente. Los DES's 14 y 15 compuestos por la disal 2 y glicerol en relación molar 1:2 y 1:5, presentan viscosidad extremadamente alta (13510 y 24063 cP, respectivamente). Estos resultados son debido a que los HBD's desempeñan un papel importante en el valor de la viscosidad por tener mayores cantidad de enlaces de hidrógeno (129). La red de enlaces de hidrógeno intramolecular produce un empaquetamiento en los sistemas eutécticos que conduce a una reducida movilidad de las especies libres y por ende alta viscosidad (considerada >100 cP) (241). Además de las composiciones de los DES, la temperatura afecta significativamente a la viscosidad puesto que las fuerzas de cohesión intermoleculares que contribuyen a la viscosidad del líquido son reguladas por la temperatura, a medida que la temperatura aumenta la viscosidad disminuye (129,146).

Las viscosidades más pequeñas son más apropiadas para el uso como solvente de los DES's, esto debido a que a mayor viscosidad hay más dificultades de manejo a nivel de procesamiento industrial (en la transferencia de masa, velocidades de reacción y manipulación de los procesos) (116,121,130,242).

Se han reportado y caracterizado distintos tipos de DES's con viscosidades relativamente altas (130), que para algunos autores son consideradas bajas (< 500 cP), además son cercanas a las de los disolventes orgánicos comunes (243). Los DES's sintetizados en este trabajo 2, 5, 6, 10, 12, 16, 17 y 21 tienen viscosidades en este rango. Si bien no son tan bajas como algunas reportadas por otros autores como 19 cP (130), pueden ser considerados manejables para fines industriales.

Además de la naturaleza de sus componentes, su proporción molar y la temperatura, el contenido de agua del DES's también puede afectar la viscosidad (127,137,138,146). Es por eso que algunos estudios buscan solucionar los problemas de las altas viscosidades con la adición de agua (116,135,241,242).

5.4.6. Conductividad (σ)

Los valores de conductividad para casi todos los DES's sintetizados en este estudio son bajas ($< 2 \text{ mS cm}^{-1}$) lo cual es normal en este tipo de solventes (127,130,151). Los DES's presentan conductividades pobres entre 122 y 555 S cm^{-1} . Los DES's compuestos por la disal 1 como HBA y HBD alcohol (dietilenglicol) muestran valores un poco más altos, (DES's 16 y 17 con 969 y 944 S cm^{-1} respectivamente).

El DES 10 (D1-Eti proporción 1:5) y el DES 21 (D2: Eti proporción 1:5) muestran mayores valores de conductividad que el resto de los DES's sintetizados. El DES 10 con 1105 S cm^{-1} y el DES 21 de 2670 S cm^{-1} destacan, estos valores resultan más bajos en comparación con los reportados por otros autores para solventes eutécticos conformados por ChCl:etilenglicol ($5,22$ y $38,3 \text{ mS cm}^{-1}$) (240). Sin embargo, si se decidiera usar estos DES's para aplicaciones industriales tendrían como ventaja la baja viscosidad y densidad cercana a la del agua.

Otro factor importante a tener en cuenta es que la conductividad fue medida a temperatura ambiente, con lo cual los valores podrían aumentar a altas temperaturas pudiendo acortar la ventana y permitir que los DES's 10 y 21 se estudien para alguna aplicación térmica ya que algunas requieren conductividades desde los $0,58 \text{ mS cm}^{-1}$ (129). Estudios como el Boisset y colaboradores (2013) mostraron como un electrolito (LiT cFSI/NMAc) desarrollado en un sistema eutéctico, aumentó su conductividad de $1,61 \text{ mS cm}^{-1}$ a $28,4 \text{ mS cm}^{-1}$ con el aumento de temperatura ambiente hasta los $150 \text{ }^\circ\text{C}$, manteniendo la estabilidad del DES (129,244). Esto concuerda con lo descrito por Abbot y colaboradores (2001) que demostraron que en los solventes iónicos la conductividad tiene una relación que aumenta exponencialmente con la temperatura (por la disminución de la viscosidad que ocasiona el aumento de la movilidad de los electrones) (126,127,130). A parte de la relación directa proporcional entre conductividad y temperatura, esta propiedad también tiene otro tipo de relación con la viscosidad. En la Figura 5.1 se muestra la relación entre viscosidad y conductividad de los DES's. Se graficaron los valores obtenidos en la Tabla 5.2 de caracterización con Excel en el formato de columnas apiladas donde los valores son llevados a porcentaje.

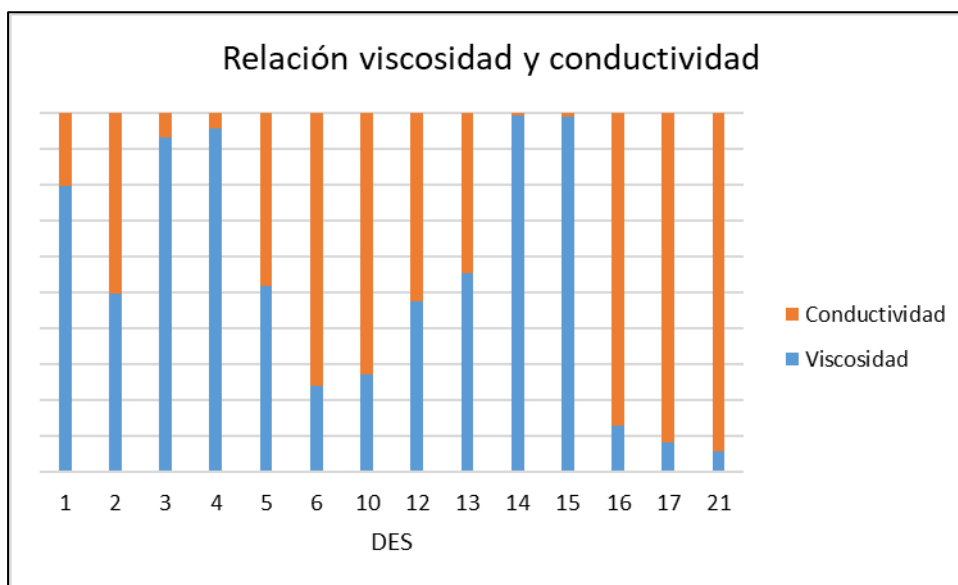


Figura 5.1. Relación inversa llevada a porcentajes entre la viscosidad y conductividad medidas en los DES's.

La Figura 5.1 evidencia la relación inversa entre la viscosidad y la conductividad térmica, donde cuando más alta es la viscosidad, más baja es la otra la conductividad y viceversa. Esto ha sido mencionado ya por diferentes autores (126,130). En la caracterización para DES's compuestos por HBA's como ChCl o haluros de sodio y etilenglicol HBD, se ha demostrado como la viscosidad dinámica y densidad disminuyen con la temperatura y a su vez aumenta la conductividad, es decir cuando hay una alta viscosidad se tiene baja conductividad (240,245).

5.4.7. Capacidad de Absorción de Agua (CCA)

Los DES's son usados principalmente como solventes, pero también pueden tener otros usos. La CCA es una propiedad importante ya que permite explorar nuevos usos para este tipo de solventes. La absorción de agua de los DES's y su higroscopicidad ha sido reportada por autores como Florindo y colaboradores (2014), quienes dejaron en contacto con el aire durante un mes algunos de sus DES's basados en ChCl como HBA, y la cantidad de agua retenida por estos osciló entre el 14 y el 20 % en peso (143).

La CCA fue medida con un seguimiento durante 15 días como se explica en los métodos. Los resultados se observan en la Figura 5.2.

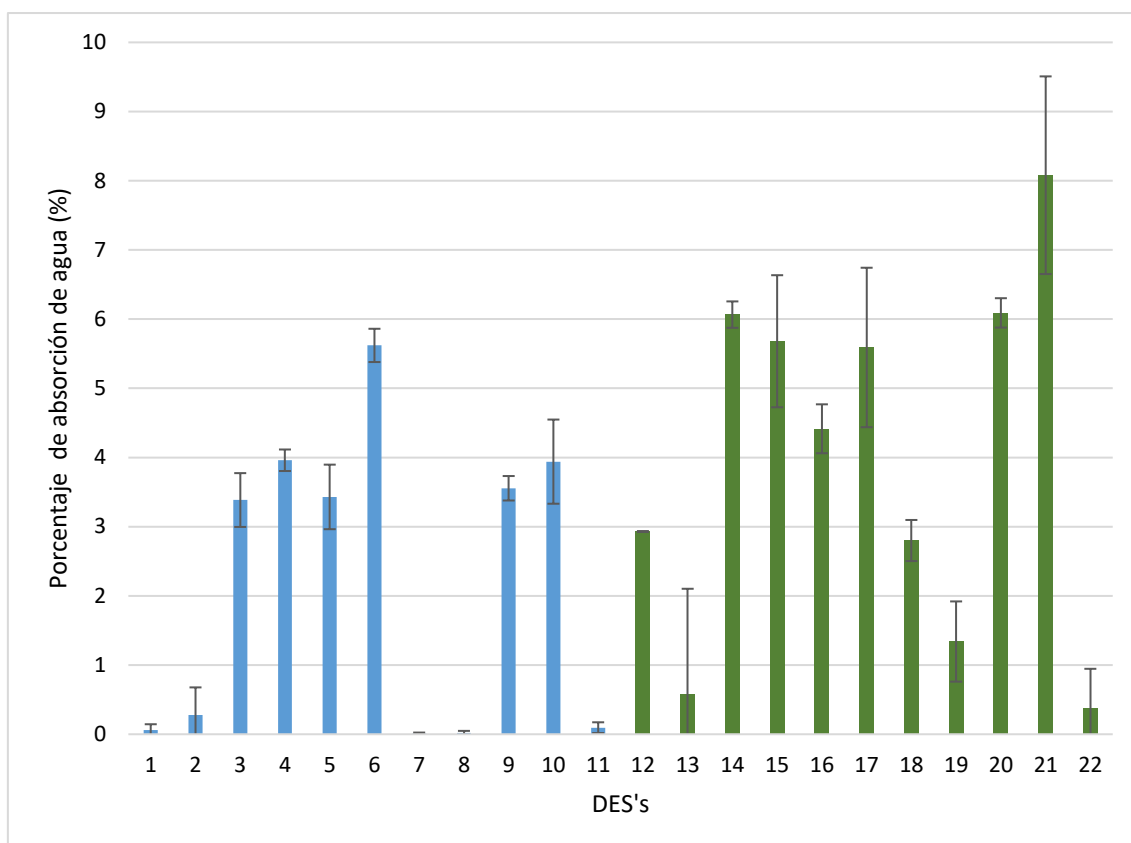


Figura 5.2. Porcentaje de absorción de agua medida a los DES's sintetizados con los diferentes HBD's y HBA's. Azul para HBA=Disal 1 y verde para Disal (n=2).

Para algunos de los DES's sintetizados en este trabajo la absorción de agua fue cercana al 8 % como se muestra en la Figura 5.2. Algunos parámetros que influyen en la absorción de agua son la temperatura y la humedad (246), las pruebas fueron realizadas en una sala de pesaje cerrada con humedad y temperatura promedio de 50 % y 24 °C respectivamente . El proceso de absorción de agua del aire por parte de los DES's inicia con la atracción de las moléculas de agua del aire por la masa del DES y luego la absorción de estas moléculas en la superficie de los DES's (214). Se crean enlaces de puentes de hidrógeno fuertes entre el agua (H⁺) y el grupo electronegativo del DES. Los DES que mayor absorción de agua presentaron fueron los que poseían grupos funcionales hidroxilo y carbonilo como HBD's.

También se observó que absorbieron mayor cantidad de agua los DES's preparados a partir de la disal 2 como HBA, que tiene el grupo metil. Estos DES's (6 DES's en total) absorbieron más de 4 % de agua, además de tener el valor máximo obtenido de 8,1 %. Según Chen y colaboradores (2019) la cinética de la absorción del agua del DES está relacionada con la interacción entre el

HBA y HBD, al inicio de la absorción de agua a partir del aire la concentración de agua en el DES es poca y está muy diluida, por lo que la fuerza de los enlaces de H entre las moléculas que conforman el DES casi no tiene efecto en la absorción de agua (214). Este comportamiento fue observado en sus estudios para DES's formados por ChCl (HBA) y distintos HBD's. Al principio de la absorción de agua del aire por los DES's, la concentración de agua en los DES está muy diluida, por lo que la fuerza de los enlaces H entre los DES's casi no tiene efecto en la absorción de agua. Por lo que entre DES's con diferentes HBD's pueden haber diferencias, según los tipos y número de grupos hidrófilos que los compongan (214).

5.4.8. FT-IR

Los DES's sintetizados fueron analizados por FT-IR y los espectros obtenidos fueron procesados con el programa Spectra-manager. En los Anexos en la Tabla A3 se evidencian la ubicación en la longitud de onda (cm^{-1}) y asignación de las bandas más comunes de los grupos funcionales y enlaces de los compuestos en los espectros de FT-IR (167,194,209–212). Con base en la bibliografía (167,194,209–212) se identificaron las bandas en los espectros de los DES's preparados en este trabajo. Los movimientos de los átomos de las moléculas y sus enlaces son 6 principalmente, vibración de estiramiento (ν_e) (simétrica o asimétrica) y vibración de flexión (ν_f) (de tijera, balanceo, meneo o torsión) (213).

En los espectros FT-IR de las disales (Disal 1: D1 y Disal 2: D2) se identificaron sus bandas características (Figura 4.6). Las bandas a 3395 y 3476 cm^{-1} para la D1 y D2 respectivamente, corresponden al grupo O-H que suele aparecer en la región de $3700\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$ tal y como ha sido descrito por varios autores (194,211,213,214). Ambas disales tienen señal en 1636 cm^{-1} asignada al grupo N-H, en 1391 y 1370 cm^{-1} la ν de torsión del enlace C-N (211). También ambas disales tienen señal en 1094 cm^{-1} correspondientes a la ν_e asimétrico del enlace C-N (amina alifática) y en 3000 y 2981 cm^{-1} para la ν_e asimétrico y simétrico de los $-\text{CH}_3$. La D1, las señales en 2900 y 2898 cm^{-1} son asociadas al ν_e simétrico y asimétrico del grupo $-\text{CH}_2$ y la ubicada en 1492 cm^{-1} es la señal de ν deformación del $-\text{CH}_2$. (194,211,213,214).

A parte de las Disales que actúan como HBA's, otro componente de los DES's son los HBD's. La identificación de sus bandas características necesaria para la posterior comparación entre los espectros de los DES's sintetizados y sus compuestos formadores. Teóricamente se deben evidenciar desplazamientos en la ubicación de algunas señales, causadas por los nuevos enlaces de hidrógeno que se han formado y que dieron como resultado el DES. En la figura 5.3. se observan los espectros FT-IR de los HBD's que componen los DES's.

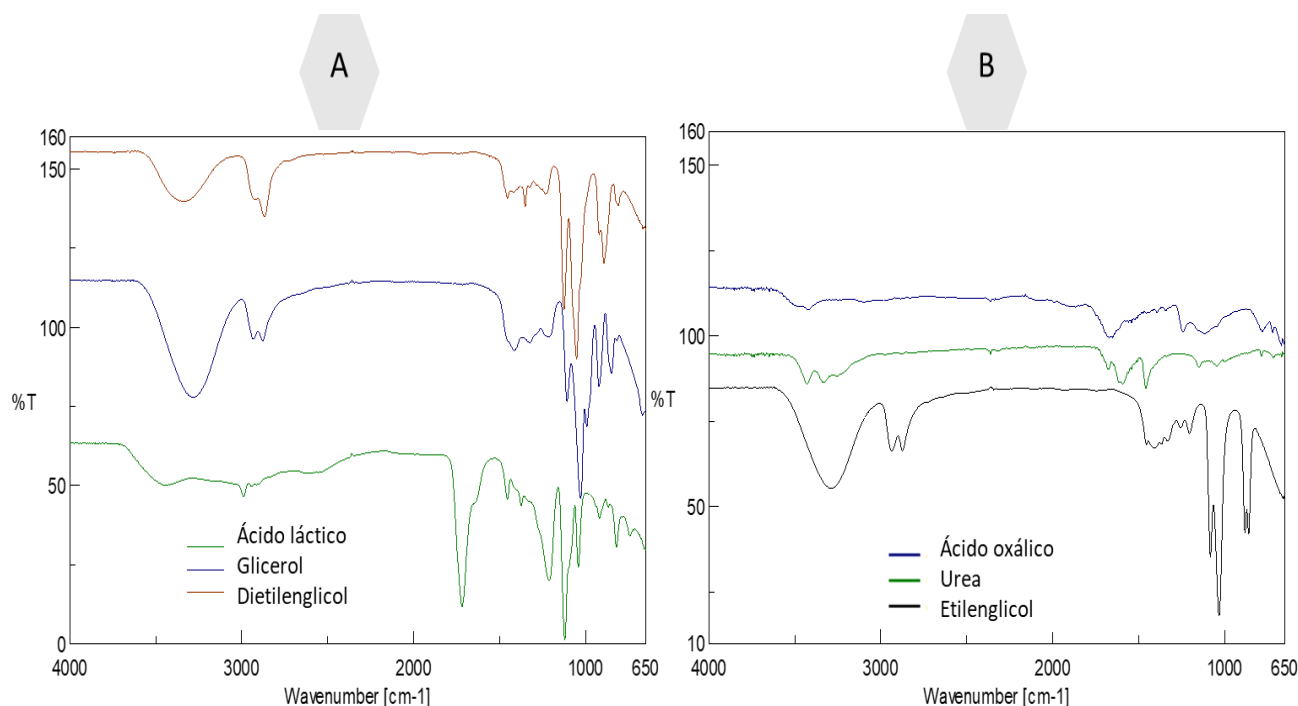


Figura 5.3. Espectros FT-IR de los HBD's usados en la preparación de los DES (mostrados en 2 espectros para mayor claridad en las bandas). Parte A: Ácido láctico (verde), glicerol (azul), dietilenglicol (naranja). Parte B: Ácido oxálico (azul), urea (verde) y etilenglicol (negro).

Se puede evidenciar las bandas correspondientes a los grupos funcionales de cada uno de los HBD. Para el Ácido Láctico (AL) se pueden observar la ν del O-H en 3440 cm^{-1} y para enlace carboxílico ($-\text{COOH}$) alrededor de 2990 cm^{-1} , la ν del C=O se observa en 1720 cm^{-1} , otra de las ν del O-H se encuentra en 1120 cm^{-1} . El Glicerol (Gli) muestra la ν del O-H en 3280 y 1031 cm^{-1} , ν del C-O en 2930 y 2880 cm^{-1} , la ν de O-H primario alrededor de 1420 cm^{-1} , la ν de flexión del C-O-H y del O-H en 1420 y 920 cm^{-1} respectivamente. También observamos claramente la vibración C-OH. La ν del enlace C-C del esqueleto del Gli se puede evidenciar en 991 cm^{-1} . Para la Urea (Ur) podemos evidenciar la ν correspondiente al enlace N-H alrededor de 3400 y 3330 cm^{-1} , para el C=O muy clara en 1675 cm^{-1} , las señales en 1591 y 1450 cm^{-1} se pueden asignar a los N-H. El Etilenglicol (Eti) y Dietilenglicol (Die) tienen señales muy similares correspondientes a la ν del hidroxilo (O-H) alrededor de los 3300 cm^{-1} y 1040 cm^{-1} . Además, la ν del C-C en 1200 cm^{-1} para el etilenglicol y el del C-O (éter) en 1126 cm^{-1} . Por último, las señales para el Ácido Oxálico (AO) se evidencian en ν del C=O en 1670 y 1240 cm^{-1} , la ν de deformación del alcohol beta en 1400 cm^{-1} y del C=O en 780 cm^{-1} .

En la formación de los DES's se generan enlaces de hidrógeno de diferentes tipos. Las vibraciones de estiramiento O-H presenciadas pueden verse afectadas en gran medida por el enlace de hidrógeno y dependen de la fuerza de los enlaces de hidrógeno (213). Los desplazamientos en la longitud de onda de las señales causadas por puentes de hidrógeno han sido reportadas (210). En los enlaces de hidrógeno, lo más frecuente es que sean del tipo $X-H\cdots Y$, donde H es el hidrógeno, X e Y son elementos electronegativos, donde Y posee uno o más pares de electrones solitarios (210,228,247). En la mayoría de los casos, X e Y son átomos de F, O y N (que son muy electronegativos y pequeños). Los enlaces de hidrógeno suelen ser mucho más débiles que los enlaces covalentes u otros enlaces polares, pero mucho más fuertes que la interacción de Van der Waals (228). Los rasgos característicos del enlace de hidrógeno $X-H\cdots Y$ son que el enlace covalente X-H se estira en correlación con la fuerza del enlace de hidrógeno; una pequeña cantidad de densidad de electrones (0,01 - 0,03 e) se transfiere del aceptador de protones (Y) a la molécula donadora de protones (X-H); la banda de absorbancia infrarroja, que corresponde al estiramiento X-H, se desplaza a una frecuencia más baja, de esta manera se amplía y aumenta su intensidad al formarse el enlace de hidrógeno y se evidencia en los espectros FT-IR (210,228,247).

A continuación (Figuras 5.4. y 5.5.), se detallan algunos de los espectros (uno para cada HBA y HBD diferente) con las señales correspondientes y sus respectivos desplazamientos. Para poder observar más claramente los cambios en espectros su procesado y el análisis de los datos se hizo con la absorbancia y no con la transmitancia.

En la Figura 5.4. se puede observar un ejemplo de los desplazamientos ocasionados por los puentes de hidrógeno formados en la mezcla eutéctica entre el cloruro 1,3 (bis)trietilamonio-2-propanol (Disal 1: D1) y el AL en diferentes relaciones molares, 1:5 para el DES 1 y 1:10 para el DES 2.

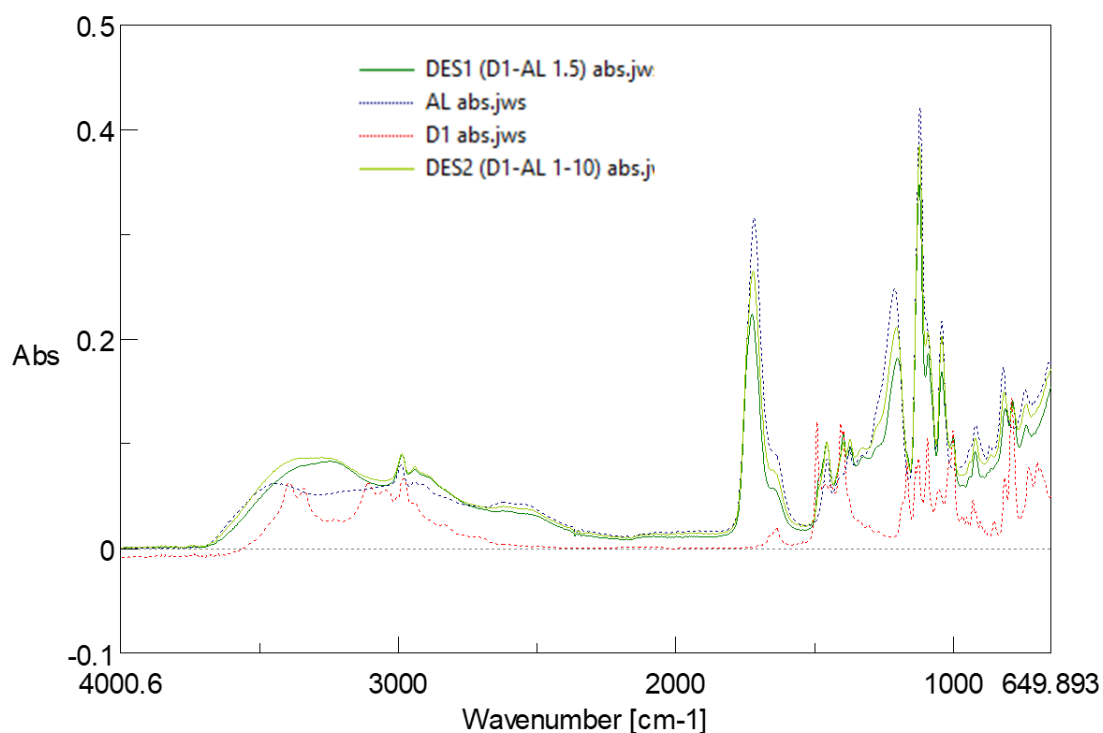


Figura 5.4. Comparación de los espectros FT-IR de los DES's conformados por la Disal 1 (D1) como HBA y ácido láctico (AL) como HBD. Línea verde oscuro y verde claro: DES 1 (D1:AL en relación molar 1:5) y DES 2 (D1:AL en relación molar 1:10) respectivamente. Línea punteada azul y roja: LA y D1 correspondientemente.

Como se observa en la Figura 5.4, la longitud de onda y la intensidad de los picos en los espectros relacionados con el enlace de hidrógeno cambian por la formación de enlaces de hidrógeno. Esto se debe a los cambios en la estructura electrónica del modo vibracional que se dan por la formación del enlace de hidrógeno (248). En este caso, la banda correspondiente al O-H del AL en el espectro FT-IR del compuesto solo está en 3457 cm^{-1} , con la formación del DES esta se ensancha y se desplaza hacia 3269 cm^{-1} , donde se solapa con la banda correspondiente al O-H de la D1. La banda de la D1 en el espectro FT-IR estaba en 3392 cm^{-1} , por lo cual también hay desplazamiento. Otras señales características para la D1 como la ν_{e} asimétrico de los $-\text{CH}_3$ ubicada en 3006 cm^{-1} también se han visto modificadas desplazándose a 2984 cm^{-1} . La banda característica del C=O correspondiente al ν_{e} asimétrico ubicada en 1718 cm^{-1} se desplaza a $1725,98\text{ cm}^{-1}$. Los cambios por los enlaces de hidrógeno también se observan en la ν del O-H ubicada en 1002 y 1120 para la D1 y el AL respectivamente, que pasan a ubicarse en 1122 cm^{-1} .

En la Figura 5.5. tenemos otra comparativa de los espectros: D1, Gli y el DES 3 y DES 4, formados por D1:Gli a diferentes relaciones molares 1:5 y 1:10, respectivamente.

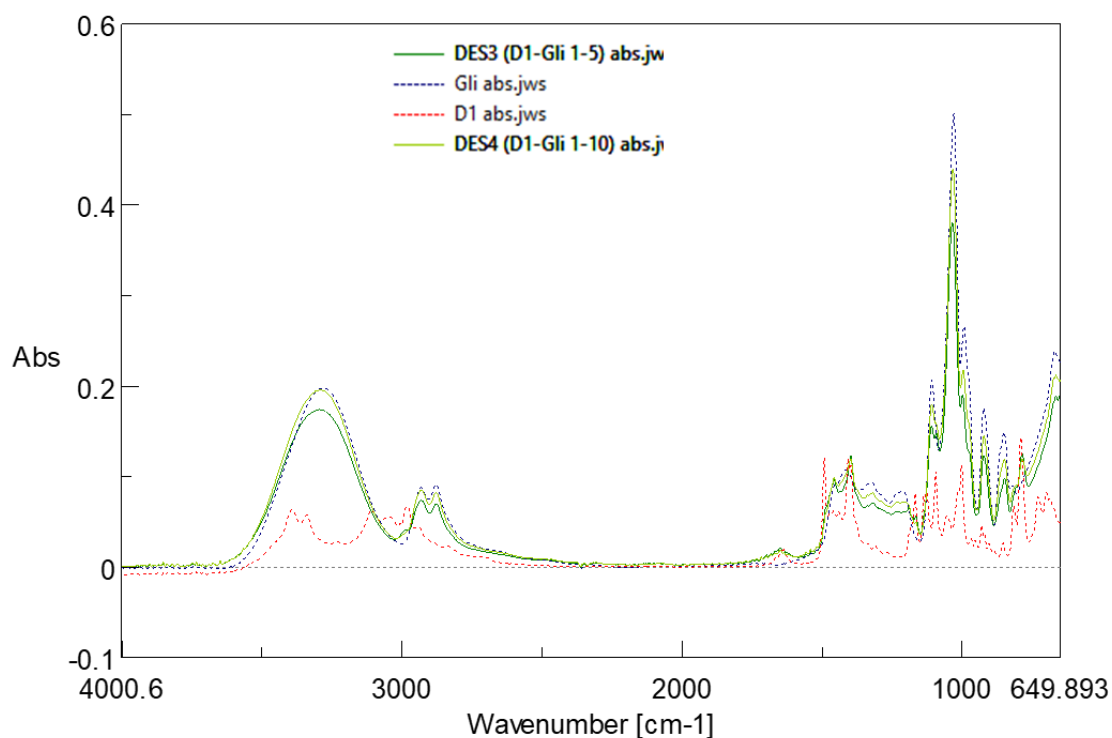


Figura 5.5. Espectros FT-IR de los DES's 3 y 4 conformados por la Disal 1 (D1) como HBA y glicerol (Gli) como HBD. Línea verde oscuro y verde claro: DES 3 (D1:Gli en relación molar 1:5) y DES 4 (D1:Gli en relación molar 1:10), respectivamente. Línea punteada azul y roja: Gli y D1, correspondientemente.

En la anterior Figura 5.5. también se pueden observar los desplazamientos causados por los enlaces de hidrógeno formados principalmente en las señales correspondientes al O-H. Las ν del O-H se han desplazado de 3392 a 3298,64 cm^{-1} y 3289,63 cm^{-1} para el DES 3 y 4, respectivamente. Para este caso también se solapan las señales con la ν de tensión de los enlaces C-H y O-H del glicerol. La banda de ν del O-H del glicerol en el espectro FT-IR de compuesto se ha desplazado de 1029 a 1033 cm^{-1} . Los DES's tienen espectros FT-IR muy similares al igual que sus desplazamientos, lo cual es normal al ser los mismos en cada caso en proporciones molares variables.

Con respecto a lo ya evidenciado en la Figura 5.5. y 5.6. la variación más importante la muestra la banda de ν del grupo hidroxilo. Esto también ha sido reportado por otros investigadores en DES's formados con ChCl como HBA y varios HBD's (211,249).

En la Figura 5.6. se muestran los espectros de los DES 11 y 22, conformados por la D1:AO y D2:AO (relación molar de 1:5 entre HBA y HBD), respectivamente.

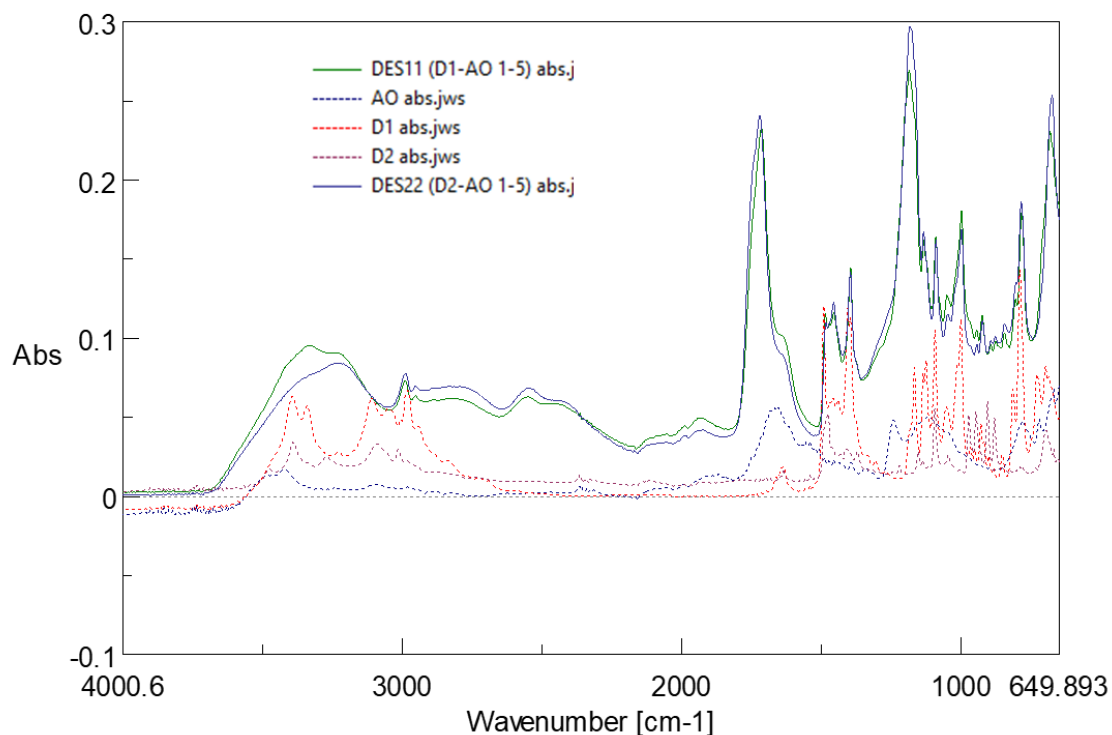


Figura 5.6. Espectros FT-IR de los DES's 11 y 22 conformados por los HBA: Disal 1 (D1) o Disal 2 (D2), y el HBD ácido oxálico (AO). Línea verde: DES 11 (D1:AO relación molar 1:5) y azul: DES 22 (D2:AO relación molar 1:5). Línea punteada: azul: AO, roja: D1 y morado: D2.

En la Figura 5.6., podemos ver los espectros de los DES's conformados por el HBA y AO en relación molar 1:5. Pese a tener distintos HBA, por tener las 2 disales grupos funcionales similares y por ende generar la misma posibilidad de enlaces de hidrógeno, los espectros son similares. Una vez más, las principales diferencias entre los espectros de los DES's y sus respectivos HBA's y HBD, se dan en las bandas correspondientes a las ν del grupo hidroxilo (OH) que se ensanchan, se desplazan y se solapan.

En la Figura 5.7., podemos ver la zona ampliada de algunos de los espectros de los DES's compuestos por la D2 como HBA y algunos HBD's.

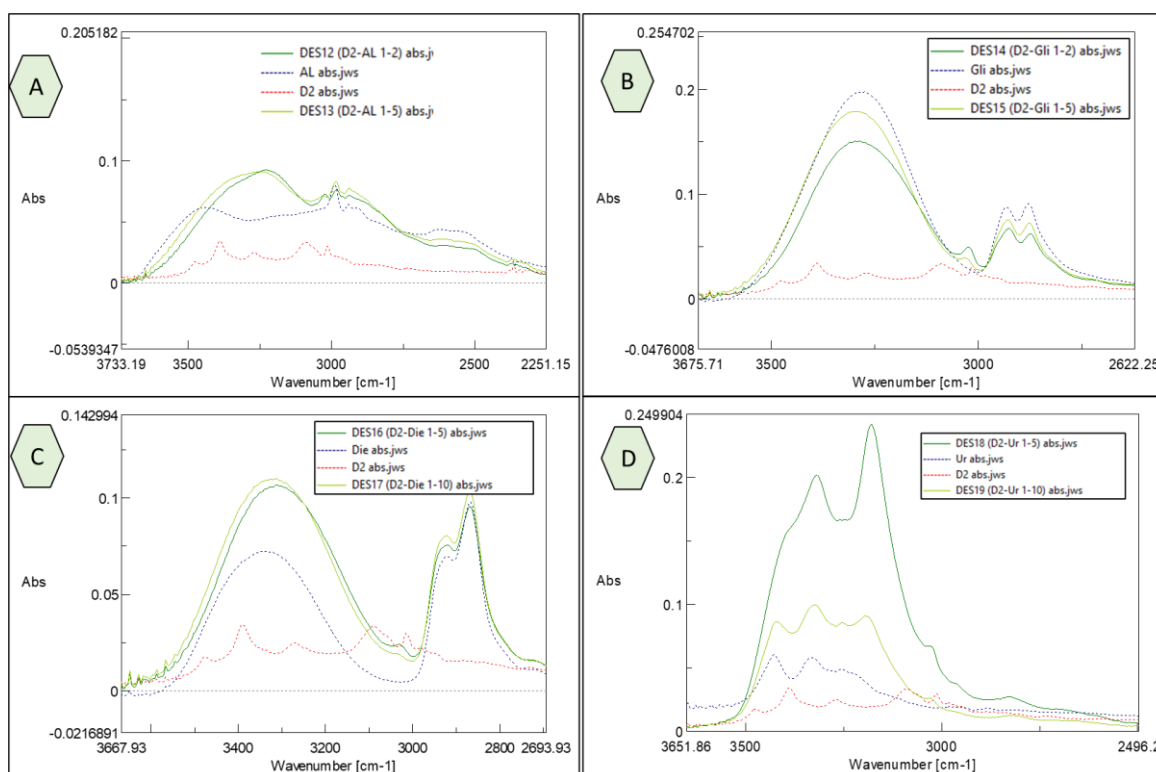


Figura 5.7. Espectros FT-IR con la zona del O-H/N-H ampliada de algunos de los DES's sintetizados. Comparaciones entre el DES y sus respectivos compuestos formadores donde el HBA usado es la D2. **(A).** DES 12,13 y HBD:AL. **(B).** DES 14, 15 y HBD:Gli. **(C).** DES 16, 17 y HBD:Die. **(D).** DES 18,19 y HBD:Ur.

Tanto en las anteriores figuras, como en todos los espectros revisados y analizados de los DES's sintetizados en este trabajo, el estiramiento del O-H se solapa con el estiramiento del N-H y es la banda de ν del O-H donde más se evidencian los cambios en el espectro, esto ya ha sido evidenciado por diversos autores (6,249). Chroma y colaboradores percibieron el mismo comportamiento en DES's formados por bromuro de tetrabutilamonio y glicerol en distintas relaciones molares. Según sus hallazgos, a medida que aumentaba la cantidad de Gli en los DES's, el enlace -OH se desplazaba hacia un número de onda inferior. Este resultado puede explicarse por la formación de nuevos enlaces de hidrógeno en las proximidades del grupo -OH (es decir, $\text{O-H}\cdots\text{Br}$, $\text{O-H}\cdots\text{O-H}$). Además, el resto de los picos de los espectros de los DES's correspondientes al tramo C-O-C (1180 cm^{-1}), C-O (1112 cm^{-1}), C-H de CH_2 ($2960\text{-}2932\text{ cm}^{-1}$) y CH_3 ($2875,1\text{ cm}^{-1}$) permanecían en la misma posición, lo que indica que estos grupos no participan activamente en la formación de enlaces de hidrógeno (249).

Los demás espectros de los DES's comparados se encuentran en la sección Anexos: Espectros FT-IR, Figuras A37-A48.

5.4.9. RMN

El análisis RMN de los DES's consistió en realizar protones y analizar los espectros de ^1H -RMN obtenidos. En dicho análisis se evidenció un desplazamiento en algunos casos muy sutil en las señales del espectro de los DES's comparadas con los espectros de los compuestos formadores. Estos desplazamientos en las señales de los hidrógenos ya han sido reportados por otros autores y son esperadas cuando hay formación de enlaces de hidrógeno (X-H). Según Canela-Xandri (210) la longitud del enlace X-H suele aumentar en la formación del enlace de hidrógeno, lo que provoca un desplazamiento al rojo de la frecuencia de estiramiento X-H en el infrarrojo y un aumento de la sección transversal de absorción en el infrarrojo para la vibración de estiramiento X-H. Los espectros RMN se encuentran en la sección de Anexos: Espectros RMN, Figuras A14-A35 junto con la información de las constantes de acoplamiento y los multipletes.

En la Figura 5.8. se pueden observar las estructuras de las moléculas de las nuevas Disales sintetizadas usadas como HBA's.

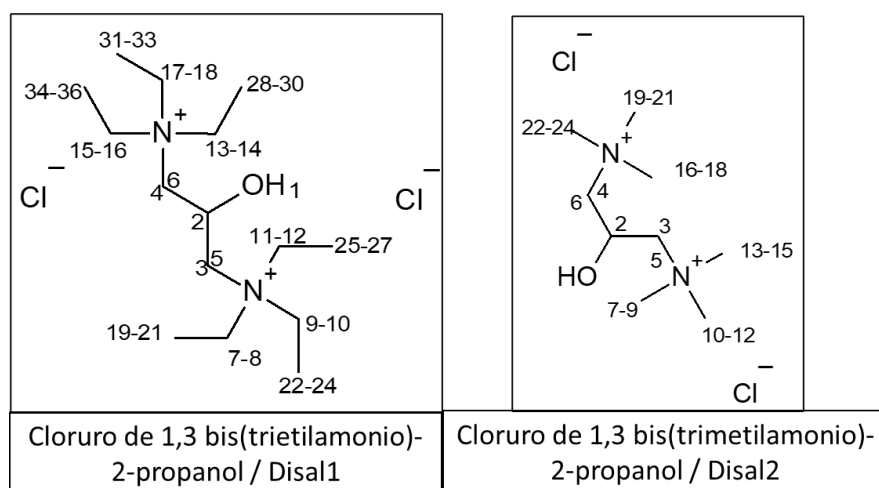


Figura 5.8. Número de protones de las moléculas usadas como HBA's para los DES.

Como se observa en la Figura 5.8, se determinó el número de protones. La identificación de estos protones que fue realizado en las RMN y junto con los desplazamientos identificados (para las disales 1 y 2) y los conocidos a partir de la literatura de las HBD's, se pudo identificar los cambios generados por la formación de los DES's.

En la Tabla 5.3., se pueden evidenciar los valores de los desplazamientos químicos de las señales de los protones en el espectro de RMN, encontrados en la formación de los DES's en comparación con sus HBA's y HBD's. Los colores en la tabla discriminan la intensidad de las señales (de la más alta a la más baja) en el siguiente orden: verde, azul, blanco y gris (siendo verde la más intensa y habano la menos intensa).

Tabla 5.3. Desplazamientos de las señales correspondientes a los protones en los espectros RMN (ppm) encontrados en los DES's en comparación con sus precursores.

| Compuesto | HBA's | | | | | | HBD's | | | | |
|---------------------|------------------------|----------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|------------|---------------|-----------------|------|-----------------|
| | Señales protones (ppm) | | | | | | | | | | |
| | H1. OH | H2 CH | H3-H5 (CH ₂) | H4-H6 (CH ₂) | H7-H18 (CH ₂) | H19-H36 CH ₃ | | OH | CH ₂ | OH | CH ₃ |
| D1* | 1,47 | 4,04 | 2,62 | 2,65 | 2,79 | 0,6 | | | | | |
| D2* | 3,86 | 4,12 | 2,75 | 2,75 | 2,53 | | | | | | |
| DES's | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | AL | | 4,03 | | 1,22 |
| DES1 (D1:AL 1:5) | 2,16 | 4,67 | nd | nd | 3,44 | 1,19 | | | 4,04 | | 1,23 |
| DES2 (D1:AL 1:10) | 2,16 | 4,67 | nd | nd | 3,44 | 1,19 | | | 4,04 | | 1,23 |
| DES12 (D2:AL 1:2) | 4,91 | 4,16 | 3,41 | nd | 3,22 | nd | | | 4,04 | 1,39 | 1,22 |
| DES13 (D2:AL 1:5) | 4,26 | 4,1 | 3,41 | 2,71 | 2,53 | nd | | | 3,41 | 0,58 | 0,72 |
| | | | | | | | Gli | 4,49- 4,37 | 3,42 | 3,35 | 3,29 |
| DES3 (D1:Gli 1:5) | 2,08 | 4,66 | nd | nd | 3,37 | 1,21 | | 4,48 | 3,42 | 3,34 | 3,29 |
| DES4 (D1:Gli 1:10) | 2,08 | 4,66 | nd | nd | 3,38 | 1,21 | | 4,42 | 3,42 | 3,35 | 3,29 |
| DES14 (D2:Gli 1:2) | 4,64 | nd | 3,42 | nd | 3,22 | nd | | 4,64 | 3,43 | 3,35 | 3,28 |
| DES15 (D2:Gli 1:5) | 4,53 | nd | 3,41 | nd | 3,22 | nd | | 4,53 | 3,41 | 3,34 | 3,27 |
| | | | | | | | Die | 4,45 | 3,39 | 3,38 | |
| DES5 (D1:Die 1:5) | nd | nd | 3,50- 3,39 | 3,50- 3,39 | 3,49 | 1,21 | | 4,61 | 3,42 | 3,41 | |
| DES6 (D1:Die 1:10) | nd | 4,68 | 3,50- 3,38 | 3,50- 3,38 | 3,5 | 1,21 | | 4,6 | 3,46 | 3,41 | |
| DES16 (D2:Die 1:5) | nd | 4,78 | 3,48 | 3,48 | 3,22 | nd | | 4,62 | 3,42 | 3,41 | |
| DES17 (D2:Die 1:10) | nd | 4,79 | 3,5 | 3,4 | 3,22 | nd | | 4,6 | 3,47 | 3,42 | |
| | | | | | | | Ur | 5,49 | 4,91 | | |
| DES7 (D1:Ur 1:5) | nd | nd | 3,42 | 3,44 | 3,38 | 1,21 | | 5,48 | | | |
| DES8 (D1:Ur 1:10) | nd | nd | 3,42 | 3,44 | 3,38 | 1,21 | | 5,5 | | | |
| DES18 (D2:Ur 1:5) | nd | nd | 3,42 | nd | 3,22 | nd | | 5,53* | | | |
| DES19 (D2:Ur 1:10) | nd | nd | 3,39 | nd | 3,21 | nd | | 5,49 | | | |
| | | | | | | | Eti | 4,44 | 3,39 | 3,38 | |
| DES9 (D1:Eti 1:2) | nd | 4,67 | 3,44 | 3,42 | 3,39 | 1,21 | | 4,54 | 3,38 | 3,38 | |
| DES10 (D1:Eti 1:5) | 5,5 | nd | 3,41 | 3,41 | 3,39 | 1,21 | | 4,52 | 3,39 | 3,37 | |
| DES20 (D2:Eti 1:2) | nd | 4,12 | 2,74 | 2,74 | 2,55 | nd | | 3,6 | 2,77 | 2,77 | |

| | | | | | | | | | | | |
|--------------------|----|------|------|------|------|------|----|------|------|------|--|
| DES21 (D2:EtI 1:5) | nd | 4,12 | 2,74 | 2,74 | 2,56 | nd | | 3,72 | 2,79 | 2,79 | |
| | | | | | | | AO | 1,2 | 1,18 | | |
| DES11 (D1:AO 1:5) | nd | 4,69 | 3,48 | 3,37 | 3,44 | 1,21 | | 1,2 | | | |
| DES22 (D2:AO 1:5) | nd | 4,74 | 3,41 | nd | 3,22 | nd | | 1,2 | | | |

Como se evidencia en la tabla, hay cambios en los desplazamientos de algunos de los protones de las moléculas de los espectros, principalmente evidenciados para los enlaces OH de las disales y los HBD's, lo que confirma la formación de los enlaces de hidrógeno de los DES's. La formación de puentes de hidrógeno. En algunos casos las señales pueden estar solapadas como en el caso de los espectros FT-IR por lo que algunas no son detectadas principalmente para los OH. Los desplazamientos entre el OH de la Disal 1 o 2 para casi todos los casos son de al menos -0,61 ppm hacia arriba, además para algunos espectros llega a ser de hasta -4 ppm. Estos cambios pueden ser causados por un aumento de los enlaces hidrógeno intramoleculares o por la generación de enlaces más fuertes (210). También se observan cambios más sutiles en los desplazamientos de los CH y CH₂, pero mucho más notorios en los CH₃, lo que también concuerda con la formación de enlaces de hidrógeno.

En algunos de los espectros RMN se evidenciaron ensanchamiento de las señales, los DES con alta viscosidad y las interacciones inter e intra-dipolares pueden causar este efecto (249,250).

El análisis de las RMN es una herramienta útil para valorar los desplazamientos generados por los enlaces de H y su análisis es complejo sobre todo cuando de enlaces de hidrógeno se trata. Muchos aspectos influyen en la asignación correcta de las señales y los desplazamientos. En la formación de compuestos como los DES's se debe tener en cuenta el efecto de apantallamiento. Además, es importante tener en cuenta que varios aspectos pueden causar el desplazamiento (no sólo a la transferencia de carga y a la polarización de la densidad de electrones asociada al fenómeno del enlace H, causa el desplazamiento medio del protón, sino también a la simple presencia del grupo aceptor del protón, incluso en ausencia de tal interacción atractiva) (251).

5.4.10. Actividad antimicrobiana

Hay distintas maneras de medir la "toxicidad" de los DES's pero la mayoría de los estudios se centran en ensayos de actividad antimicrobiana con cepas bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas, cepas de hongos de levadura y moho (252). A menudo en muchas publicaciones científicas sobre DES's se usa el erróneo concepto de "toxicidad" a lo que realmente es la inhibición de crecimiento microbiano o actividad antimicrobiana. Determinar si los DES's generan algún tipo de inhibición del crecimiento microbiano, es una cuestión crucial para el

diseño de materiales ecológicos y seguros, ya que los DES's se usan para el procesamiento de materias primas y los materiales obtenidos se aplican en la alimentación o en la agricultura u otros diversos materiales (121). La actividad antimicrobiana de los componentes precursores de (HBA's y HBD's) puede tener relación directa la que tenga un DES. Sin embargo, diferentes autores han reportado que algunos de sus DES's sintetizados tienen menor actividad antimicrobiana que sus componentes precursores (253,254). Aunque también los DES's no deben asumirse automáticamente como no "tóxicos" pese a que se preparan a partir de compuestos naturales (116).

Las pruebas con microorganismos suelen llevar un largo tiempo, sobre todo si se quiere hacer un trabajo cuidadoso y estructurado. El trabajar con microorganismos puede llegar a ser impredecible. Debido al limitado tiempo disponible por la finalización de las actividades del proyecto, se decidió probar la actividad antimicrobiana de los compuestos precursores de los DES's. Esto teniendo en cuenta que los HBA's son compuestos nuevos que se han caracterizado, teniendo solo la información obtenida por mis propios experimentos. Se llevaron a cabo ensayos de actividad antimicrobiana, donde se midió la inhibición en el crecimiento de algunos microorganismos causada por los nuevos compuestos HBA's sintetizados (Disal 1: Cloruro de 1,3 (bis)trietilamonio-2-propanol y Disal 2: Cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol) y los HBD's usados (ácido láctico, glicerol, dietilenglicol, etilenglicol, urea y ácido ascórbico) para la síntesis de los DES's. Se ensayaron distintas concentraciones de los compuestos a ensayar (2000, 200, 150, 100 y 50 ppm) según lo descrito previamente en la metodología, donde se encuentra el listado de microorganismos, los cultivos usados y los controles. Los ensayos midieron los halos de inhibición en el crecimiento microbiano en (mm), que luego fue expresado en porcentaje. Recordemos que se midió el halo de inhibición y en función del control se realizaron los cálculos para determinar el porcentaje de inhibición con la Ecuación 4.1. y 4.2. descritas en métodos. Para el análisis se van a usar los datos obtenidos con el ensayo de concentraciones más elevadas, puesto que si no esta concentración no hay inhibición del crecimiento microbiano (siendo la más alta), con las demás tampoco lo habrá. Así, en la Tabla 5.4., se pueden evidenciar los resultados del porcentaje de inhibición obtenido para los experimentos con la concentración de 2000 ppm de los compuestos ensayados.

Tabla 5.4. Porcentaje de inhibición de crecimiento microbiano para los compuestos ensayados.

| <i>Compuesto</i> | D1 | D2 | AL | Gli | Ur | Eti | Die | AO | H ₂ O | Terramicina o captan* |
|-----------------------|------------------------------|----|----|-----|----|-----|-----|----|------------------|--------------------------|
| <i>Microorganismo</i> | Porcentaje de inhibición (%) | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | |
|--|----|----|----|---|----|----|---|---|---|-----|
| <i>B. cereus</i> | 22 | 13 | 13 | 9 | 13 | 13 | 0 | 0 | 5 | 100 |
| <i>S. aureus</i> | 25 | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| <i>L. Monocytogenes</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| <i>E. coli</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| <i>S. enterica</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50 |
| <i>P. mirabilis</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50 |
| <i>S. cerevisiae</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 88 |
| <i>A. flavus</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50* |
| <i>R. oryzae</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50* |
| Donde: D1: Disal 1; D2: Disal 2; AL: ácido láctico; Gli: glicerol; Ur: urea; Die: dietilenglicol; AO: ácido oxálico; H ₂ O: agua destilada; | | | | | | | | | | |

Los resultados obtenidos para las pruebas de actividad antimicrobiana realizadas a los componentes de los DES's sintetizados muestran que ni las nuevas disales (HBA's) ni los HBD's usados para la síntesis de los DES's son tóxicos. Esto dado que ninguno de los compuestos ensayados mostró porcentajes de inhibición del crecimiento microbiano mayores al 25 % con la concentración más alta ensayada (2000 ppm). Por encima de 25 % de inhibición se puede considerar que hay algún tipo de inhibición microbiana (los agentes microbiológicos, se consideran y catalogan entre sensibles y resistentes según el halo de inhibición y las normas establecidas por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (NCCLS) donde por regla general, un diámetro de inhibición de 30 a 35 mm es indicativo de una cepa altamente sensible al compuesto ensayado) (255). Como se observa en la Tabla 5.4, solo para 2 de los microorganismos se evidenció algo de inhibición, pero con porcentajes de inhibición inferiores al 25%. Sin embargo, en la mayoría de los casos y para todos los demás microorganismos los porcentajes de inhibición fueron nulos. Para los experimentos con menores concentraciones (200, 150, 100 y 50 ppm) de los compuestos HBA's y HBD's en todos los casos el porcentaje de inhibición fue inexistente.

El hecho de que los compuestos formadores de los DES's no tienen inhibición microbiana no significa que los DES's como tal no la tengan, podría ser, pero sería necesario realizar los ensayos también a los DES's. Esto podría ser otra línea de estudio para futuras investigaciones del grupo ya que algunos DES's se han estudiado como agentes antimicrobianos. Wikene y colaboradores (2017) investigaron un efecto antimicrobiano (en cuatro bacterias y un hongo) de los NADES (ácido cítrico/sacarosa y ácido málico/fructosa/glucosa) en distintas relaciones molares. En este estudio comprobaron la influencia de la dilución en la red de NADES y sus propiedades

antimicrobianas sobre diversos microorganismos (256). Otros autores también han reportado las propiedades antimicrobianas de diversos DES's para algún grupo de microorganismos (257–259).

Los estudios de actividad antimicrobiana que en los DES's suelen ser usados para medir la posible toxicidad, cada vez son más importantes y se van incorporando variables para hacerlos de manera que se tengan resultados fiables (252). En este contexto, hay diversos reportes que informan sobre la actividad antimicrobiana los DES's (119,252,254,257,258) expresada para ellos como “toxicidad”. El número de estudios cada vez mayor ha sugerido que la “toxicidad” de los DES's puede ser dependiente de la especie de microorganismo ensayado y estar asociada a los efectos variados de los componentes de los DES's en el microorganismo objetivo (252,254). Esto también lo ha mencionado Junedi y colaboradores (2018), que concluyo que cada sistema mostró una respuesta diferente (en sus ensayos) y el resultado no puede generalizarse a otros sistemas u organismos (253).

5.5. CONCLUSIONES

- ✓ Se caracterizaron los 22 DES's sintetizados mediante técnicas de RMN y espectroscopia FT-IR, midiendo algunas de sus propiedades como: densidad, punto de ebullición, pH, conductividad, viscosidad, etc.
- ✓ De los 22 DES's sintetizados, catorce fueron líquidos a temperatura ambiente (DES's 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 21). Cuatro (DES's 9, 11, 20 y 22) presentaron un grado de cristalización mínimo con una consistencia sólida (pastosa). Y solo 3 fueron sólidos (DES's 7, 8 y 9).
- ✓ Los puntos de fusión medidos para los DES's 7, 8 y 19, fueron 95, 75 y 80 °C, los cuales cumplieron con la característica de los DES's de ser menores a sus compuestos formadores y menores a 100 °C
- ✓ La densidad de los DES's estuvo dentro de los rangos reportados para solventes de este tipo (1,11 y 1,22 g/cm³) al igual que el rango de pH con resultados entre -0,4 y 8,5 en función de la acidez relativa de sus componentes.
- ✓ La viscosidad de los DES's obtuvo valores entre 83,5 cP (DES17) y 830 cP (DES1). Los DES's compuestos por glicerol como HBD, obtuvieron valores mucho más altos que los demás (entre 1688 (DES3y) 24063 cP (DES15)).

- ✓ Los DES's sintetizados presentaron bajas conductividades en general con rangos entre 122,7 S/cm (DES3) y 2760 (DES21). Se observó una relación inversa entre la viscosidad y conductividad de los DES.
- ✓ Los espectros de los DES's mostraron indicios de la formación de enlaces de hidrógeno, puesto que, con la formación de estos enlaces, las vibraciones de estiramiento de los O-H cambian y con ello la longitud de onda y la intensidad de los picos. Estos cambios fueron reflejados por los espectros de los DES's cuando se compararon con sus compuestos precursores. En los espectros RMN también se observó este comportamiento.
- ✓ De los compuestos formadores o precursores de los DES's (HBA's: Disal 1 y Disal 2; HBD's: ácido láctico, glicerol, dietilenglicol, urea, etilenglicol y ácido oxálico) ninguno tiene capacidad antimicrobiana.

6. FRACCIONAMIENTO DE BIOMASA LIGNOCELULOSICA (BML) CON NUEVOS DES's

6.1. ANTECEDENTES

Muchos productos químicos comerciales clave son compuestos aromáticos derivados en última instancia de materias primas petroquímicas. La lignina es rica en compuestos aromáticos y constituye entre el 25 y 35 % de la biomasa lignocelulósica (BML), por su parte la celulosa también es componente mayoritario de la BML (1). El aprovechamiento de la BML para la extracción de compuestos de interés industrial (como la celulosa o la lignina) se ha convertido en un factor determinante para seguir en el camino de la sostenibilidad. Hoy en día se busca aprovechar la BML, pero su aprovechamiento también implica la investigación de métodos más amigables con el medio ambiente para la extracción de los compuestos de interés (lo que llamamos fraccionamiento). Tradicionalmente los solventes han sido fundamentales en los procesos de fraccionamiento, pero ya sabemos que muchos de estos están en camino a ser reemplazados por los solventes verdes. En los dos capítulos se mostró la síntesis de 22 nuevos DES's y su caracterización, donde se les midieron algunas de sus propiedades. Los nuevos DES's sintetizados podrían representar una alternativa a los solventes en el proceso de fraccionamiento de BML. Es por ello que se probaron para la extracción de compuestos como la celulosa y lignina en distintas fuentes de BML.

Hoy en día gracias a la bioinformática existen distintos programas informáticos (cada vez más avanzados) que estudian parámetros y ayudan a minimizar el tiempo requerido para el estudio de procesos de extracción y las relaciones existentes entre solutos y solventes. EL software COSMO -RS es una herramienta de este tipo, que se usó para determinar teóricamente la capacidad de los DES's para solubilizar diferentes compuestos de interés a partir de BML, y ser usados como solventes en la extracción de dichos compuestos. Este software es capaz de considerar las propiedades termodinámicas de los solventes y los solutos (valorando las interacciones de las moléculas que componen el sistema) lo que se puede denominar un estudio químico-cuántico unimolecular.

En este capítulo, compararemos el resultado del estudio teórico con los resultados experimentales de la extracción de celulosa y lignina a partir de BML utilizando los nuevos DES's sintetizados en este estudio

6.2. MATERIALES

6.2.1. Reactivos

Ácido sulfúrico (96 %), ácido fórmico (98 %), lignina alcalina (kraft), ácido fórmico (>88 %), estándares de poliestireno y poli(2-vinilpiridina) se adquirieron de Sigma Aldrich (EE.UU.). Hidróxido de sodio (NaOH) (97 %) y ácido sulfúrico (>95 %) se adquirieron de Fischer (EE.UU.). El etanol (96 %) y la acetona ($\geq 99,8$ %) se adquirieron de Scharlau (España).

6.2.2. Equipos

Se usaron las balanzas de precisión de Gram (España) y A&D Weighing. Se usaron placas calefactoras-agitadoras y termómetros electrónicos con sensor de temperatura de IKA® (España) y Radleys discovery technologies (U.K.) para mantener la temperatura y su control en las reacciones. El secado se realizó en el horno P Selecta® (España). La evaporación se realizó con el equipo de evaporación rotatoria R210 de BUCHI (Suiza). Para la determinación de fibras de las muestras (determinación de celulosa, hemicelulosa, lignina) se usó el extractor “Dosi-fiber JP” de Selecta con 6 plazas (España) y con el analizador de fibras Ankom 200 (EE.UU.). La mufla utilizada para la determinación de cenizas fue Carbolite Gero Limited (U.K.). Para disminuir el tamaño de partícula de la biomasa se usó el triturador BLENDER A11 Basic de IKA® (Alemania) y el tamiz utilizado fue un Sieve labopolis (España). Las caracterizaciones FT-IR se realizaron en un equipo Jasco (FT-IR 6300) (Japón) utilizando el accesorio de muestreo PIKE MIRacle™ ATR (Diamond / ZnSe), rango espectral de 4000 a 650 cm^{-1} , 64 barridos y resolución de 4 cm^{-1} . El equipo de ultrasonido usado fue “Ultrasonic cleaner Branson®” de Branson Ultrasonic Corporation (EE.UU.). La centrifugación se realizó con el equipo Hettich Zentrifugen EBA21, de Andreas Hettich GmbH & Co. (Alemania). También se usó el equipo RMN, MERCURY plus NMR de 400 MHz (EE.UU.) con los distintos solventes deuterados. Para la cromatografía por permeación de gel, se utilizó el instrumento Varian ProStar equipado con un detector UV-vis y dos columnas PolarGel-L (300 × 7,5 mm).

6.3. MÉTODOS

6.3.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los extractos obtenidos fueron sometidos a ensayos de RMN. Los espectros fueron analizados con el programa MestRenova y sirvió para la identificación de las señales correspondientes a la presencia de compuestos como la celulosa y lignina, entre otros. Técnica y equipo descritos en el ítem 3.1.1.2 y 4.3.2.1.

6.3.2. Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).

Los extractos obtenidos fueron sometidos a ensayos de espectrofotometría con el FT-IR. Los espectros fueron analizados con el programa Spectra Manager y sirvió para la identificación de las señales correspondientes a la presencia de los compuestos de interés. Técnica y equipo descritos en el ítem 4.3.2.1.

6.3.3. Método computacional COSMO-RS

Se usó el método computacional: Cribado de Conductores para Disolventes Reales (COSMO-RS, por sus siglas en inglés "*Conductor-like Screening Model for Real Solvents*") (30) para determinar y predecir teóricamente las propiedades termodinámicas de mezclas DES's. El objetivo del estudio fue valorar DES's (posibles mezclas y algunos de los DES's sintetizados) como solvente para el fraccionamiento de BML sin datos experimentales. De acuerdo con la composición de los residuos de cultivo a ensayar (materiales lignocelulósicos por ser residuos del agro) (37,60), se decidió usar como solutos en este estudio teórico de solubilidad dos tipos de modelos, uno para azúcares simples (monómero de glucosa o dímero como la celutetraosa (260)) y otro para algunas de las unidades fenilpropano monoméricas (monolignoles) básicas de la lignina (como lo es el alcohol *p*-cumarílico y el alcohol sinapílico) (56,65,66). Y como solventes DES, representados por las mezclas en las proporciones más comúnmente usadas entre HBA's (Disal 1 y Disal 2) y HBD's (ácido láctico, glicerol, dietilenglicol, urea, etilenglicol y ácido oxálico (Proporción HBA: HBD: 0,5:1- 1:1- 1:2 y 1:5 p/p).

Procedimiento COSMO-RS

Se realizó la predicción de la solubilidad de los solutos (compuestos modelo para la celulosa (glucosa y celutetraosa) y la lignina (alcohol *p*-cumarílico y el alcohol sinapílico)) en los DES's utilizados como solventes DES's (0,5:1- 1:1- 1:2 y 1:5 p/p) y teniendo en cuenta dos temperaturas (60 y 120 °C).

Las diferentes moléculas involucradas fueron modelizadas a partir de su estructura química en el software COSMO-RS. El procedimiento fue abrir el programa, seleccionar "*Nuevo compuesto*" dibujar la estructura química del compuesto y luego seleccionar "*Generar molécula*"; si el compuesto era alguno no conocido también se podía generar la molécula a partir de su nomenclatura SMILES del inglés "*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*"). Una vez modelizadas, se introdujeron en un conductor virtual donde se calculó la densidad de carga de

polarización en su superficie (superficie σ). El cálculo se realizó para cada molécula de interés. En las modelizaciones las moléculas se representan con distintos colores según las distintas regiones de carga. Las regiones polares muy positivas (+) en azul y las polares muy negativas (-) en rojo, las zonas de menor polaridad en amarillo y verde.

El segundo paso utiliza el cálculo termodinámico estadístico donde se relacionan las variables de los compuestos. La termodinámica de las interacciones moleculares que se basan en el “perfil obtenido” se utilizan para calcular el potencial químico del segmento superficial (σ -potencial) en las otras moléculas (77,132,163,167). La solubilidad relativa se calcula a partir de los parámetros de solubilidad según la ecuación 6.1. (28,30).

Ecuación 6.1.

$$\log_{10}(x_j) = \log_{10}[\exp((\mu_j^{puro} - \mu_j^{Solvente} - \Delta G_{j,fusión})/RT)]$$

Donde:

μ_j^{puro} : potencial químico del compuesto puro j (J/mol); $\mu_j^{Solvente}$: potencial químico de j a dilución infinita (J/mol); $\Delta G_{j,fusión}$: energía libre de fusión de j (J/mol); x_j : solubilidad de j (g/g solvente); R : constante de los gases; T : temperatura (°K).

Como se observa en la ecuación los cálculos realizados por el software, relación valores termodinámicos. La solubilidad relativa se calcula siempre en dilución infinita. El logaritmo de la mejor solubilidad se fija en 0 y todos los demás disolventes se dan en relación con el mejor disolvente. Un disolvente con un valor $\log_{10}(x_j)$ de -1,00 produce una solubilidad que se reduce en un factor 10 en comparación con el mejor disolvente. Además, el logaritmo se transformó en la probabilidad de solubilidad y se expresó en porcentaje. Al final se obtuvo una tabla de probabilidad de solubilidad de los solutos en los solventes, expresada en porcentaje

6.3.4. Fraccionamiento de BML

6.3.4.1. Selección de solventes a ensayar y protocolo de fraccionamiento.

Considerando los resultados del estudio teórico de solubilidad realizado con el Software COSMO-RS, se seleccionaron los DES's a ensayar como solventes para la extracción de celulosa y lignina a partir de 6 diferentes materiales lignocelulósicos. Se ensayaron principalmente residuos de cultivo (ramas de nectarina (Nec), ramas de ciruelo (Cir), ramas de melón (Mel),

ramas de albaricoque (Alb), ramas de paraguay (Par) y harina de alcachofa (Alca)). El procedimiento de extracción se basó en el descrito por Cequier y colaboradores (98) con algunas modificaciones.

En un tubo de vidrio (pesado) con tapa rosca siliconada se pesaron aproximadamente 0,3 g del material lignocelulósico y se sometió al fraccionamiento con los distintos DES's en una relación 1:10 (muestra/solvente). Los tubos de ensayo cerrados se ubicaron en una placa calefactora y se sometieron a calentamiento (120 °C) con agitación constante durante 6h. Pasado el tiempo de la reacción, se realizó la adición del etanol para disminuir la viscosidad de la muestra (5 mL aproximadamente). La muestra se centrifugó 5000 rpm y se separó el sobrenadante (sobrenadante 1) del residuo 1 (rico en celulosa). El residuo 1 fue lavado con etanol de 3 a 5 veces y llevado a secado en estufa a 60 °C por mínimo de 12 h y luego pesado. El etanol del sobrenadante se evaporó, y al residuo obtenido se puso en un tubo falcón pesado, se le adicionaron 25 mL de agua destilada para precipitar la lignina. La separación de fases se llevó a cabo por centrifugación, donde se obtuvo el residuo 2 (rico en lignina). El residuo 2 fue lavado 3 veces con agua acidificada (ácido fórmico o ácido sulfúrico al 1 %) y luego con agua destilada. Posteriormente se llevó a secado en estufa a 60 °C por un mínimo de 12 h. Se dejaron enfriar los residuos en el desecador y se pesaron. El rendimiento de las extracciones (realizadas por duplicado) se determinó por diferencia de pesos (inicial y final de los envases) y los residuos sólidos fueron caracterizados mediante FT-IR.

6.3.4.2. Determinación de fibras y cenizas en la BML

Se utilizó el método de determinación de fibra de Van Soest (261,262), método estándar oficial descrito para la determinación de celulosa bruta, según la normativa del Real Decreto 2257/1994 y otros métodos oficiales internacionales. Este método determina la fibra en tres pasos. En el primer paso se determinó la fibra neutro detergente (FND), que proporciona el porcentaje de extraíbles en estas condiciones, mientras que la hemicelulosa, celulosa y lignina permanecen como residuo. En el segundo paso se determinó la fibra ácido detergente (FAD), compuesta principalmente por celulosa y lignina siendo altamente indigerible. En el tercer paso se realizó la hidrólisis ácida de los polisacáridos (celulosa) para obtener la lignina como residuo único. La cantidad de extraíbles (cenizas) es la diferencia entre el peso inicial y el FND. La cantidad de hemicelulosa se obtiene por diferencia de peso entre FDN y FAD, y la cantidad de celulosa se obtiene por diferencia de peso entre el FAD y la hidrólisis ácida. Las determinaciones se realizaron sobre la muestra preparada (molida y seca) y por duplicado. Se realizaron los ensayos en dos equipos diferentes por nueva adquisición de material de laboratorio.

- “Dossi fiber”: Para la determinación de la FND, se pesó 1 g de cada una de las muestras, se puso en reflujo con la solución neutro detergente (SND) adicionando gotas de trietilenglicol (antiespumante) y se dejó en extracción (1 h, posterior a ebullición). Se lavó con agua destilada caliente y se filtró. Se retiró del equipo y se lavó en frío con acetona. Se llevó a secado en estufa (105 °C; 12 h). Para la determinación de la FAD, se pesó 1 g de muestra, se puso en reflujo con la solución ácido detergente (SAD) y las gotas de antiespumante, se dejó extraer (1 h). Se lavó con agua destilada caliente, filtrando en el equipo. Se retiró del equipo y se realizó un lavado en frío con acetona, se llevó a secado en estufa a (105 °C; 12 h). Finalmente, para la hidrólisis ácida, a la muestra seca se le adicionó ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 72 %, se agitó a temperatura ambiente durante 3 h, se lavó con agua destilada, se filtró y se llevó a secado en estufa (105 °C; 12 h). Las determinaciones para obtener celulosa, hemicelulosa y lignina fueron realizadas por duplicado. La determinación del contenido en cenizas de la muestra se realizó en la mufla. Un gramo de muestra seca se sometió a calentamiento aumentando gradualmente la temperatura del horno hasta 500 °C y se mantuvo durante 3 h.
- Digestor ANKOM: El análisis se realizó en las bolsas filtrantes que trae el equipo donde se pesó 0,5 g (± 0,05 g) de cada muestra a analizar, se selló las bolsas cercano al borde y posteriormente se distribuyó la muestra en la bolsa (en este equipo se pueden procesar un máximo de 24 muestras por digestión). Las muestras se realizaron por duplicado. También se pesó dos bolsitas de filtro para determinar el blanco. Se adicionaron 1500 mL de la SND y 4 mL de alfa amilasa termoestable en el vaso digestor y se calentó entre 90 -100 °C, dentro del vaso digestor antes de colocar las muestras. Se puso las bolsas con las muestras en la gradilla y una vez que la solución está caliente, se colocaron en el vaso digestor y posteriormente este se cerró y se selló. Se digesto con agitación durante 60 min. Transcurrido el tiempo, se detuvo la digestión, se liberó la presión (abriendo la válvula) y luego se destapo el vaso. Se dreño la SND y se volvió a cerrar la válvula después de que la solución había salido del vaso. Se agrega 2 L de agua destilada a 70-90 °C con 4 mL de alfa amilasa, se cerró el vaso y se agito por 3 – 5 min esto se repitió. Posteriormente, se hicieron 2 lavados más solo con agua destilada. Se sacaron las bolsas del digestor y se retiró el exceso de agua de estas presionándolas, se lavaron con acetona por inmersión durante tres minutos. Se removió el exceso de agua y las bolsas se dejaron secar a temperatura ambiente. Luego se completó el secado a 60 °C durante 4 h. Se enfriaron en desecador y se pesaron (muestras y blancos). Para la determinación de la FAD, se calentó entre 90-100 °C la SAD dentro del vaso digestor, se colocaron las muestras y cerro el vaso de digestión. Se dejó en

digestión con agitación 60 min, posteriormente se detuvo y se dejó bajar la temperatura a 70 °C. Se adicionaron 2000 mL agua destilada a temperatura ambiente, se cerró y dejó en agitación por 5 min, este lavado se repitió 2 veces. Se sacaron las bolsas del digestor, se les retiró el exceso de agua y se llevaron a secar. Se tomaron los pesos respectivos y se realizaron los cálculos.

6.3.4.3. Determinación de los pesos moleculares promedio de la lignina obtenida mediante cromatografía por permeación de gel (GPC)

Algunas de las ligninas obtenidas de los residuos de cultivo (2 muestras con mayores porcentajes de extracción) se sometieron a GPC. Se utilizó un instrumento Varian ProStar equipado con un detector UV-vis y dos columnas PolarGel-L (300 × 7,5 mm). Se utilizó DMSO con 0,1 % de bromuro de litio (LiBr) como eluyente. Las muestras (entre 4 y 8 mg) se disolvieron en 5 mL de DMSO (0,1 % de LiBr), la velocidad de flujo fue de 0,8 mL/min a 50 °C con una longitud de onda de detección de 260 nm. Los estándares de poliestireno que oscilaban entre 162 y 19.500 g/mol y de poli(2-vinilpiridina) de 37.500 g/mol (Sigma-Aldrich) se utilizaron para el calibrado del sistema.

6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.4.1. Predicción de la solubilidad con el programa COMOS-RS

El estudio teórico con el software COSMO-RS se realizó con las proporciones más usadas para la preparación de los DES's entre HBA's y HBD's (1:1, 1:2, 2:1, 1:5 y 1:10). Los HBA's usados como solventes fueron los nuevos compuestos sintetizados y los HBD's fueron algunos ampliamente reportados (como el glicerol, dietilenglicol, urea, ácido oxálico). Los compuestos empleados como solutos para modelizar la BML fueron la glucosa y la celutetraosa como modelos de la celulosa, y los alcoholes *p*-cumarílico y sinapílico como modelos de la lignina. Para el estudio teórico se utilizaron dos diferentes temperaturas (60 y 120 °C). En total se valoraron más 48 combinaciones de HBA's y HBD's. Los $\log_{10}(x_{RS})$ arrojados se expresaron en probabilidad de manera porcentual (la Tabla de la modelización con estos valores se encuentra en la sección Anexos Tabla A4). De acuerdo con los referentes teóricos los valores logarítmicos más cercanos a 0 son considerados como mejor solvente. Se debe tener en cuenta que la confiabilidad del método predictivo del programa COSMO-RS, se basa en el conocimiento de algunas variables termodinámicas de los compuestos, lo que es más complejo para todos los compuestos de nueva síntesis o en proceso de investigación que por ende no se poseen los datos suficientes (como la entalpía y entropía de fusión, la capacidad calorífica de fusión o la presión de vapor).

Los modelos de las moléculas usados en la modelización del software se muestran en la Figura 6.1

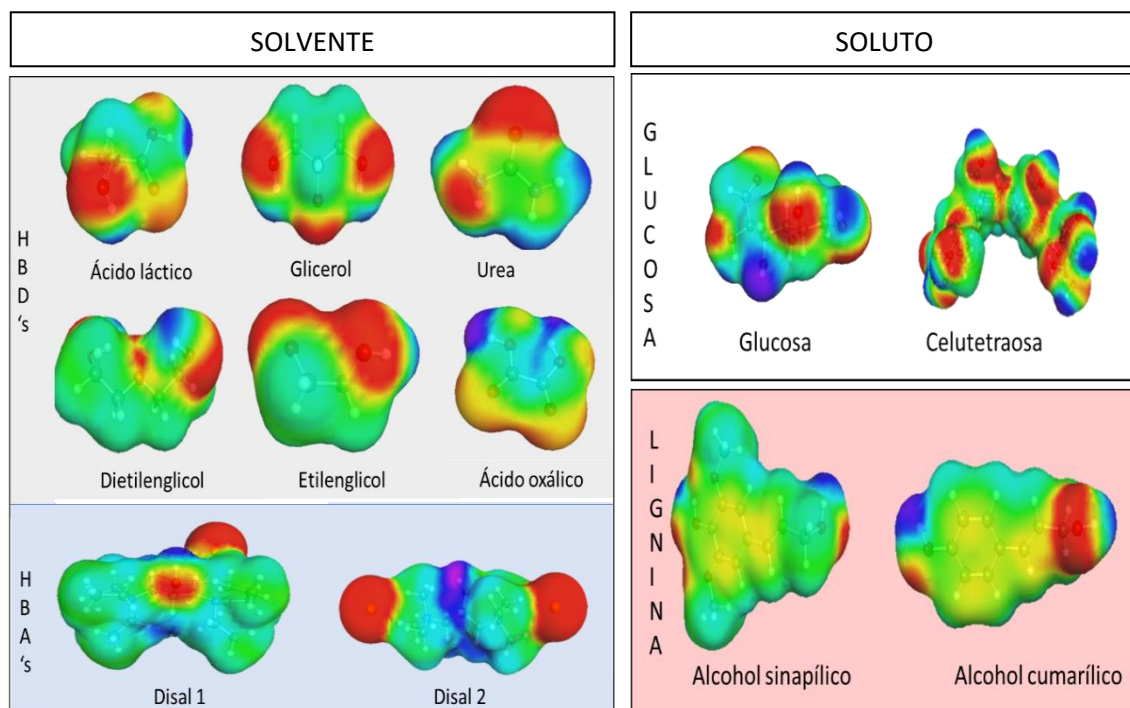


Figura 6.1. Modelos de moléculas usadas en el estudio teórico COSMO-RS. Solventes: DES's, HBD's (gris) y HBA's (azul claro). Solutos: moléculas que representan la celulosa (blanco) y la lignina (rosa). Los colores dentro de las moléculas representan su polaridad. Regiones polares fuertemente (+): azul, (-): rojo, verde y amarillo corresponden a la polaridad más bajas.

Con las moléculas modelizadas de la anterior figura, se realizaron los cálculos de probabilidad de solubilidad de los solutos (glucosa, celutetraosa, alcohol sinapílico y cumarílico) en los solventes. Los solventes fueron las mezclas en diferentes proporciones de los HBA's y HBD's, algunos de los cuales no se sintetizaron en el anterior capítulo, pues abarca un número mucho mayor de posibles combinaciones. En la Tabla 6.1. se muestran todas las combinaciones entre HBA's y HBD's y la probabilidad de solubilidad de los solutos, para cada modelo introducido en el COSMO-RS. La probabilidad en porcentaje fue calculada según la ecuación 5.1.

Tabla 6.1. Porcentaje teórico de solubilidad para 4 solutos calculado en el estudio teórico con el software COSMO-RS para las distintas combinaciones de HBA's y HBD's usados como solventes.

| Mezcla de solventes para DES | | | Modelo de soluto a solubilizar | | | | | | | |
|------------------------------|-----|---------|--------------------------------|--------|--------------|--------|----------------------|--------|--------------------|--------|
| | | | Celulosa | | | | Lignina | | | |
| | | | Glucosa | | Celutetraosa | | Alcohol p-cumarílico | | Alcohol sinapílico | |
| HBD | HBA | HBA:HBD | 60 °C | 120 °C | 60 °C | 120 °C | 60 °C | 120 °C | 60 °C | 120 °C |
| Probabilidad (%) | | | | | | | | | | |
| AL | D1 | 1:1 | 1,88 | 0,02 | 0,000 | 33,61 | 13,20 | 0,25 | 1,08 | 0,05 |
| | D2 | | 1,67 | 0,02 | 0,000 | 52,75 | 5,71 | 0,12 | 0,33 | 0,02 |
| | D1 | 1:2 | 0,36 | 0,01 | 0,001 | 24,86 | 4,31 | 0,13 | 0,81 | 0,05 |
| | D2 | | 0,50 | 0,01 | 0,000 | 34,45 | 3,27 | 0,10 | 0,42 | 0,03 |
| | D1 | 2:1 | 14,07 | 0,07 | 0,000 | 1,21 | 50,05 | 0,59 | 2,34 | 0,08 |
| | D2 | | 5,54 | 0,04 | 0,000 | 7,60 | 10,93 | 0,17 | 0,35 | 0,02 |
| | D1 | 1:5 | 0,20 | 0,01 | 0,006 | 9,35 | 2,50 | 0,10 | 1,30 | 0,07 |
| Gli | D1 | 1:1 | 7,57 | 0,06 | 0,000 | 1,86 | 50,11 | 0,66 | 2,96 | 0,11 |
| | D2 | | 4,86 | 0,04 | 0,000 | 2,12 | 17,45 | 0,29 | 0,76 | 0,03 |
| | D1 | 1:2 | 2,20 | 0,03 | 0,000 | 14,61 | 21,15 | 0,39 | 1,88 | 0,09 |
| | D2 | | 2,12 | 0,03 | 0,000 | 7,02 | 12,19 | 0,25 | 0,85 | 0,04 |
| | D1 | 2:1 | 31,10 | 0,14 | 0,000 | 0,17 | 80,76 | 1,21 | 5,28 | 0,15 |
| | D2 | | 11,38 | 0,07 | 0,000 | 0,66 | 26,47 | 0,35 | 0,78 | 0,03 |
| | D1 | 1:5 | 0,82 | 0,01 | 0,000 | 77,62 | 9,59 | 0,24 | 1,40 | 0,08 |
| Ur | D1 | 1:1 | 8,02 | 0,05 | 0,000 | 2,44 | 8,46 | 0,16 | 0,38 | 0,02 |
| | D2 | | 4,23 | 0,03 | 0,000 | 12,71 | 3,01 | 0,06 | 0,08 | 0,00 |
| | D1 | 1:2 | 3,79 | 0,03 | 0,000 | 10,66 | 3,06 | 0,07 | 0,17 | 0,01 |
| | D2 | | 2,37 | 0,02 | 0,000 | 37,27 | 1,39 | 0,04 | 0,05 | 0,00 |
| | D1 | 2:1 | 22,24 | 0,11 | 0,000 | 0,36 | 28,14 | 0,38 | 1,05 | 0,04 |
| | D2 | | 9,55 | 0,05 | 0,000 | 2,66 | 8,32 | 0,12 | 0,19 | 0,01 |
| | D1 | 1:5 | 2,12 | 0,02 | 0,000 | 34,64 | 1,25 | 0,04 | 0,08 | 0,01 |
| | D2 | | 1,64 | 0,02 | 0,000 | 69,46 | 0,80 | 0,02 | 0,04 | 0,00 |
| AO | D1 | 1:1 | 0,22 | 0,01 | 0,005 | 7,08 | 2,78 | 0,08 | 0,36 | 0,02 |
| | D2 | | 0,25 | 0,00 | 0,004 | 3,34 | 1,27 | 0,03 | 0,08 | 0,00 |
| | D1 | 1:2 | 0,17 | 0,00 | 0,016 | 3,47 | 1,48 | 0,06 | 0,98 | 0,03 |
| | D2 | | 0,09 | 0,00 | 0,087 | 1,14 | 0,68 | 0,03 | 0,19 | 0,01 |
| | D1 | 2:1 | 3,30 | 0,03 | 0,000 | 24,37 | 18,71 | 0,25 | 0,90 | 0,03 |
| | D2 | | 1,65 | 0,01 | 0,000 | 73,80 | 4,40 | 0,07 | 0,12 | 0,01 |
| | D1 | 1:5 | 1,30 | 0,01 | 0,000 | 55,11 | 3,78 | 0,10 | 10,41 | 0,14 |
| | D2 | | 0,62 | 0,01 | 0,000 | 16,65 | 2,07 | 0,06 | 3,86 | 0,07 |
| Eti | D1 | 1:1 | 6,10 | 0,05 | 0,000 | 1,09 | 29,92 | 0,47 | 1,91 | 0,08 |
| | D2 | | 4,20 | 0,04 | 0,000 | 2,54 | 12,44 | 0,23 | 0,59 | 0,03 |
| | D1 | 1:2 | 2,10 | 0,03 | 0,000 | 5,65 | 13,29 | 0,29 | 1,27 | 0,07 |
| | D2 | | 2,01 | 0,03 | 0,000 | 6,78 | 8,46 | 0,20 | 0,64 | 0,04 |
| | D1 | 2:1 | 23,55 | 0,12 | 0,000 | 0,14 | 78,54 | 0,88 | 3,54 | 0,12 |
| | D2 | | 9,54 | 0,06 | 0,000 | 0,85 | 20,06 | 0,29 | 0,63 | 0,03 |
| Die | D1 | 1:1 | 32,99 | 0,13 | 0,000 | 0,09 | 71,63 | 1,40 | 8,08 | 0,24 |
| | D2 | | 14,82 | 0,08 | 0,000 | 0,37 | 41,71 | 0,59 | 1,92 | 0,08 |
| | D1 | 1:2 | 10,54 | 0,06 | 0,000 | 0,62 | 74,00 | 0,92 | 5,95 | 0,20 |
| | D2 | | 8,11 | 0,06 | 0,000 | 0,89 | 38,33 | 0,59 | 2,66 | 0,11 |
| | D1 | 2:1 | 95,56 | 0,27 | 0,000 | 0,02 | 39,87 | 2,09 | 10,92 | 0,28 |
| | D2 | | 24,38 | 0,12 | 0,000 | 0,21 | 44,95 | 0,56 | 1,42 | 0,05 |
| | D1 | 1:5 | 3,16 | 0,03 | 0,000 | 5,37 | 35,61 | 0,57 | 4,24 | 0,17 |

| | | | | | | | | | | |
|--|----|------|------|------|-------|-------|-------|------|------|------|
| | D2 | | 3,40 | 0,03 | 0,000 | 4,16 | 29,38 | 0,51 | 3,21 | 0,14 |
| | D1 | 1:10 | 1,82 | 0,02 | 0,000 | 16,21 | 24,35 | 0,44 | 3,58 | 0,16 |
| | D2 | | 2,02 | 0,02 | 0,000 | 12,06 | 23,11 | 0,44 | 3,21 | 0,15 |

Donde: AL=ácido láctico; Gli= glicerol; AO= ácido oxálico; Ur=urea; Eti= etilenglicol; Die= dietilenglicol; D1=disal 1; D2=disal2
Color verde=DES's preparados experimentalmente.

Como se observa en la Tabla 6.1. se valoraron 46 mezclas (HBA y HBD) para un total de 368 valores de probabilidad de solubilidad para ambos solutos (celulosa y lignina) representados como moléculas más pequeñas. Para la celulosa se utilizó la celulosa y la celutetraosa se encontraron 8 resultados con porcentajes de probabilidad de solubilidad mayores a 25 %. Por su parte para la lignina, o más específicamente sus alcoholes cumarílico y sinapílico, se encontraron 16 resultados de porcentajes mayores al 25 %. De entre estos resultados relacionados con los DES's sintetizados experimentalmente se seleccionaron los DES's para el trabajo experimental. Para el estudio teórico se usaron 2 temperaturas (60 y 120 °C), otro de los criterios para la selección de los DES's a usar experimentalmente, fue escoger la temperatura más alta (120 °C), puesto que es la que ha demostrado mejores resultados para la fraccionamiento (98). De acuerdo a los criterios de selección, los DES's sintetizados con valores de probabilidad más altos a temperatura de 120 °C, correspondían mayoritariamente al soluto celulosa. Por este motivo, se escogieron 3 DES's para esta fracción y los otros 2 DES's para la fracción de lignina. Los más altos objeto de selección se muestran en negrilla y de color azul en la Tabla 6.1.

Estos DES's seleccionados fueron sometidos al procedimiento experimental para el fraccionamiento de BML. En la Tabla 6.2. se muestran los DES's seleccionados con su porcentaje de probabilidad de solubilidad teórico, fracción preferente a solubilizar y componentes.

Tabla 6.2. Porcentaje teórico de solubilidad calculado en el estudio teórico con el software COSMO-RS (temperatura de 120 °C), para los DES's sintetizados seleccionados con (% de probabilidad >25 % para diferentes tipos de solutos (fracción preferente a solubilizar).

| <i>DES</i> | Componentes HBA:HBD | Relación molar HBA:HBD | COSMO-RS Teórico (%) | Fracción preferente a solubilizar |
|------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| A | Disal1 (D1): Glicerol (Gli) | 1:5 | 77,6 | Celulosa |
| B | Disal2 (D2): Urea (Ur) | 1:5 | 69,5 | Celulosa |

| | | | | |
|---|--------------------------|-----|------|----------|
| C | D1: Ácido oxálico (AO) | 1:2 | 55,1 | Celulosa |
| D | D1: Dietilenglicol (Die) | 1:5 | 35,6 | Lignina |
| E | D2: Dietilenglicol (Die) | 1:5 | 29,4 | Lignina |

Como se observa en la Tabla 6.2. se seleccionaron los 5 DES's que mostraron mayor probabilidad de solubilidad de los solutos evaluados para realizar las pruebas experimentales de fraccionamiento de BML y extracción de celulosa y lignina. Los resultados experimentales servirán para contrastar si el método teórico ha sido acertado para la solubilidad de los solutos en los DES's o no.

6.4.2. Ensayos experimentales de fraccionamiento con los DES's seleccionados.

Para ensayar si los DES's seleccionados con las mayores probabilidades de solubilidad de los solutos de interés (celulosa y lignina), tenían potencial como solvente de extracción, se realizaron ensayos de fraccionamiento para residuos de BML. En la parte experimental se trabajó según el método de Cequier y colaboradores (98). En esta metodología se separa tanto el residuo celulósico como la fracción de lignina. La temperatura del tratamiento en 120 °C ya que según los estudios la extracción de lignina es más eficiente a una temperatura más alta (98). Pesé a que cada DES's buscaba extraer preferentemente una fracción (celulosa o lignina) se realizó el procedimiento completo y se obtuvo en todos los casos las 2 fracciones, estas fueron caracterizadas por FT-IR. La BML: nectarina (Nec), ciruelo (Cir), melocotón (Mel), albaricoque (Alb), paraguay (Par) y alcachofa (Alc), fueron previamente caracterizados con FT-IR para identificar en sus espectros la presencia de diferentes compuestos y cuantificados mediante la determinación de fibras descrita en la metodología para tener los valores porcentuales de su composición como referencia. En la Tabla 6.3. se muestran los resultados de la cuantificación de los componentes de los residuos lignocelulósicos.

Tabla 6.3. Cuantificación de los sustratos de BML usados en los ensayos de fraccionamiento (media \pm desviaciones estándar (s.d.), n=2).

| FUENTE | Hemicelulosa | | Celulosa | | Lignina | | Total* |
|-----------------|--------------|---------|----------|---------|---------|---------|--------|
| | % | s.d. | % | s.d. | % | s.d. | |
| Nectarina (Nec) | 10 | ± 4 | 41 | ± 3 | 16 | ± 0 | 67 |

| | | | | | | | |
|--|----|-----|----|-----|----|-----|----|
| Melocotón (Mel) | 10 | ± 6 | 40 | ± 7 | 18 | ± 2 | 67 |
| Paraguay (Par) | 11 | ± 4 | 36 | ± 2 | 28 | ± 2 | 74 |
| Ciruelo (Cir) | 10 | ± 6 | 41 | ± 2 | 26 | ± 2 | 78 |
| Albaricoque (Alb) | 27 | ± 1 | 37 | ± 4 | 14 | ± 1 | 78 |
| Alcachofa (Alc) | 17 | ± 0 | 22 | ± 2 | 5 | ± 1 | 44 |
| s.d. (desviación estándar) *Para este estudio, el valor total se asume como la suma de los compuestos de interés. Los residuos contienen otros compuestos (cenizas, azúcares y demás que no están contabilizados). | | | | | | | |

En la Tabla 6.3. se observa como la alcachofa es el residuo que menos contenido de celulosa y lignina tiene. Los otros 5 residuos poseen celulosa en cantidades entre el 36 y el 41 %. Por otra parte, los residuos de cultivo de paraguay y ciruelo tienen alrededor del 27 % de lignina. Los demás compuestos de los residuos de cultivo pueden ser proteínas, pectinas, cenizas, grasas, ceras, sílice y otros minerales (60,97), que pueden influir en el tratamiento con el DES.

6.4.2.1. Fraccionamiento con los DES A, B y C

De los 3 DES's seleccionados para la extracción de celulosa (según la modelización realizada con COSMO-RS), 2 están compuestos por D1 como HBA más Glicerol o ácido oxálico como HBD's (DES A y C, respectivamente). El DES B está compuesto por D2 como HBA y urea como HBD. Como el método seguido para el fraccionamiento de Cequier y colaboradores (98), describe la separación no solo de la fracción celulósica sino también de la lignina, se realizó completo el método completo. Entonces se obtuvo dos fracciones: celulosa (F1: fracción celulósica) y lignina (F2: lignina) a partir de los residuos de BML con 3 DES's diferentes. El porcentaje de rendimiento de la extracción se calculó por diferencia de pesos como se indica en métodos. Los valores de referencia con los que se compararon los resultados corresponden a la cuantificación realizada por el método de fibras para cada residuo (Tabla 6.3.). En la Figura 6.2. podemos ver los resultados en porcentaje de extracción obtenidos para cada una de las fracciones (Celulosa y lignina, diferenciadas en color), posteriores al tratamiento con los 3 DES's usados como solvente (A, B y C), para cada uno de los 6 residuos ensayados (Nectarina, Ciruelo, Melocotón, Albaricoque, Paraguay, Alcachofa).

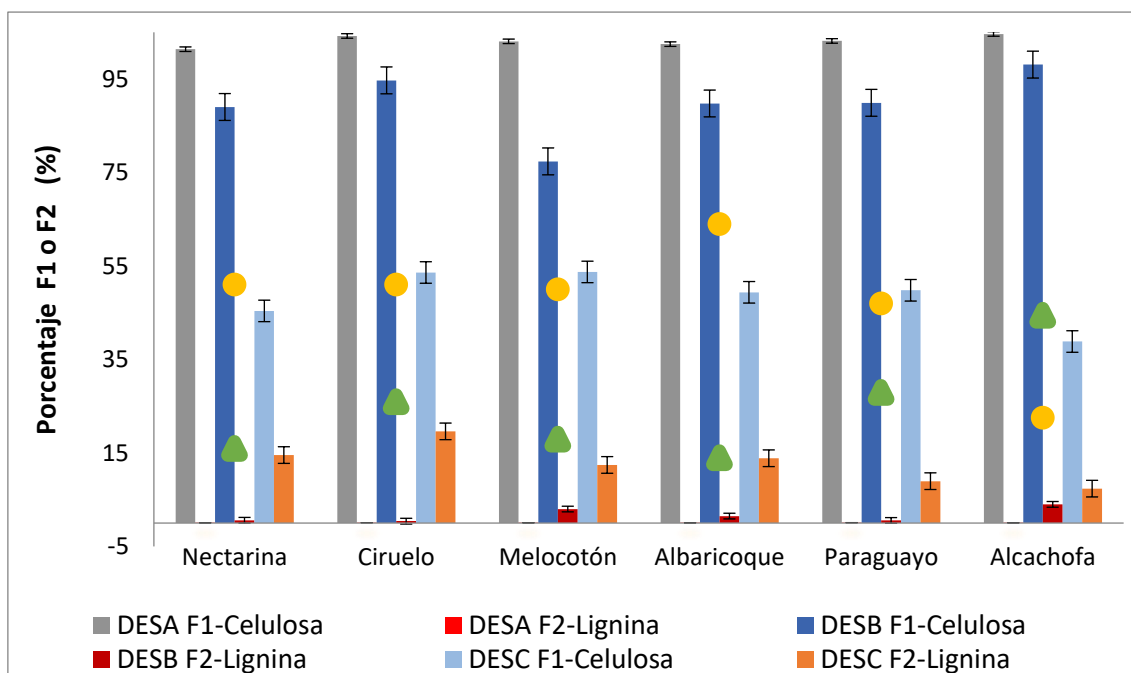


Figura 6.2. Porcentaje de extracción obtenido para la fracción celulósica (F1-celulosa) y fracción de lignina (F2-lignina) a partir del fraccionamiento de distintas fuentes de BML con los DES A, B y C, comparadas con los valores de referencia. Los colores de las barras indican las diferentes fracciones obtenidas en el tratamiento con determinado DES. Gris: DES A-F1; Rosa: DES A-F2; Azul: DES B-F1; Rojo: DESB-F2; Azul oscuro: DES C-F1; Naranja: DES C-F2. Para los valores de referencia se usaron los marcadores: círculo amarillo: celulosa+hemicelulosa, triángulo verde: lignina.

El poder de disolución de los solventes iónicos en la BML (dentro de los que se encuentran los DES's) depende de varios factores fundamentales. El tipo de material a fraccionar, temperatura y tiempo de disolución, relación estequiométrica con el soluto, humedad, viscosidad y tamaño de partículas, son los factores más importantes (118). Como se observa en la Figura 6.2., el DES C presentó los valores de porcentaje de extracción más cercanos a los valores de referencia para ambas fracciones (celulosa y lignina) con cada sustrato ensayado. Con los DES A y B, se presentaron porcentajes de extracción mucho mayores a los valores de referencia, tanto para la F1 como para la F2. Ambos DES's obtuvieron porcentajes de extracción entre el 78 y el 100 % (90 % en promedio aproximadamente) para la F1 mientras que para la F2 fueron bastante menores (entre 0 y 20 %). Esto implica que las fracciones obtenidas deben corresponder a la mezcla de los compuestos (celulosa y lignina) en la F1 en la que deberíamos encontrar solo la parte celulósica, esto concuerda con los bajos resultados porcentuales de la F2.

Para estimar la pureza de los compuestos extraídos se usó la técnica de espectroscopia infrarroja (FT-IR). Debido al volumen de espectros FT-IR solo se pondrán los ejemplos más representativos para el análisis, las demás imágenes junto con la tabla de asignación de bandas más comunes se encuentran en la sección Anexos Tabla A3. La caracterización del material extraído mediante FT-IR proporcionó un análisis de la pureza relativa de las fracciones.

De los 3 DES's usados para la extracción de la fracción rica en celulosa se valorará primero el DES C. Los valores de extracción de celulosa proporcionados por el DES C para todas las fuentes de BML fueron cercanos a los valores de referencia. Las características físicas del material obtenido fueron granulares (tipo fibra) de color similar al de los residuos (como la paja). En la Figura 6.3. se evidencian los espectros de las fracciones celulósicas obtenidas a partir del DES C.

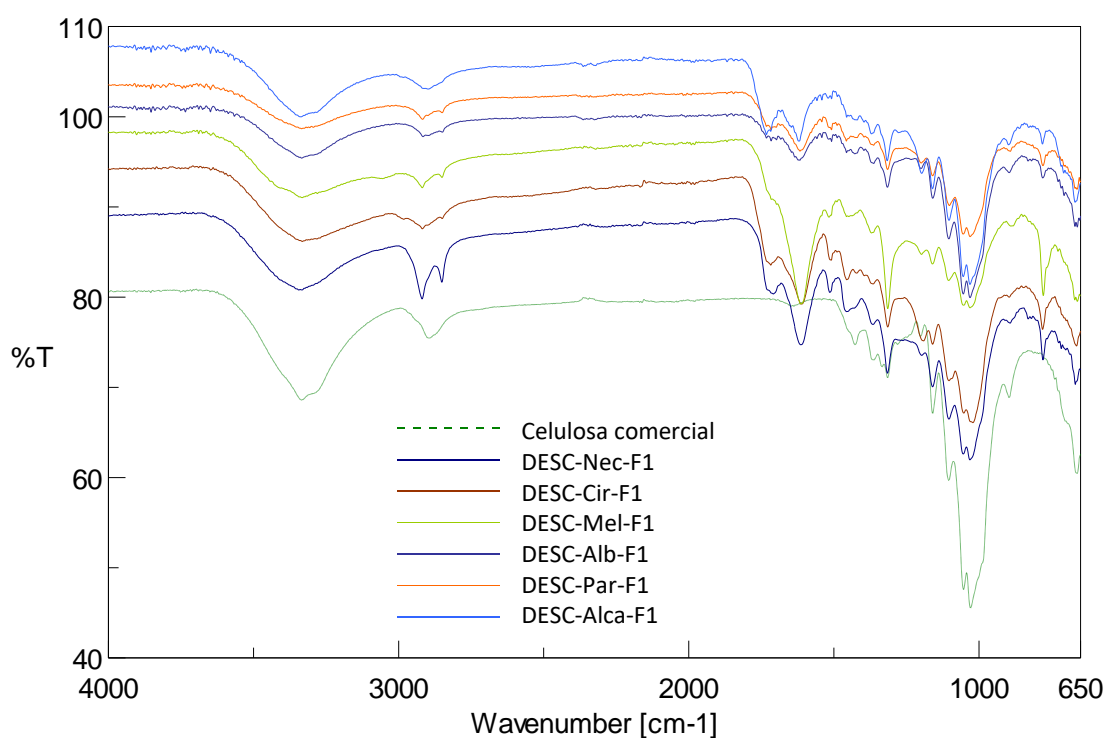


Figura 6.3. Espectro de la celulosa comercial y las fracciones ricas en celulosa obtenidas con el DES C para todas las fuentes de BML. En orden ascendente del espectro las convenciones son las siguientes: Línea punteada verde: celulosa comercial, Línea azul oscuro: nectarina, morado: ciruelo, verde claro: melocotón, azul menos intenso: albaricoque, naranja: paraguay y azul claro alcachofa.

Como se observa en la Figura 6.3., las señales coinciden con la de la celulosa comercial. Se observan las bandas del estiramientos atribuibles al enlace OH alrededor de 3350 cm^{-1} , también en la zona 2920 y 2859 cm^{-1} aproximadamente correspondientes a los grupos alifáticos (98). Además, se observan claramente las bandas en 1313 , 1159 , y 1024 cm^{-1} correspondientes al anillo β -glucopiranososa de celulosa y entre 800 y 900 cm^{-1} se observa la vibración de estiramiento (ν_e) fuerte del enlace C-H. También se observan algunas bandas particulares alrededor de los 1600 cm^{-1} que pueden pertenecer a la materia prima de partida. Sin embargo, se puede decir que, para la extracción con el DES C, la gran mayoría de las bandas coinciden con las del espectro de la celulosa y no se observan demasiadas bandas adicionales, indicando que en los extractos obtenidos predomina la celulosa.

Para ver un poco más en detalle, se escogieron los resultados de fraccionamiento con el DES C para residuos de cultivo de melocotón. En la Figura 6.4., se puede observar el espectro de una de las fracciones obtenidas (fracción celulósica) con el tratamiento con el DES C en comparación con la celulosa comercial, los residuos de melocotón y el DES C.

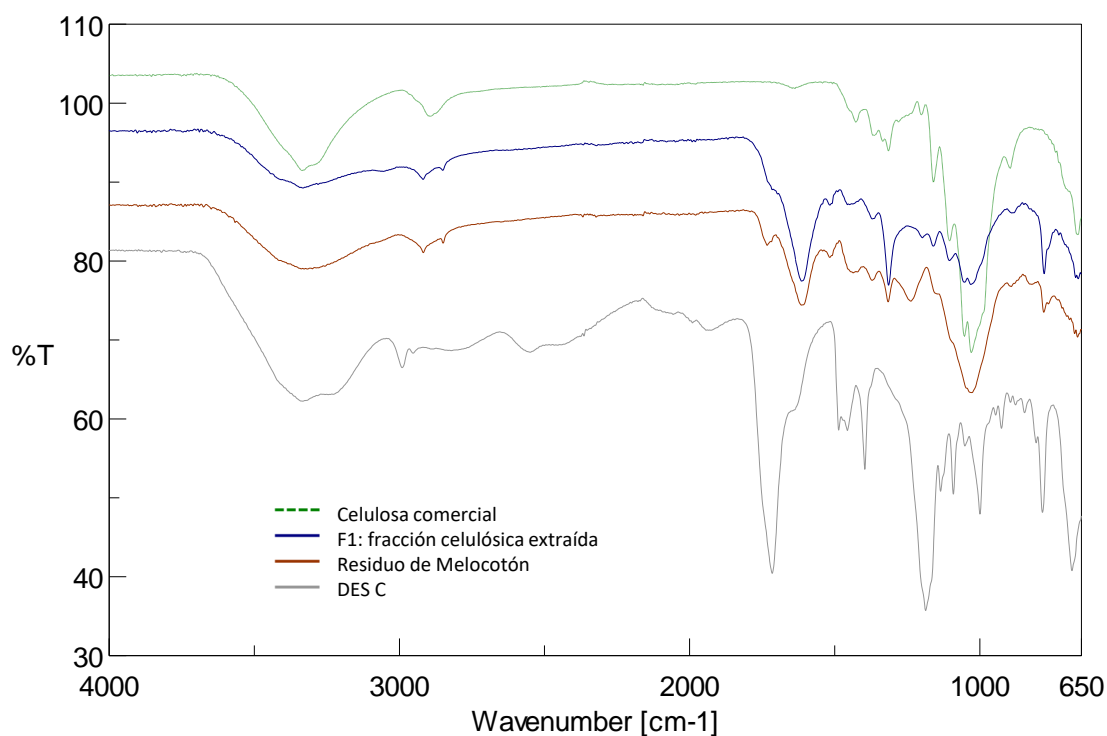


Figura 6.4. Comparación de espectros para el tratamiento realizado al residuo de melocotón con el DESC. Línea verde punteada corresponde a la celulosa comercial. La línea continua azul es para el primer extracto del fraccionamiento (F1: fracción celulósica); la línea café corresponde al residuo de Melocotón y la línea gris al del DESC (D1:AO-1:5).

En la Figura 6.4., se evidencian las bandas características para la celulosa en 3330 cm^{-1} correspondiente a la ν e del grupo hidroxilo $-\text{OH}$. Seguido por las bandas en 2920 y 2890 cm^{-1} de la ν e del enlace H-C-H ($2,98,154,212$). Se observan bs en 1220 , 1150 y 1028 cm^{-1} correspondientes a vibraciones del enlace C-O-C , C-OH y C-4-OH , del anillo β -glucopiranososa de celulosa. En general se pueden ver todas las bandas características de la celulosa en el espectro. En 892 cm^{-1} se evidencia la vibración del enlace CH_2OH asociado, también a la ν e del característico enlace β -(1-4)-glicosídico. Se observa una banda en 1612 cm^{-1} , que concuerda con la materia prima de partida, lo que puede indicar que hay presencia de otros compuestos, lo que aporta a que el porcentaje obtenido en la extracción fuera levemente mayor al valor de referencia (40 %). Sin embargo, este DES C se extrae toda la celulosa del residuo de melocotón, más algún otro componente de la materia prima, por lo que el resultado es de 42 %. Además, las características físicas concuerdan con lo esperado para este tipo de materiales (material granular fibroso).

Existen reportes de algunos DES's compuestos por ácido oxálico como HBD, y otros HBA's para la extracción de BML. El DES compuesto de cloruro de colina (ChCl) y ácido oxálico (AO) en diferentes relaciones molares también ha tenido resultados buenos fraccionando compuestos como celulosa y lignina de BML, según datos reportados (263). Además, se ha demostrado como algunas propiedades (como viscosidad, la conductividad y la temperatura) de los DES's tienen efectos en su capacidad para disolver la celulosa, esto ha sido reportado por Zhang y colaboradores (264) en DES's compuestos por ChCl como HBA y AO, Ur, Gli y ácido cítrico.

En la Figura 6.5. se muestran los espectros de la lignina recuperada con el DES C comparados con las bandas de los compuestos que intervinieron en el fraccionamiento.

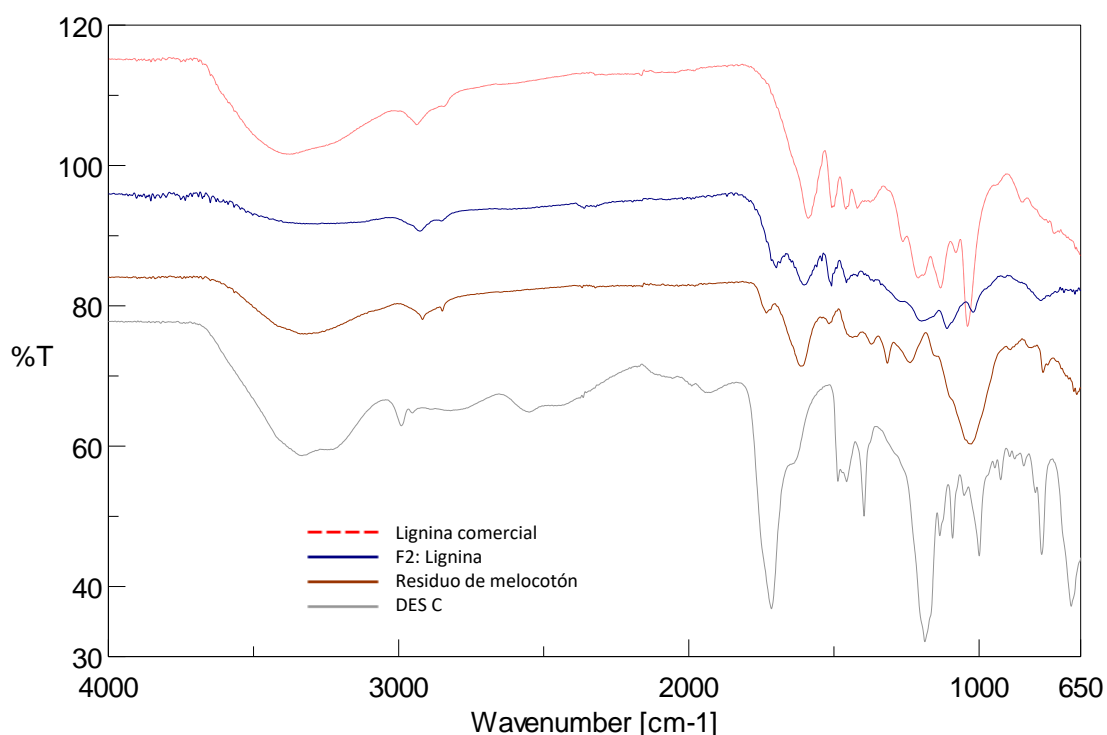


Figura 6.5. Espectros de la lignina comercial y la fracción rica en lignina obtenida a partir del melocotón fraccionado con el DES C. Línea punteada roja: lignina comercial. Línea continua azul: extracto dos obtenido, rico en lignina: F2; línea café residuo de melocotón y línea gris: DESC.

Como se evidencia en la figura 6.5., la fracción 2 (rica en lignina) extraída del residuo de cultivo de melocotón tiene bandas muy claras de la lignina. Las bandas entre 1500 y 1700 cm^{-1} corresponden a la vibración de $\text{C}=\text{C}$ de anillos aromáticos de la lignina y del grupo carbonilo $\text{C}=\text{O}$ (oxidación de la lignina durante el proceso de extracción), respectivamente. La banda ubicada en 2872 y 2924 cm^{-1} indica la frecuencia de vibración de los grupos alifáticos (CH_2 y CH_3). También se evidencian otras bandas características como la que está a 3318 cm^{-1} asignada a la ve de los grupos $\text{O}-\text{H}$. En la zona de la huella dactilar de los espectros se evidencia la presencia de una banda en 868 cm^{-1} correspondiente al grupo guacil presente en la lignina (98,212). Los resultados de porcentajes de lignina extraída con el DES C para los demás residuos, están entre el 12 y el 20 %. Solo para los residuos de albaricoque y alcachofa son menores (9 y 7 % respectivamente).

En la mayoría de los casos, los espectros coinciden con las características de la lignina, en algún caso se puede encontrar una pequeña banda correspondiente al DES C, pero esto puede ser

solventado mediante la realización de más lavados al residuo. En la Figura 6.6., se observan los espectros del extracto obtenido para la fracción 2 a partir de los demás residuos.

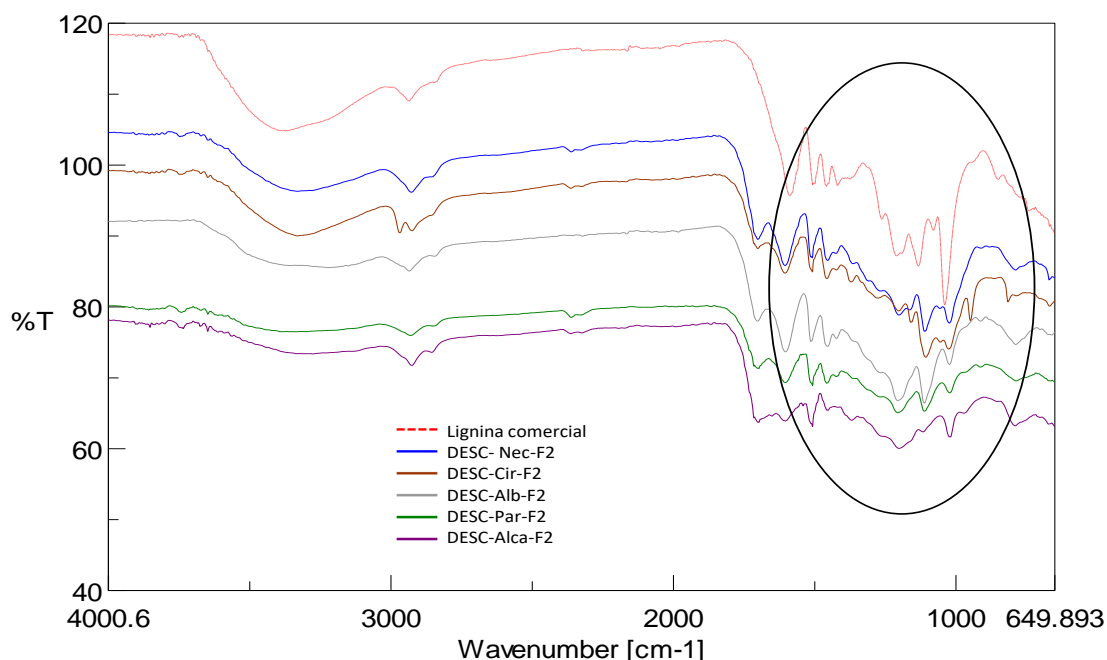


Figura 6.6. Espectros de los extractos obtenidos correspondientes a F2, fracción rica en lignina a partir de los residuos tratados con el DES C. Línea punteada roja: lignina comercial. Las líneas continuas corresponden a la fracción 2 (rica en lignina) extraída de los distintos residuos tratados. Azul: nectarina (Nec); café: ciruelo (Cir); gris: albaricoque (Alb); verde: paraguay (Par); morado: alcachofa (Alca).

Como se observa en la Figura 6.6., se pueden observar en el espectro las bandas que concuerdan con la lignina, por lo que se puede decir que en estos extractos el mayor componente es la lignina. Podemos ver alrededor de los 3320 cm^{-1} la banda asignada a la ν de los grupos O-H, entre los 2800 y 2900 cm^{-1} la indica presencia de grupos alifáticos (CH_2 y CH_3). Característicos de la lignina se observa entre 1500 y 1700 cm^{-1} (demarcadas en la figura) las bandas que corresponden a la vibración de C=C de anillos aromáticos de la lignina y del grupo carbonilo C=O y sobre los 850 cm^{-1} , las señales correspondientes al grupo guacil presente en la lignina respectivamente.

Como se ha mencionado anteriormente la solubilidad de los compuestos depende de las propiedades del DES's, las interacciones de cada sistema y los residuos a los que se aplican (y sus variables de proceso) (118,264), por este motivo no se espera que todos los DES's presenten

el mismo comportamiento para la disolución de la celulosa y lignina. Posiblemente por este motivo los tratamientos realizados con los DES's A y B arrojaron resultados un poco diferentes a los observados con el DES C.

Para la F1 que se considera debe ser rica en celulosa, el extracto obtenido con el DES A para los diferentes residuos tratados, obtuvo porcentajes de rendimiento muy por encima de los valores de referencia, esto mismo sucedió con el DES B. El tener porcentajes mayores a los de referencia indicaba la presencia de componentes diferentes a la celulosa en el extracto. Dentro de los componentes que puede haber en la F1 y que aumentan este porcentaje de extracto obtenido se encuentran la lignina. En la F2 rica en lignina, tanto para el DES A como para el DES B, se obtuvieron porcentajes de rendimiento de estas fracciones, mucho menores a los porcentajes de referencia para cada residuo tratado, lo que podría indicar que efectivamente si la lignina puede estar en la F1. Para corroborar dicha información se analizaron los espectros FT-IR de las fracciones obtenidas. En la Figura 6.7., se muestran los espectros de la F1 y F2 de los extractos obtenidos a partir del tratamiento con el DES A.

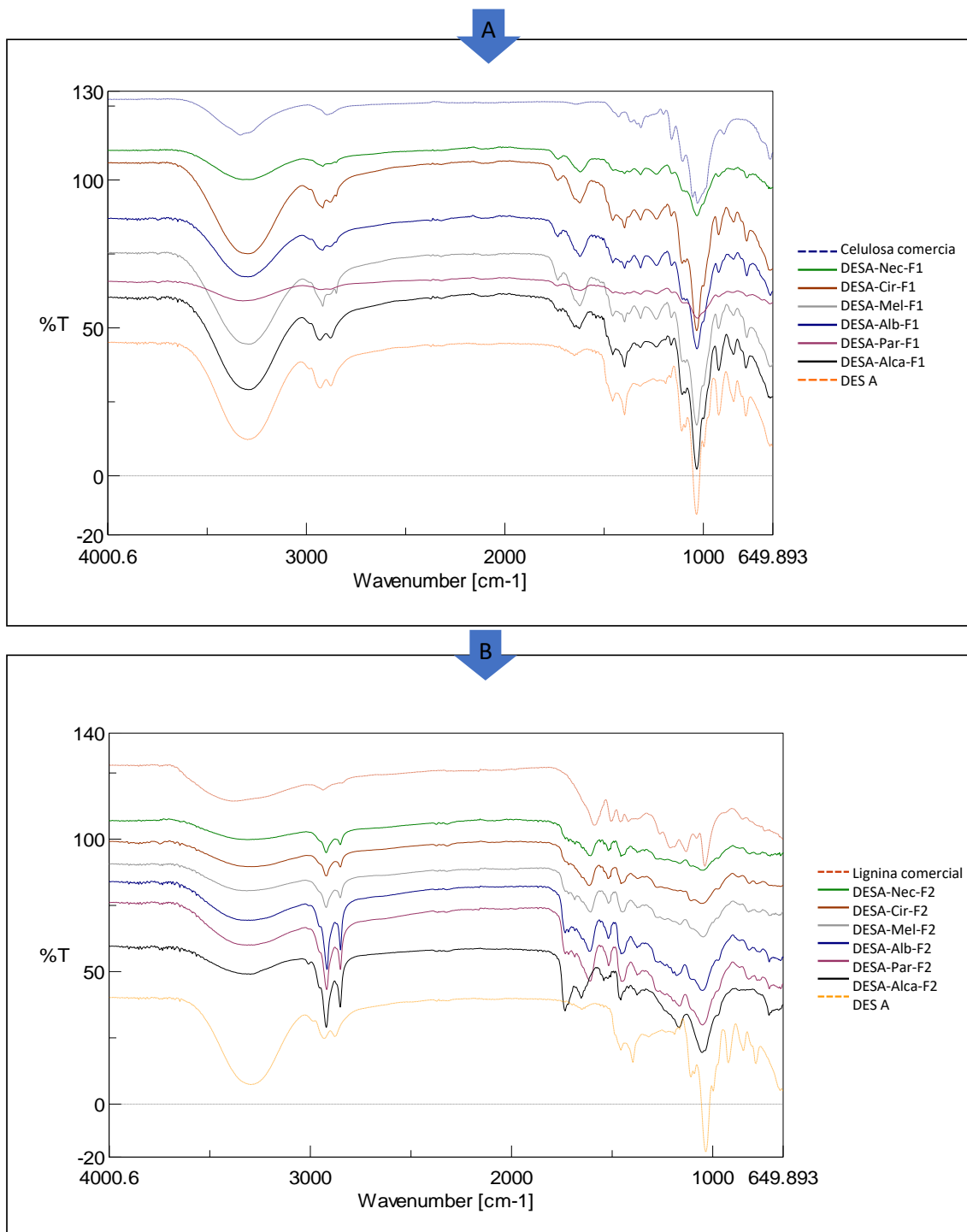


Figura 6.7. Espectros de los extractos obtenidos en la fracción 1 y 2 (F1 y F2) a partir del tratamiento realizados a los residuos de cultivo con DES A. Parte superior del gráfico (A) Comparación de la celulosa comercial con las F1 obtenidas. En el siguiente orden: Línea azul punteada: celulosa comercial; las siguientes líneas continuas corresponden a las F1 de los diferentes residuos. Verde: nectarina (Nec-F1); café: ciruelo (Cir-F1); gris: melocotón (Mel-F1); azul: albaricoque (Alb-F1); morado: paraguayo (Par-F1); negro: alcachofa (Alca-F1). Por último,

la línea punteada naranja corresponde al DESA. La parte inferior (B) Comparación de la lignina comercial con las F2 obtenidas. En el siguiente orden: Línea roja punteada: lignina comercial; las siguientes líneas continuas corresponden a las F1 de los diferentes residuos. Verde: nectarina (Nec-F2); café: ciruelo (Cir-F2); gris: melocotón (Mel-F2); azul: albaricoque (Alb-F2); morado: paraguay (Par-F2); negro: alcachofa (Alca-F2). Por último, la línea punteada naranja corresponde al DESA.

Como era de esperar, al igual que en los anteriores espectros referentes a la celulosa, se evidencian algunas bandas correspondientes a dicho compuesto (cerca de 3340, 2850, 1313, 1159, y 1020 cm^{-1}). Sin embargo, en la parte de la huella dactilar del compuesto se observan muchas bandas características del DES A como las mostradas entre 1450 y 1390 cm^{-1} correspondientes a la vibración simétrica de flexión del N-H y a la vibración de torsión del enlace C-N (211). La parte de la huella dactilar del espectro del DES A y de la fracción celulósica extraída es similar en las bandas ubicadas en 921 y 785 cm^{-1} . Además, no se observan claramente la banda en 890 cm^{-1} característica del enlace glicosídico.

Del análisis de los espectros y el peso de las fracciones obtenidas (tanto para el DES A como para el DES B), que arrojaron resultados de extracción mayores al 90 % en promedio, siendo el máximo posible el valor de referencia que está alrededor del 50 % para la celulosa, se puede interpretar hay presencia de solvente y otros compuestos (como hemicelulosa y lignina). Por lo cual estos DES's no parecen tener selectividad por la celulosa ni sobre la lignina en los tratamientos aplicados sobre estos residuos. La presencia de lignina es confirmada por los balances de masa puesto que los porcentajes de extracción de lignina con el DES A y B están entre 0-4 %. Los espectros correspondientes los extractos obtenidos con el DESB para celulosa y lignina se muestran en Anexos, Espectros FT-IR, Figura A49.

6.4.2.2. Fraccionamiento con los DES D y E

Para la extracción de lignina se seleccionaron 2 DES's con mayores probabilidades de su solubilización (según la modelización realizada con COSMO-RS). El DES D compuesto por la Disal 1 y dietilenglicol (D1:Die) y el DES E compuesto por la disal 2 y dietilenglicol (D2:Die) ambos en relación molar 1:5 (HBA:HBD). Al igual que con los anteriores DES's se realizó el proceso de fraccionamiento completo, obteniendo como resultado 2 fracciones (F1: celulósica y F2: lignina), según la metodología de Cequier y colaboradores (98). Los porcentajes de rendimiento de la extracción fueron calculados por diferencia de pesos como se describe en métodos. Los valores

de referencia son los obtenidos a partir de la cuantificación de los residuos lignocelulósicos (Tabla 6.3). En la Figura 6.8., podemos ver los resultados en porcentaje de extracción de las fracciones obtenidas (F1 y F2) a partir de los residuos de cultivo tratados con los DES D y E.

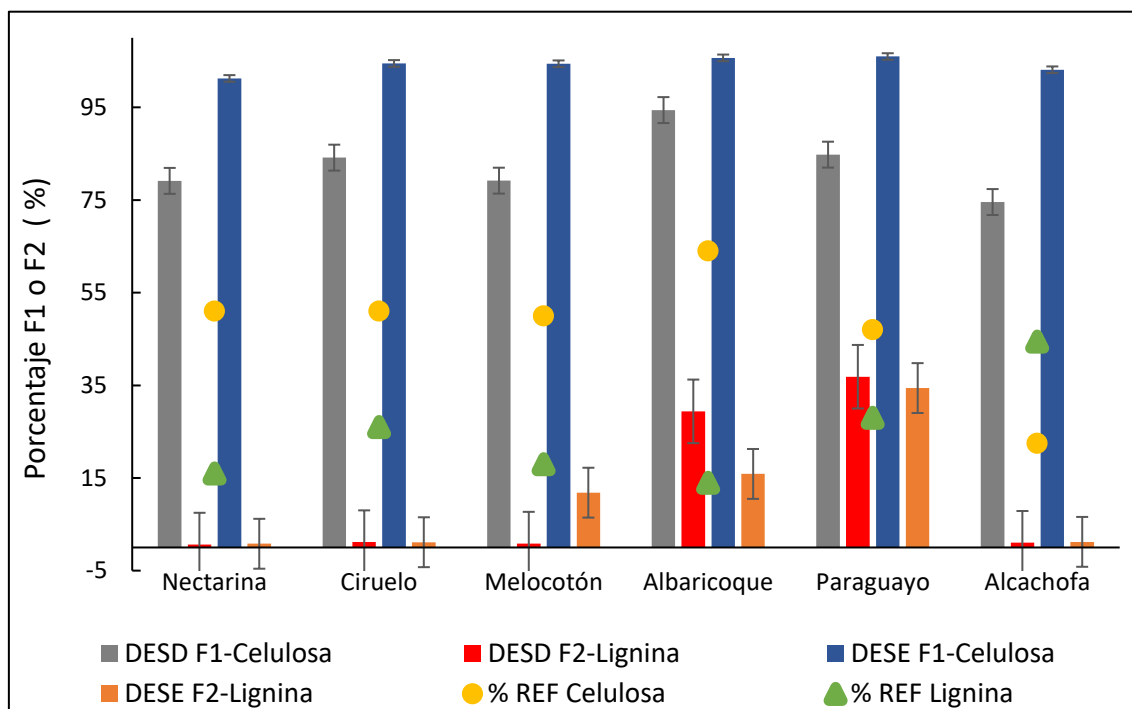


Figura 6.8. Porcentaje de extracción obtenido para la fracción celulósica (F1-celulosa) y fracción de lignina (F2-lignina) a partir del fraccionamiento de distintas fuentes de BML con los DES D y E, comparadas con los valores de referencia. Los colores de las barras indican las diferentes fracciones obtenidas en el tratamiento con determinado DES. Barra gris: DESD-F1; naranja: DESD-F2; azul: DESE-F1; rojo: DESE-F2. Para los valores de referencia se usaron los marcadores: círculo amarillo: celulosa+hemicelulosa, triángulo verde: lignina.

En la Figura 6.8., se puede evidenciar que los resultados han estado lejos de lo esperado para ambas fracciones, puesto que son muy diferentes a los valores de referencia. Para el caso de la fracción celulósica (F1), los resultados obtenidos con los DES D y E, para los diferentes residuos tratados muestran valores mayores a los de referencia (entre el 75 y el 100 %), lo que indica que esta fracción está mezclada con otros compuestos y no hubo separación de la celulosa y la lignina. En cuanto a la F2 los porcentajes obtenidos de extracción están entre el 0 y el 36 %. Para los residuos de nectarina, ciruelo y alcachofa se extraen 0 % de lignina y más del 90 %. Teniendo en cuenta que los valores de referencia para la celulosa son menores del 90 %, se considera que en

F1 hay presencia de otros compuestos (como pueden ser lignina, hemicelulosa, DES, entre otros). A partir de los residuos de albaricoque y paraguay, se extrajo el 30 y 32 % respectivamente. Esto induce que la lignina también esta mezclada con otros compuestos puesto que son valores más altos que los de referencia.

El análisis de los espectros FT-IR puede comprobar la poca selectividad encontrada por estos DES's (D y E) para el fraccionamiento de los compuestos de interés (lignina). En la Figura 6.9, se observa los espectros de los extractos F1 obtenidas con el DES D para los residuos tratados.

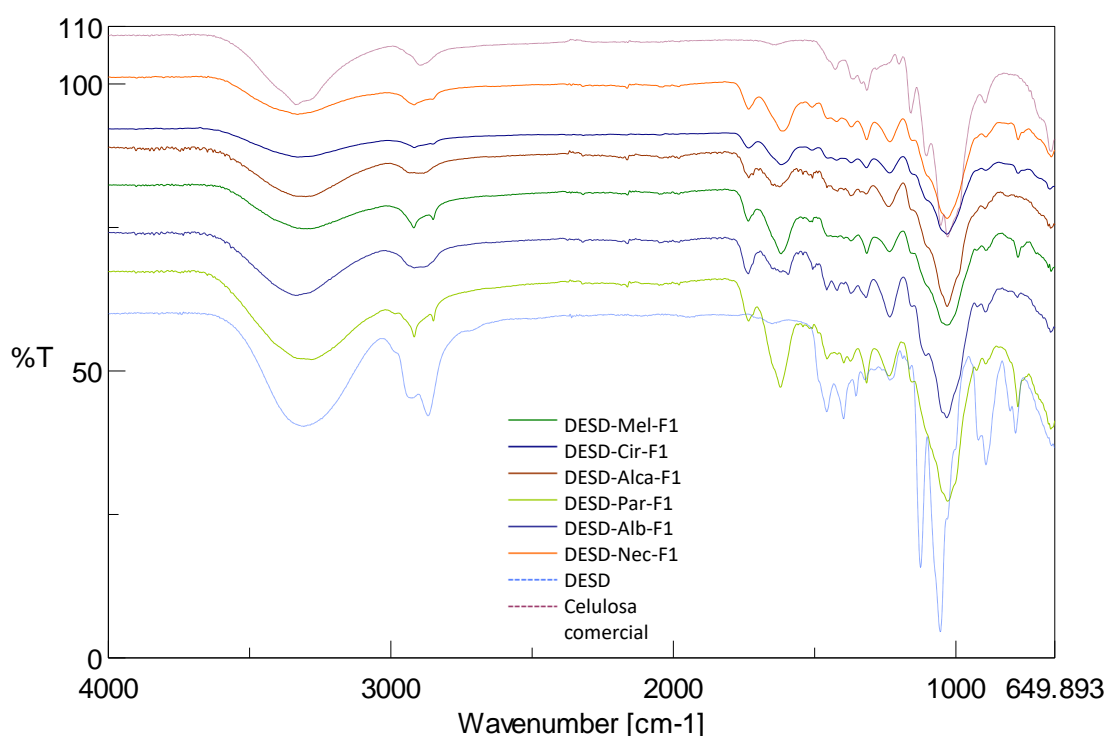


Figura 6.9. Espectro de la celulosa comercial y las fracciones celulósicas (F1) obtenidas del fraccionamiento de distintos residuos de BML con el DES D. Línea punteada azul: DES D, línea punteada morado: celulosa comercial. En orden ascendente los residuos de cultivo: Línea verde claro: paraguay (Par); azul: albaricoque (Alb); verde oscuro: melocotón (Mel); marrón: alcachofa (Alca); azul oscuro: ciruelo (Cir); naranja: nectarina (Nec).

Como se observa en la Figura 6.9., en los espectros presentados para la F1 obtenidas de los tratamientos con el DES D, se evidencian distintas bandas que corresponden tanto a la celulosa como al DES D. Las bandas ubicadas alrededor de 3330, 2900, 1315, 1162, 1024 y 890 cm⁻¹ son características de la celulosa (vibración del OH y presencia del enlace glicosídico). Pese a esto

también se observan bandas bastante claras pertenecientes al DES D, como es el caso de las bandas en 2931 y 2867 cm^{-1} atribuibles al grupo amino del DES D, junto con la vibración simétrica de flexión del N-H ubicadas en 1456, 1393 y 921 cm^{-1} (211). Además, también se evidencian bandas características de la lignina y su esqueleto aromático entre 1598 y 1368 cm^{-1} , lo que explica en parte los valores de extracción mayores a los de referencia.

Para el caso de la lignina extraída con los DES D y E, los resultados han sido bastante bajos 4 de los residuos tratados (en algunos casos 0 o cercanos a 0 para los residuos de Nec, Cir, Mel y Alca). En parte esto ha sido explicado por la poca selectividad de estos DES's y la presencia de parte de la lignina en las F1 obtenidas. En la Figura 6.10, se pueden observar los espectros de los extractos obtenidos con el DES D para los residuos de Alb y Par, que tuvieron los porcentajes más altos de extracción en comparación con los demás.

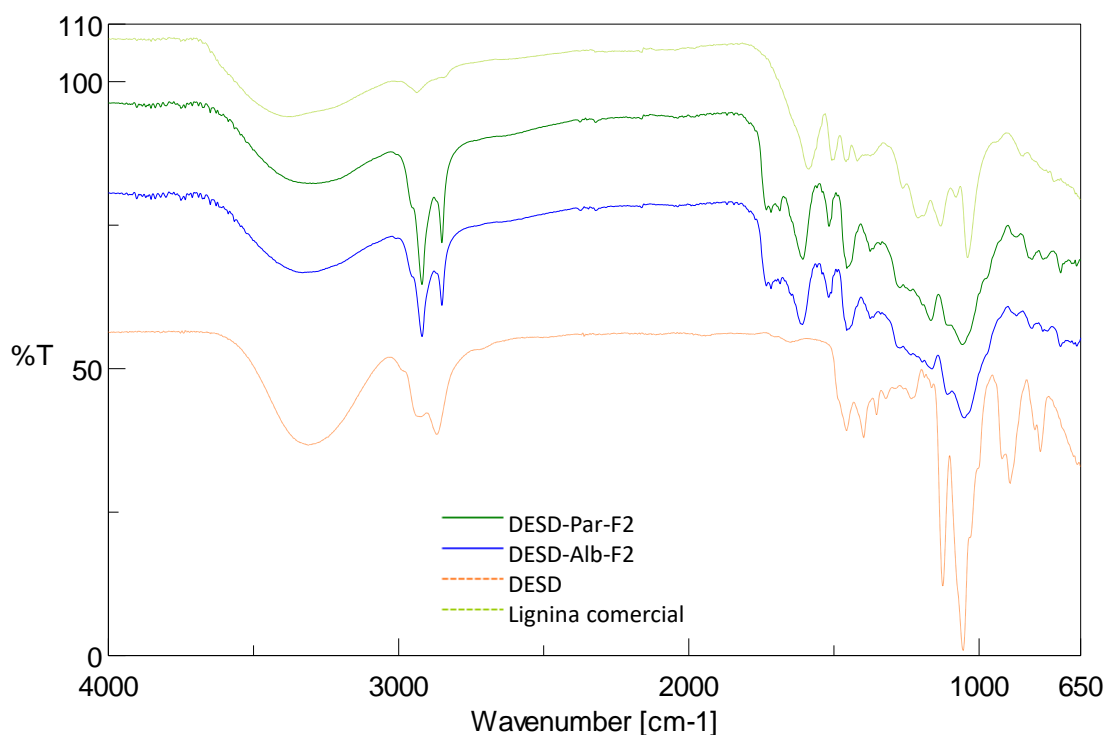


Figura 6.10. Espectros de la lignina comercial y las fracciones de lignina (F2) obtenidas a partir de residuo de albaricoque (Alb) y paraguayo (Par) tratadas con el DES D. Línea punteada verde: lignina comercial, naranja: DESD. Línea continua azul: Albaricoque (Alb); verde: paraguayo (Par)

Como se observa en la Figura 6.10, pese a tener algunas bandas muy características de lignina (3318, 2872, 2924, 1500 y 868 cm^{-1}) (98,212), también es evidente la presencia del DES D

principalmente por las bandas se ven claramente en 2928 y 2847 cm^{-1} que corresponden a la ν del carbón alifático y del alcohol primario y de los CH. Además en 1391 cm^{-1} se observa la vibración de torsión del enlace C-N (211). Lo mismo sucedió para los espectros de la lignina obtenida con el DES E. En los Anexos, Espectros FT-IR, Figuras A50-A-52, se encuentran las comparaciones de los espectros de los extractos de lignina (F2) para cada uno de los residuos con los DES D y E, y también los correspondientes a los extractos de F1 para el DES E.

La apariencia física de la lignina extraída para los casos en los que según las FT-IR no presentaron mezclas de solvente, fue similar a la lignina comercial (polvo brillante rojo-marrón) con pesos moleculares entre 7000-10000 Da (realizado por GCP), con lo que es un polímero con características apropiadas para la industrialización.

Si se tienen en cuenta todos los resultados y su análisis (tanto porcentajes de extracto obtenido como los FT-IR), el solvente que obtuvo extractos con porcentajes de rendimiento más cercanos a los valores de referencia y con espectros con mayor cantidad de bandas características de los compuestos buscados (celulosa y/o lignina) fue el DES C. Los demás DES's (A, B, D, E) en general obtuvieron porcentajes altos de la F1 y muy bajos de F2, con extractos que mostraban mezclas de compuestos en los FT-IR (celulosa-lignina y DES para la F1 y lignina-DES para la F2). Los DES's como solventes para fraccionar BML han sido reportados por distintas referencias bibliográficas. Se ha reportado el fraccionamiento de lignina a partir de orujo de oliva y algunos residuos de cultivo, usando DES's sintetizados con cloruro de 2,3-dihidroxipropil-1-trietilamonio como HBA y ácido láctico, urea, glicerol y etilenglicol en diferentes proporciones moleculares. Los tratamientos realizados con una metodología parecida a la aplicada en nuestros ensayos, obtuvieron porcentajes de extracción de lignina más altos que los obtenidos por los DES A,B,C,D y E, consecuentemente porcentajes más bajos para la F1, donde se obtuvo holocelulosa (celulosa y hemicelulosa) (212). También se han reportado diversos tratamientos con diversos DES's para el tratamiento de BML. Se ha logrado remover distintos polímeros a partir de DES's, por ejemplo a partir de DES conformado por ChCl como HBA y con urea (1:2) 28 y 30 % (155), a partir de con ChCl y LA (1:5) se han obtenido también diferentes porcentajes de deslignificación 60, 77.9 y 88 % (265) y así mismo se pueden encontrar muchos resultados para la extracción de celulosa a partir de biomasa lignocelulósica (se pueden obtener desde 0 hasta 100 % de extracción de los compuestos) (52,111,121,147,154,264,266–268). Sin embargo, estos resultados son poco comparables a los tratamientos realizados en estos experimentos, puesto hay muchos factores que intervienen en el proceso de fraccionamiento, como el sistema en sí, el método aplicado, la fuente del residuo, etc.

Los resultados de la modelización teórica realizada con el programa COSMO-RS, no han sido muy similares a los resultados experimentales. En relación a esto se puede tener en cuenta que un factor que pudo influir en la diferencia de los resultados de la modelización, es que para la predicción se usaron moléculas de mucho menor tamaño que las que se extrajeron y esto puede afectar los valores de las constantes termodinámicas que se asumen en los cálculos en la modelización y por ende afectar el resultado de la posible solubilidad.

6.5. CONCLUSIONES

- ✓ Se realizó la modelización de diferentes mezclas de los nuevos HBA's y HBD's como ácido láctico, dietilenglicol, urea, etilenglicol y ácido oxálico, para obtener la probabilidad de solubilidad de cuatro solutos: glucosa, celutetraosa, alcohol p-cumarílico y alcohol sinapílico como representantes de celulosa y lignina. Comparando la modelización y los DES's sintetizados se seleccionaron 5 DES's con los valores de probabilidad de solubilización mayores a 25 % para los ensayos experimentales.
- ✓ Los 5 DES's ensayados (A, B, C, D y E) para tratar 6 residuos de cultivo (nectarina, ciruelo, melocotón, albaricoque, paraguay y alcachofa) mostraron resultados no acordes a los valores de referencia a excepción del DES C, compuesto por la Disal1: ácido oxálico (1:5).
- ✓ Los solventes ensayados parecen no ser efectivos para el fraccionamiento bajo las condiciones de tratamiento realizadas a los residuos.
- ✓ El análisis de los espectros FT-IR correspondientes a los extractos obtenidos para la F1 (rica en celulosa), mostro en señales correspondientes a mezclas de celulosa, hemicelulosa y lignina. Para la F2 (lignina) se evidenciaron las señales correspondientes de lignina y en algunos casos trazas de DES.
- ✓ En comparación con los resultados aportados por otros DES's para el fraccionamiento de BML, la gran mayoría los DES's ensayados (A, B, D y E) obtuvieron porcentajes relativamente bajos de lignina extraída a partir de los residuos de cultivo ensayados.

7. DISCUSIÓN GENERAL

Hoy en día, es creciente el interés de las empresas agroalimentarias por adaptar el modelo de economía circular, donde se minimizan los residuos y se usan tecnologías con menor impacto ambiental. Debido a su carácter orgánico, la gran mayoría de los residuos agroalimentarios tienen gran potencial como fuente de diferentes compuestos (lignina, celulosa, monómeros, hidrolizados proteicos, ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), etc), usados en diversos sectores industriales (cosmética, farmacéutica, química, alimentación, etc.) (69,75). El desarrollo de esta tesis doctoral tiene como objetivo general “dar un valor agregado a los residuos agroalimentarios (biomasa lignocelulósica (BLM) y Sandach) desarrollando procedimientos de extracción y/o síntesis, con la que se obtengan compuestos con potencial uso industrial enmarcados dentro de la economía circular”. Para lograrlo, se establecieron diferentes áreas de acción (uso de residuos agroalimentarios, biocatálisis, síntesis de compuestos y de solventes verdes), que tienen como finalidad generar procesos más sostenibles y respetuosos con el medio ambiente. El uso de los residuos y subproductos agroalimentarios, para la extracción de compuestos de interés industrial, no solo los minimiza si no que ofrece valor añadido a esta importante industria. Sin embargo, para la aplicación de la química verde, la extracción de estos materiales debe hacerse con metodologías sostenibles. Esto implica la búsqueda y síntesis de nuevos compuestos y métodos (menos contaminantes, a partir de fuentes no tradicionales y en lo posible renovables). Por este motivo en esta tesis doctoral se trabajó en el aprovechamiento de diferentes residuos agroindustriales mediante el empleo de procesos y metodologías sostenibles.

Dado que los subproductos de la pesca son de gran interés por el tipo de compuestos que contienen (colágeno, ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), proteínas, etc.) y por el volumen de residuos que generan, se trabajó con uno de estos. Los pescados marinos son conocidas fuentes de AGPI como el omega-3, principalmente los pescados azules. Sin embargo, pescados blancos como el rape también almacenan AGPI (como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) (77,160)) en el hígado, esta parte no es ampliamente utilizada y suele desecharse (157–159). Los beneficios para la salud de los omega-3 han sido ampliamente descritos principalmente en enfermedades cardiovasculares (ECV) y muchas otras patologías (diabetes, sistema inmunitario, cáncer, etc) (79,80,83–88). Por estos motivos se estudió este subproducto como posible fuente de AGPI. A partir del hígado de rape se extrajo aceite de hígado de rape (AHR) (extracción sólido/líquido con cloroformo y metanol (2:1p/p) o reactivo

Folch (RF)). Inicialmente se determinó el contenido total de AHR con varias extracciones hasta agotamiento. Así, se extrajo un 39 % de AHR valor mayor al reportado por el aceite de hígado de atún (17,5 %) y subproductos de salmón y anchoa (170–172). El perfil lipídico del AHR determinado por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), mostró un 26,5 % de AGPI donde el DHA correspondía al 15,2 % y el EPA al 4,4 %, además de otros ácidos grasos monoinsaturados como el oleico con un 21 %. Buscando un proceso de extracción más limpio, se emplearon solventes orgánicos diferentes a los comúnmente usados, como: el 2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF), ciclopentil metil éter (CPME), dimetil carbonato (DMC) y limoneno (LMN). Previo a los ensayos experimentales con estos solventes, se optó por probar las nuevas tecnologías computacionales aplicadas a la química, usadas principalmente por que reducen el tiempo, materiales y equipos, lo que puede ser considerado como uno de los principios de la sostenibilidad. Se realizaron modelizaciones de solubilidad con el programa COSMO-RS, para este caso con el fin de valorar los solventes y contrastar los resultados teóricos y experimentales. Para las modelizaciones se establecieron cuatro configuraciones teóricas diferentes de triacilglicéridos (TAG) (teniendo en cuenta el perfil lipídico del AHR) y se introdujeron en el programa junto con las modelizaciones de las moléculas de los solventes, de manera que los cálculos del programa permitieron determinar un porcentaje de probabilidad de solubilidad. Los resultados teóricos mostraron que, para todas las configuraciones de TAG's, los solventes 2-MeTHF, CPME y LMN presentaban 100 % de probabilidad de extracción. Mientras que el DMC mostró porcentajes menores al 21 % en tres de los cuatro TAG's modelizados. Por su parte, el RF mostró valores inferiores al 4 % para los mismos TAG's. Los resultados entre la modelización teórica y los datos experimentales no fueron similares, se debe tener en cuenta que las configuraciones de TAG's pueden ser muchas y para el modelo se usaron cuatro, la conformación real de los TAG's del AHR, pueden haber influido en las diferencias. Además de esto, se ensayaron dos métodos de agitación diferentes (Roller mixer (RM) y Ultra Turrax (UT)) para evaluar su efecto en la extracción del AHR con los solventes verdes. Los resultados mostraron que el método de agitación RM fue más efectivo que el UT. Con el RM se logró extraer más del 96 % con cuatro de los cinco solventes ensayados.

El uso de los omega-3 puede ser en forma de ácido libre y/o de éster ya sea para la fabricación o suplementación de alimentos (77,78,106). Una de las ventajas de los ésteres es su facilidad de síntesis, por lo que producir ésteres etílicos de AHR fue otro de los objetivos de este trabajo. La síntesis de dichos ésteres se realizó mediante el uso de biocatalizadores, esto debido a las ventajas que brinda, como son las condiciones suaves de reacción, la selectividad, la reducción de los costos energéticos entre otras (21–23). De la variedad de enzimas comerciales que se pueden usar, se escogieron las células de microorganismos como los hongos filamentosos o

también llamadas *resting cells* fúngicas. Esto para estudiar alternativas a las enzimas comerciales cuyos procesos de extracción, purificación e inmovilización suelen ser difíciles y costoso. Buscando una alternativa más económica y sostenible para la esterificación, se estudió el efecto de diferentes *resting cells* fúngicas en la esterificación del AHR para la obtención de ésteres etílicos. Se usaron dos *resting cells* (*R. oryzae* y *A. flavus*), sus mezclas (1:1 y 7:3 respectivamente) y se compararon los resultados con los obtenidos por la enzima comercial: Novozym 435 o *Candida antarctica*. Los biocatalizadores producidos en el laboratorio tuvieron una actividad enzimática (U) de 1,4 $\mu\text{mol}/\text{min}$ para *R. oryzae* y de 0,03 $\mu\text{mol}/\text{min}$ para *A. flavus*. Se probaron dos métodos de esterificación, la esterificación directa (en una etapa) o indirecta (en dos etapas: hidrólisis y esterificación) y tres tiempos de reacción (24, 48 y 72 h). El seguimiento de las reacciones se realizó por RMN. La integración de las diferentes señales correspondientes al ácido graso y éster junto con el porcentaje en peso del producto obtenido, determinaron el porcentaje de rendimiento de las reacciones. En cuanto a los porcentajes de rendimiento, los resultados para las lipasas de *A. flavus* fueron menores para todos los tiempos ensayados y en ambos métodos de esterificación, esto seguramente debido a su baja U. Así mismo su mezcla (1:1) con *R. oryzae* mostró bajos rendimientos de esterificación, al igual que la mezcla (7:3), sin embargo, los rendimientos mostrados por esta última mezcla fueron algo mejores. Las lipasas de *R. oryzae* en ambos métodos de esterificación obtuvieron resultados cercanos a los ofrecidos por Novozym 435. Solo en un caso, *R. oryzae* supero a Novozym 435 (reacción directa, t:24 h; resultado 53 % de éster, comparado con 44 % obtenido por Novozym 435). También se valoró el efecto de los biocatalizadores en el perfil lipídico de los ésteres, encontrando que *R. oryzae* tiene una selectividad hacia el DHA, de manera que no lo esterificaba, lo que podría llegar a ser útil para buscar su aislamiento. Otro de los aspectos a resaltar del uso de las *resting cells*, es que fueron más eficientes en la hidrólisis (ensayada en la esterificación de dos etapas: hidrólisis y esterificación). En los ensayos realizados, se observó que nuestros *resting cells* fueron capaces de hidrolizar hasta el 95 % de los ácidos grasos en comparación con el 83 % de Novozym 435. Por lo que son una buena alternativa, más económica y eficiente para las reacciones de este tipo. En el proceso de hidrólisis del AHR a parte de liberar los ácidos grasos, se obtiene glicerol, un compuesto muy interesante debido a que tiene una amplia gama de aplicaciones.

En el desarrollo de otro trabajo realizado en esta tesis, se utilizó un derivado del glicerol (el 1,3 dicloro 2-propanol), los dicloroalcoholes se usan como precursores de nuevos compuestos de interés industrial (195–199). A partir del 1,3 dicloro 2-propanol y una solución etanólica de trimetilamina y trietilamina, se estudió la síntesis de nuevos compuestos. El objetivo fue

sintetizar compuestos denominados *Hydrogen Bond Acceptor* (HBA), que se usan entre otras, para la producción de nuevas generaciones de solventes verdes, que buscan reemplazar los solventes provenientes de la industria petroquímica. De los ensayos, se logró obtener Cloruro de 1,3 (bis)triethylamonio-2-propanol (Disal 1) y Cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonio-2-propanol. (Disal 2). El ensayo con mejor resultado para cada una de las disales, considerando el mayor porcentaje de rendimiento (calculado según la relación del peso obtenido y el reactivo limitante (Ecuación 4.1)) y la ausencia de impurezas (a partir del análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN)), fue escalado. Las disales 1 y 2 caracterizadas por RMN y FT-IR mostraron las señales características de su estructura molecular, que incentiva a la formación de enlaces de hidrógeno (207), por lo cual son considerados como HBA's. Sus puntos de fusión altos (235 y 255 °C para las disales 1 y 2 respectivamente) característicos de este tipo de moléculas sirvieron también para el seguimiento. La capacidad absorción de agua (CAA) del ambiente fue determinada para las disales, con miras a otras posibles aplicaciones para los nuevos compuestos. Sin embargo, los valores de CAA inferiores a 10 % para la Disal 1 no fueron significativos. La CAA para la Disal 2 cercana al 15 % consiguió llegar al 37 % aumentando su superficie de exposición. Sin embargo, a la hora de recuperar el agua absorbida, los resultados no lograron mantener las características de aplicabilidad para este tipo de compuestos (217). El objetivo principal de sintetizar nuevos HBA's fue usarlos como precursores para la síntesis de los cada vez más importantes solventes eutécticos (DES's).

Los DES's son el resultado de la mezcla de al menos un HBA y un "Hydrogen Bond Donnor" (HBD), que tienen innumerables aplicaciones (133,146). Uno de sus principales usos, como solvente representa muchas ventajas no solo por ser más baratos si no menos contaminantes (215), lo cual es de especial importancia si se tiene en cuenta que hay innumerables procesos químicos que requieren el uso de solventes. Hay una gran cantidad de compuestos que pueden ser usados como HBD's (azúcares, aminoácidos, ácidos carboxílicos, aminas, entre otros). A partir de los ensayos se logró la síntesis de 11 DES's a partir de las Disal 1 (HBA) mezclada con ácido láctico, glicerol, dietilenglicol, urea, etilenglicol y ácido ascórbico (HBD's) y otros 11 DES's a partir de la Disal 2 mezclada con los mismos HBD's, en distintas proporciones (1:2, 1:5 ó 1:5). Los DES's fueron caracterizados mediante RMN y FT-IR, en las que se observaron desplazamientos leves en la longitud de onda que confirma la formación de puentes de hidrógeno (210).

Se usaron las condiciones de síntesis que lograron la formación de los DES's para su escalado. y se les determinaron algunas de sus principales propiedades (densidad, viscosidad, pH, conductividad, CAA, punto de fusión).

En cuanto a las propiedades que juegan un papel importante para determinar el uso del DES, los valores están dentro de los rangos ya reportados para DES's compuestos por distintos HBD's y cloruro de colina como HBA (127,148,237). Se confirmó la relación directa entre la densidad y la viscosidad para todos los DES's y con los HBD (127,128,136,138). La viscosidad es una de las propiedades más importantes por las implicaciones que puede tener en una línea de procesamiento industrial (116,121,130,242), pese a estar dentro del rango de las reportadas por los DES's, los valores obtenidos se pueden considerar como altas (>100 cP) (130,241). Las conductividades de los DES's suelen ser bajas, por lo que no suelen tener muchas aplicaciones en esta área (127,130,151), para los DES's sintetizados concuerda con esta premisa 2 mS cm^{-1} . La CCA fue mayor para los DES's con HBD's como glicerol, dietilenglicol y etilenglicol, específicamente con la Disal 1 (entre 3 y 5,6 %) y ligeramente mayores con la Disal 2 (entre 4 y 8 %). Los puntos de fusión menores a 100°C para los DES's sólidos, es una característica de este tipo de compuestos (229). El sintetizar nuevos DES's abre las posibilidades a explorar sus usos en las diferentes aplicaciones.

Uno de los posibles usos de los DES's es como solvente en procesos de fragmentación de BML, lo que nos lleva a otro de los objetivos de esta tesis doctoral, obtener compuestos de interés industrial a partir de residuos agroalimentarios como la BML, usando métodos más respetuosos con el medio ambiente como son el empleo de solventes verdes (DES's). Los residuos orgánicos obtenidos del procesamiento de industrias de zumos, aceite de oliva, etc. (industria de peso en el país), además de los residuos de cultivos agrícolas contienen distintos compuestos químicos usados en distintas aplicaciones como la lignina y celulosa, que pueden generar valor añadido. Se ensayaron los DES's sintetizados como solvente para el fraccionamiento diferentes residuos de cultivo (nectarina, ciruelo, melocotón, albaricoque, paraguay y alcachofa), usando el método modificado de Cequier et. al. (98) para obtener una fracción rica en celulosa y otra en lignina. Pero previo a la experimentación, se usó el programa de COSMO-RS para la modelización teórica y predicción de la solubilidad de la celulosa y lignina en los DES's. La simulación teórica realizada con las modelizaciones de las moléculas de los DES's y moléculas modelo representantes de la celulosa y lignina, mostró porcentajes de probabilidad de solubilidad (% P) entre 0 y 77 %. De estos resultados se escogieron los cinco DES's, con que presentaron porcentajes más altos de probabilidad de solubilidad para realizar los ensayos experimentales (DES A, D1:Glicerol (1:5), 77,6 % P celulosa ; DES B, D2:Urea (1:5), 69,5 % P celulosa ; DES C, D1:ácido oxálico (1:2), 55,1 % P celulosa; DES D, D1:Dietilenglicol (1:5), 35,1 % P lignina; DES E, D2:Dietilenglicol (1:5), 29,5 % P lignina. Se utilizaron los residuos de cultivo a los que se les determinó su composición (celulosa y lignina), estos valores fueron usados como valores de

referencia; posteriormente obtuvieron las diferentes fracciones. A los extractos obtenidos se les determinó el rendimiento de extracción (% R) y se analizaron con FT-IR, para ver si las señales correspondían a los compuestos esperados (celulosa o lignina). Para la fracción de celulosa los porcentajes obtenidos de extracto fueron mucho mayores (entre 70 y 100 % R) a los valores de referencia de cada residuo y para todos los DES's ensayados excepto el DESC. Con los DES A, B, D y E; la fracción de lignina no fue separada (>1 % R) con excepción de los resultados para el paraguay y albaricoque. (11 a 34 % con los DES's D y E). El análisis de los espectros FT-IR mostró señales que indicaban mezcla de celulosa, lignina y el DES's. El único solvente que mostró resultados cercanos a los valores de referencia y que la valoración de los espectros FT-IR coincidía con las características del extracto fue el DESC, compuesto por la D1 y ácido oxálico, de este HBD hay reportes con buenos resultados de fragmentación de BML. (263). En general, para todos los ensayos podemos decir que los resultados obtenidos en las pruebas experimentales no coincidieron con los de la modelización teórica. Entre otros aspectos, estos resultados pudieron deberse a que el programa COSMO-RS funciona mejor con modelizaciones de moléculas más sencillas. Los polímeros lignina y celulosa, que son de gran tamaño son muy difíciles de modelizar, por lo que se usaron moléculas más pequeñas como modelo (glucosa, celutetraosa, alcohol sinapílico y cumarílico), es decir que la probabilidad de solubilidad, fue calculada para esas moléculas relativamente pequeñas, cuando en realidad se pretendía extraer un polímero de tamaño mucho mayor. Otro aspecto a tener en cuenta es la composición de los residuos para los compuestos de interés (lignina 5 a 28 %; celulosa 22 a 41 %), podemos decir no son especialmente ricos en estos compuestos en comparación con otros residuos. Estas "bajas" cifras pudieron influir en el desarrollo de la extracción. Además, dependiendo de la matriz lignocelulósica en la que están los compuestos y del tipo de residuo, esta puede ser más o menos disponible. La acción de la solubilidad de los solutos en los DES's depende de las propiedades del DES's, las interacciones de cada sistema (residuo-DES's), el material tratado (humedad, viscosidad, tamaño de partículas) y sus condiciones de tratamiento (temperatura, tiempo, relación estequiométrica, etc.) (118,264). Como se evidencia la cantidad de variables a manejar es inmensa y todas estas pudieron influir, para no lograr la separación exitosa de los compuestos de interés y del DES's de los extractos obtenidos. A pesar de los resultados obtenidos, creemos que la investigación en relación al diseño, síntesis y aplicaciones de los DES's como disolventes es un tema de interés y por lo tanto en el grupo de investigación se continuará trabajando en ello. Obtener resultados positivos y de mayor aplicabilidad es el objetivo de los trabajos de investigación, pero los resultados que no son lo esperado también señala los nuevos caminos a seguir, para los futuros investigadores.

8. CONCLUSIONES GENERALES

De los resultados obtenidos en esta investigación titulada “Obtención de productos de interés industrial a partir de residuos agroalimentarios mediante procesos quimioenzimáticos”, se pueden establecer las siguientes conclusiones

- ✓ A partir de los residuos agroalimentarios se pueden obtener diversos productos de interés y potencial uso industrial como aceite de hígado de rape, compuestos donadores de hidrógeno y solventes eutécticos con procesos enzimáticos y/o químicos, generando diversas alternativas para producir valor agregado.
- ✓ A partir de un subproducto de la industria pesquera como el hígado de rape se logró extraer el 100 % de su aceite (contenido total 39 g /100 mL) usando los solventes verdes ciclopentimetileter y 2-metiltetrahidrofurano. De los métodos de agitación ensayados para extraer aceite de hígado de rape, el mejor método de agitación es rotatorio (equipo Roller Mixer (RM)) que obtuvo con todos los solventes verdes ensayados entre el 96 y 100 %, del aceite.
- ✓ El perfil lipídico del aceite de hígado de rape extraído determinado por cromatografía, mostro que se compone mayoritariamente de ácidos grasos monoinsaturados (43,7 %) y polinsaturados (26,5 %), dentro de los cuales destaca el 15,2 % de ácido docosahexaenoico (DHA) y el 4,4 de eicosapentaenoico (EPA).
- ✓ Se produjeron biocatalizadores a partir de hongos filamentosos (*R. oryzae* y *A. flavus*) “resting cells”, que se usaron en procesos de esterificación de una y dos etapas para obtener ésteres etílicos de aceite de hígado de rape. Las *resting cells* fúngicas hidrolizaron un mayor porcentaje en comparación con la enzima comercial (entre el 85 y 98 %). Sin embargo, en la esterificación, tanto directa (una etapa) como posterior a la hidrólisis (dos etapas), estos valores son menores que los de la enzima comercial. Los porcentajes de esterificación obtenidos con las *resting cells* de *R. oryzae* (61-65 %) pese a ser menores que los obtenidos con la enzima comercial (65-85 %) son más altos que los obtenidos por *A. flavus* (41 y 46 %).
- ✓ Las tecnologías informáticas de simulación y predicción fueron usadas dentro de este trabajo tanto para el estudio de solventes verdes en la extracción de aceite de hígado de rape, como en el estudio de la probabilidad de la solubilidad de biomasa lignocelulósica en diferentes DES’s aportando valor al análisis de datos, mostrando la aplicabilidad de este tipo de herramientas, sus ventajas y desventajas.
- ✓ Se sintetizaron dos nuevos compuestos el cloruro de 1,3 (bis)trietilamonio-2-propano (Disal 1) y el cloruro de 1,3 (bis) trimetilamonio-2-propanol (Disal 2) a partir del derivado de glicerol

(1,3 dicloro-2-propanol), que por sus características pueden ser usados como compuestos donadores de hidrógeno. Los rendimientos de reacción en el escalado para la Disal 1 fueron similares a los obtenidos en los ensayos de síntesis (83 y 82,5 % respectivamente), al igual que para la Disal 2 (98 y 100 % respectivamente).

- ✓ Los puntos de fusión fueron 235 y 255 °C para la Disal 1 y 2 respectivamente, valores característicos para este tipo de productos. La capacidad de absorción de la Disal 2 (14,44 %) es mayor que la de la Disal 1 (8,87 %) y para ambos casos la absorción de agua es más intensa en los 3 primeros días donde se absorbe aproximadamente el 95 % del total.
- ✓ Se sintetizaron 22 nuevos solventes eutécticos (DES's) usando como aceptores de hidrógeno (HBA's) las disales sintetizadas y como donadores de hidrógeno (HBD's) ácido láctico, glicerol, dietilenglicol, urea, etilenglicol y ácido oxálico. Los HBA y HBD no mostraron actividad antimicrobiana posterior a los ensayos realizados. Los nuevos DES's sintetizados fueron caracterizados mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopia infrarroja (FT-IR), donde se evidenciaron algunos de los desplazamientos correspondientes a los enlaces OH causados por la formación de puentes de hidrógeno de los DES's.
- ✓ A los 22 solventes sintetizados, se les determinaron algunas de sus propiedades fisicoquímicas como densidad, pH, conductividad, viscosidad y capacidad de absorción de agua; obteniendo valores característicos para este tipo de solventes. La densidad estuvo entre (1,11 y 1,22 g/cm³), el pH entre -0,4 y 8,5 en función de la acidez relativa de sus componentes. La viscosidad entre 83,5 cP (DES17) y 830 cP (DES1) para los menos viscosos y entre 1688 (DES3) y 24063 cP (DES15) para los valores más altos. Las conductividades fueron bajas entre 122,7 S/cm (DES3) y 2760 S/cm (DES21). Además, los puntos de fusión de los compuestos sólidos fueron menores a 100 °C. La absorción de agua en los DES's estuvo ente el 0 y el 8 %.
- ✓ Algunos de los solventes eutécticos (DES's) sintetizados fueron ensayados para el fraccionamiento de biomasa lignocelulósica (BML). De los 5 DES's ensayados (A, B, C, D y E), para tratar 6 residuos de cultivo (nectarina, ciruelo, melocotón, albaricoque, paraguay y alcachofa) solo el DESC (compuesto por la Disal1: ácido oxálico (1:5)) obtuvo resultados de fraccionamiento cercanos a los valores de referencia (composición de celulosa y lignina de cada uno de los residuos). Los demás solventes usados mostraron resultados no acordes a los valores de referencia.
- ✓ En general, con el DES A (Disal 1:Glicerol, 1:5) y DES B (Disal 2:dietilenglicol, 1:5), se obtuvieron altos porcentajes de extracción en la fracción 1 (F1) correspondiente a la celulosa (entre 78 y 100 %). No obstante, el análisis de los extractos mediante FT-IR mostro señales características que indicaban presencia de celulosa, lignina. Esto concuerda con los bajos

porcentajes obtenidos para la fracción 2 (F2) correspondiente a lignina (0-20 %). Los solventes A y B son poco eficientes para la extracción de celulosa y lignina a partir de BML para en los residuos tratados.

- ✓ En los ensayos realizados con el DES D (Disal 1:Dietilenglicol, 1:5) y DES E (Disal 2:Dietilenglicol, 1:5), se observaron igualmente altos porcentajes de F1 (75 y 100 %) y bajos porcentajes para la F2 (0 y 36 %). En los extractos de la F1 también se evidencio presencia de señales correspondientes a celulosa y lignina. Además, en los extractos que presentaron los porcentajes más altos para la F2, se observaron mezclas de lignina con trazas del solvente. Los DES's D y E son poco eficientes para la extracción de celulosa o lignina a partir de BML para en los residuos tratados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Prieto Sandoval V, Jaca García M, Ormazabal M. Economía circular: relación con la evolución del concepto de sostenibilidad y estrategias para su implementación. Mem Investig en Ing [Internet]. 2017;(15):85–95. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6296083>
2. European Commission. Joint Research Centre. Future transitions for the bioeconomy towards sustainable development and a climate-neutral economy: knowledge synthesis : final report. [Internet]. LU: Publications Office; 2020 [cited 2021 Apr 30]. Available from: <https://data.europa.eu/doi/10.2760/667966>
3. Hériz IB. Economía circular: Un nuevo modelo de producción y consumo sostenible. Madrid: Tèbar Flores; 2018.
4. Organización de las Naciones Unidas. ¿Qué es el Acuerdo de París? | CMNUCC [Internet]. United Nations Climate Change. 2018 [cited 2021 Oct 5]. Available from: <https://unfccc.int/es/process-and-meetings/the-paris-agreement/que-es-el-acuerdo-de-paris>
5. Parlamento Europeo. La Economía circular [Internet]. 2015 [cited 2021 Jun 16]. Available from: <https://www.europarl.europa.eu/news/es/headlines/economy/20151201STO05603/economia-circular-definicion-importancia-y-beneficios>
6. Cerdá E, Khalilova A. Economía Circular [Internet]. Vol. 401. 2016 [cited 2021 Jun 16]. 11 p. Available from: <https://www.mincotur.gob.es/Publicaciones/Publicacionesperiodicas/EconomiaIndustrial/RevistaEconomiaIndustrial/401/CERDÁ y KHALILOVA.pdf>
7. Worldometer. World Population Clock: 7.9 Billion People (2021) - Worldometer [Internet]. [cited 2021 Jun 29]. Available from: <https://www.worldometers.info/world-population/>
8. Organización de las Naciones Unidas ONU. El Acuerdo de París [Internet]. [cited 2021 Apr 30]. Available from: <https://unfccc.int/es/process-and-meetings/the-paris-agreement/el-acuerdo-de-paris>
9. Brundtland GH. Informe de la Comisión Mundial sobre Medio Ambiente y el Desarrollo: Nuestro futuro común [Internet]. Documentos de las Naciones, Recolección de un ... 1987. Available from: http://www.ecominga.uqam.ca/PDF/BIBLIOGRAPHIE/GUIDE_LECTURE_1/CMMAD-

10. EAE Bussines School. Los sectores de producción y sus características | EAE [Internet]. 17 mayo. 2021 [cited 2021 Sep 21]. Available from: <https://retos-operaciones-logistica.eae.es/los-sectores-de-produccion-y-sus-caracteristicas/>
11. Mestres R. Química Sostenible: Naturaleza, fines y ámbito. Educación Química [Internet]. 2013;24:103–12. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0187-893X\(13\)72503-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0187-893X(13)72503-5)
12. Hetemäki L, Hanewinkel M, Muys B, Ollikainen M, Palahí M, Trasobares A. Leading the way to a European circular bioeconomy strategy [Internet]. Vol. 5, European forest institute EFI. 2017. Available from: https://efi.int/sites/default/files/files/publication-bank/2018/efi_fstp_5_2017.pdf
13. Cerantola N, Ortiz Pinilla MT. La Economía Circular en el Sector Agroalimentario [Internet]. ADICAE, Asociación de Usuarios de Cajas, Bancos y Seguros. 2018. Available from: <https://www.otroconsumoposible.es/publicacion/economia-circular.pdf>
14. Organización de las Naciones Unidas ONU. Carta de las Naciones Unidas [Internet]. United Nations. 1945 [cited 2021 Jun 16]. Available from: <https://www.un.org/es/about-us/un-charter>
15. Bell E, Cullen J, Taylor S. Adoption of the Paris Agreement [Internet]. Convention on Climate Change (2015); 2016. Available from: https://unfccc.int/sites/default/files/english_paris_agreement.pdf
16. Delbeke J, Runge-Metzger A, Slingenberg Y, Werksman J. The paris agreement. In: Towards a Climate-Neutral Europe. 2019. p. 24–45.
17. Organización de las Naciones Unidas. Informe de los Objetivos de Desarrollo Sostenible 2018 [Internet]. 2018. Available from: <https://unstats.un.org/sdgs/files/report/2018/TheSustainableDevelopmentGoalsReport2018-ES.pdf>
18. Organización de las Naciones Unidas ONU. The sustainable development goals- Report 2020 — SDG Indicators [Internet]. 2020 [cited 2021 May 3]. Available from: <https://unstats.un.org/sdgs/report/2020/>
19. Naciones Unidas. The sustainable Development Goal Report [Internet]. 2020. p. 68. Available from: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/development-agenda/>
20. Sabatier P. Catalysts in Organic Chemistry. 1922. 429 p.
21. Millholland CD. Industrial Catalysts - Catalyst Analysis - Advancing Materials [Internet]. Thermofisher. [cited 2022 May 4]. Available from:

- <https://www.thermofisher.com/blog/materials/characterizing-the-effectiveness-of-industrial-catalysts/>
22. Hagen J. *Industrial Catalysis. A Practical Approach*. Wiley-VCH. 2006. 507 p.
 23. National Academies Press. *Catalytic Process Technology* [Internet]. *Catalytic Process Technology*. Washington, D.C.: National Academies Press; 2000 [cited 2022 May 4]. 1–55 p. Available from: <https://nap.nationalacademies.org/read/10038/chapter/4>
 24. De Jong WA, Bylaska E, Govind N, Janssen CL, Kowalski K, Müller T, et al. Utilizing high performance computing for chemistry: Parallel computational chemistry. *Phys Chem Chem Phys* [Internet]. 2010 Jun 23 [cited 2022 May 19];12(26):6896–920. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2010/cp/c002859b>
 25. Crozier PS. *LAMMPS Molecular Dynamics Simulator* [Internet]. Tutorial. 2011 [cited 2022 May 19]. p. 1–5. Available from: <https://www.lammps.org/>
 26. Paul gu. *NWChem software* [Internet]. [cited 2022 May 19]. Available from: <https://www.nwchem-sw.org/>
 27. Valiev M, Bylaska EJ, Govind N, Kowalski K, Straatsma TP, Van Dam HJJ, et al. *NWChem: A comprehensive and scalable open-source solution for large scale molecular simulations*. *Comput Phys Commun*. 2010 Sep;181(9):1477–89.
 28. Suite AM. *COSMO-RS Manual*. 2021.
 29. Klamt A. *The COSMO and COSMO-RS solvation models* [Internet]. Vol. 1, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. John Wiley & Sons, Ltd; 2011 [cited 2022 Apr 21]. p. 699–709. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/wcms.56>
 30. Klamt A. Prediction of the mutual solubilities of hydrocarbons and water with COSMO-RS. *Fluid Phase Equilib*. 2003;206(1–2):223–35.
 31. Klamt A, Eckert F, Arlt W. COSMO-RS: An alternative to simulation for calculating thermodynamic properties of liquid mixtures. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2010;1:101–22.
 32. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. Gobierno de España. *Terminología-residuos* [Internet]. [cited 2022 May 11]. Available from: <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestion-residuos/flujos/domesticos/gestion/terminologia/>
 33. Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (IDAE). *Situación y Potencial Valorización Energética Directa de Residuos* [Internet]. 2020 [cited 2021 Jul 8]. p. 1–136.

- Available from:
https://www.idae.es/uploads/documentos/documentos_11227_e15_residuos_c3ead071.pdf
34. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico-MITECO. Memoria anual de generación y gestión de residuos de competencia municipal 2017. MITECO. 2017. p. 28.
 35. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico-MITECO. Memoria Anual de Generación y Gestión de Residuos de Competencia Municipal 2018 [Internet]. MITECO. 2018. p. 26. Available from: https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/publicaciones/memoriaresiduosmunicipales2018_tcm30-521965.pdf
 36. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico-MITECO. Memoria anual de generación y gestión de residuos [Internet]. MITECO. 2016. p. 1. Available from: https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/publicaciones/18generacionresiduosindustriales2004-2016_tcm30-510671.pdf
 37. Zhou C, Wang Y. Recent progress in the conversion of biomass wastes into functional materials for value-added applications. *Sci Technol Adv Mater* [Internet]. 2020 [cited 2021 Oct 7];21(1):787–804. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14686996.2020.1848213>
 38. Laufenberg G, Kunz B, Nystroem M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresour Technol*. 2003;87(2):167–98.
 39. Coyette, H.; Schenk C. Agriculture, forestry and fishery statistics [Internet]. 2013 [cited 2021 Sep 14]. Available from: <https://ec.europa.eu/eurostat/documents/3217494/12069644/KS-FK-20-001-EN-N.pdf/a7439b01-671b-80ce-85e4-4d803c44340a>
 40. Ben-Othman S, Jöudu I, Bhat R. Bioactives from agri-food wastes: Present insights and future challenges. *Molecules*. 2020;25(3):1–32.
 41. Ravindran R, Jaiswal AK. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2016;34(1):58–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.008>
 42. Dahmen N, Lewandowski I, Zibek S, Weidtmann A. Integrated lignocellulosic value chains

- in a growing bioeconomy: Status quo and perspectives. *GCB Bioenergy*. 2019;11(1):107–17.
43. Mercasa. ALIMENTACIÓN EN ESPAÑA Producción, industria, distribución y consumo [Internet]. 23 Edición. 2021 [cited 2021 Sep 15]. Available from: https://www.mercasa.es/media/publicaciones/281/AEE_2020_web.pdf
 44. Arevalo-Gallegos A, Ahmad Z, Asgher M, Parra-Saldivar R, Iqbal HMN. Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach—A review. *Int J Biol Macromol*. 2017 Jun 1;99:308–18.
 45. Vargas Corredor YA, Pérez Pérez LI. Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Rev Fac Ciencias Básicas* [Internet]. 2018 Apr 15 [cited 2021 Jun 28];V(1):59–72. Available from: https://www.academia.edu/23775116/Aprovechamiento_de_Residuos_Agroindustriales_Pasado_Presente_y_Futuro
 46. Rana R, Nanda S, Meda V, Dalai AK. A Review of Lignin Chemistry and its Biorefining Conversion Technologies. *J Biochem Eng Bioprocess Technol* [Internet]. 2018 [cited 2021 Sep 27];1(2):1–14. Available from: https://www.scitechnol.com/peer-review/a-review-of-lignin-chemistry-and-its-biorefining-conversion-technologies-EGj8.php?article_id=8094
 47. Ballesteros LF, Michelin M, Vicente AA, Teixeira JA, Cerqueira MÂ. Lignocellulosic Materials: Sources and Processing Technologies. In: *Lignocellulosic Materials and Their Use in Bio-Based Packaging* [Internet]. 2018. p. 1–33. Available from: <https://www.springer.com/gp/book/9783319929392>
 48. Zakzeski J, Bruijninx PCA, Jongerius AL, Weckhuysen BM. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chem Rev* [Internet]. 2010 Jun 9 [cited 2021 Oct 5];110(6):3552–99. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cr900354u>
 49. Brodeur G, Yau E, Badal K, Collier J, Ramachandran KB, Ramakrishnan S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *Enzyme Res* [Internet]. 2011;2011(1):1–17. Available from: <https://downloads.hindawi.com/archive/2011/787532.pdf>
 50. Lobato-Peralta DR, Duque-Brito E, Villafán-Vidales HI, Longoria A, Sebastian PJ, Cuentas-Gallegos AK, et al. A review on trends in lignin extraction and valorization of lignocellulosic biomass for energy applications. *J Clean Prod*. 2021 Apr 15;293:126123.

51. Lu Y, Lu YC, Hu HQ, Xie FJ, Wei XY, Fan X. Structural characterization of lignin and its degradation products with spectroscopic methods. *J Spectrosc* [Internet]. 2017;2017. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jspec/2017/8951658/>
52. Piñeros-Castro Y. Aprovechamiento de biomasa lignocelulósica, algunas experiencias. [Internet]. 2016 [cited 2021 Oct 4]. 238 p. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/279448880>
53. Brandt A, Gräsvik J, Hallett JP, Welton T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem.* 2013;15(3):550–83.
54. Poletto M, Pistor V, J. A. Structural Characteristics and Thermal Properties of Native Cellulose. In: Van De Ven TGM, editor. *Cellulose* [Internet]. InTech; 2013 [cited 2021 Jul 2]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/cellulose-fundamental-aspects/structural-characteristics-and-thermal-properties-of-native-cellulose>
55. Figueiredo P, Lintinen K, Hirvonen JT, Kostianen MA, Santos HA. Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. *Prog Mater Sci.* 2018;93:233–69.
56. Kärkäs MD, Matsuura BS, Monos TM, Magallanes G, Stephenson CRJ. Transition-metal catalyzed valorization of lignin: The key to a sustainable carbon-neutral future. *Org Biomol Chem.* 2016;14(6):1853–914.
57. Rojas OJ. *Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, Nanocelluloses and Advanced Materials* [Internet]. Rojas OJ, editor. *Advances in Polymer Science* 271. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cited 2021 Sep 29]. 341 p. (*Advances in Polymer Science*; vol. 271). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-26015-0>
58. Xue Y, Mou Z, Xiao H. Nanocellulose as a sustainable biomass material: Structure, properties, present status and future prospects in biomedical applications [Internet]. Vol. 9, *Nanoscale*. The Royal Society of Chemistry; 2017 [cited 2021 Oct 1]. p. 14758–81. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/nr/c7nr04994c>
59. Quimicas. Químicas: Ejemplos de Enlace Químico [Internet]. [cited 2021 Sep 27]. Available from: <https://www.quimicas.net/2015/05/ejemplos-de-enlace-quimico.html>
60. Ventura-Cruz S, Tecante A. Nanocellulose and microcrystalline cellulose from agricultural waste: Review on isolation and application as reinforcement in polymeric matrices. *Food Hydrocoll.* 2021 Sep 1;118:106771.
61. Debnath B, Haldar D, Purkait MK. A critical review on the techniques used for the synthesis and applications of crystalline cellulose derived from agricultural wastes and

- forest residues. *Carbohydr Polym.* 2021 Dec 1;273:118537.
62. Sadeghifar H, Sadeghifar H, Ragauskas A, Ragauskas A, Ragauskas A, Ragauskas A. Perspective on Technical Lignin Fractionation. *ACS Sustain Chem Eng.* 2020;8(22):8086–101.
 63. Casas García A. Disolución de madera de “*Pinus radiata*” y “*Eucalyptus globulus*” en Líquidos Iónicos basados en el catión 1-Alquil-3-Metilimidazolio y regeneración de celulosa y lignina. [Internet]. Complutense de Madrid; 2013 [cited 2021 Oct 4]. Available from: <https://eprints.ucm.es/23713/1/T34946.pdf>
 64. Hatakeyama H, Hatakeyama T. Lignin Structure, Properties, and Applications. In: *Biopolymers Lignin, Proteins, Bioactive, Nanocomposites* [Internet]. 2009 [cited 2021 Oct 5]. p. 1–63. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F12_2009_12#citeas
 65. Chávez-Sifontes M, Domine ME. Lignina , Estructura Y Aplicaciones : Métodos De Despolimerización Para La Obtención De Derivados Aromáticos De Interés Industrial Lignin , Structure and Applications : Depolymerization Methods for. *Av en ciencias e Ing* [Internet]. 2013 [cited 2021 Sep 23];4(4):15–46. Available from: http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/15
 66. Ge Y, Li Z. Application of Lignin and Its Derivatives in Adsorption of Heavy Metal Ions in Water: A Review. *ACS Sustain Chem Eng* [Internet]. 2018 May 7 [cited 2021 Oct 5];6(5):7181–92. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acssuschemeng.8b01345>
 67. Weigand L, Mostame S, Brandt-Talbot A, Welton T, Hallett JP. Effect of pretreatment severity on the cellulose and lignin isolated from: *Salix* using ionoSolv pretreatment. *Faraday Discuss.* 2017;202:331–49.
 68. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico-MITECO. Programa Estatal de Prevención de Residuos 2014-2020 [Internet]. [cited 2021 Jun 29]. Available from: <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/planes-y-estrategias/Planes-y-Programas.aspx>
 69. Martínez JJ (Autor) / S de la CN de S (Autor). Libro Blanco Subproductos de Origen Animal no Destinados a Consumo Humano [Internet]. 1st ed. Ministerio de Agricultura P y A, editor. Vol. 1. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación; 2007. 390 p. Available from: <https://www.ehu.es/documents/4736101/5153347/Libro+Blanco+SANDACH.pdf?vers>

ion=1.0

70. Parlamento Europeo. Reglamento (CE) N° 1069/2009. Establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano. Diario Oficial de la Unión Europea 2009 p. 1–33.
71. Agencia de residuos de cataluña. Subproductos SANDACH - Registro, transporte de residuos y solicitud de exención [Internet]. Agència de Residus de Catalunya. [cited 2021 Jun 30]. Available from: http://residus.gencat.cat/es/consultes_i_tramits_-_nou/tramits/detall/tramits-sandach-00003
72. Mekonnen TH, Mussone PG, Choi P, Bressler DC. Adhesives from waste protein biomass for oriented strand board composites: Development and performance. *Macromol Mater Eng* [Internet]. 2014 Aug 1 [cited 2021 Oct 7];299(8):1003–12. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mame.201300402>
73. Mekonnen TH, Mussone PG, El-Thaher N, Choi P, Bressler DC. Subcritical hydrolysis and characterization of waste proteinaceous biomass for value added applications. *J Chem Technol Biotechnol*. 2015 Mar 1;90(3):476–83.
74. Cita Centro tecnológico Agroalimentario. Guía de Buenas Prácticas para la reducción de SANDACH en mataderos y empresas elaboradoras. [Internet]. 2012 [cited 2021 Oct 7]. Available from: http://ctc-cita.es/fileadmin/redactores/Explora/GUIA_BUENAS_PRACTICAS_PABVA.pdf
75. Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, ANAFACO CECOPESCA-Centro técnico Nacional de Conservación de productos de la pesca y acuicultura. Guía para el aprovechamiento de los subproductos de pescado para la obtención de productos funcionales y bioactivos [Internet]. Vol. 1, Gobierno de España. 2012 [cited 2021 Oct 7]. Available from: <http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/la-agricultura-ecologica/default.aspx>
76. Pike IH, Jackson A. Fish oil: Production and use now and in the future. *Lipid Technol* [Internet]. 2010;22(3):59–61. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/lite.201000003>
77. Aguilera-Oviedo J, Yara-Varón E, Balcells M, Torres M, Canela-Garayoa R. Sustainable synthesis of omega-3 fatty acid ethyl esters from monkfish liver oil. *Catalysts*. 2021;11(1):1–19.
78. Sahena F, Zaidul ISM, Jinap S, Saari N, Jahurul HA, Abbas KA, et al. PUFAs in fish: Extraction, fractionation, importance in health. *Compr Rev Food Sci Food Saf*.

2009;8(2):59–74.

79. Punia S, Sandhu KS, Siroha AK, Dhull SB. Omega 3-metabolism, absorption, bioavailability and health benefits—A review. *PharmaNutrition* [Internet]. 2019;10(July):1–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2019.100162>
80. Shahidi F, Ambigaipalan P. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annu Rev Food Sci Technol* [Internet]. 2018 Mar 25;9(1):345–81. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-food-111317-095850>
81. von Schacky C, Schacky C von, von Schacky C, Schacky C von. A review of omega-3 ethyl esters for cardiovascular prevention and treatment of increased blood triglyceride levels. *Vasc Health Risk Manag* [Internet]. 2006 [cited 2020 Nov 26];2(3):251–62. Available from: <http://www.atypon-link.com/DMP/doi/abs/10.2147/vhrm.2006.2.3.251>
82. Thérien A, Cieślak A, Verreault M, Perreault M, Trottier J, Gobeil S, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid: A pharmaco-nutraceutical approach to improve the responsiveness to ursodeoxycholic acid. *Nutrients* [Internet]. 2021 Jul 29 [cited 2021 Oct 19];13(8):2617. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/8/2617/htm>
83. Golpour P, Nourbakhsh M, Mazaherioun M, Janani L, Nourbakhsh M, Yaghmaei P. Improvement of NRF2 gene expression and antioxidant status in patients with type 2 diabetes mellitus after supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids: A double-blind randomised placebo-controlled clinical trial. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2020;162:1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2020.108120>
84. Calder PC. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2007;77(5–6):327–35.
85. Volpato M, Hull MA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids as adjuvant therapy of colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2018;37(2–3):545–55. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6133177/>
86. Nindrea RD, Aryandono T, Lazuardi L, Dwiprahasto I. Protective effect of omega-3 fatty acids in fish consumption against breast cancer in Asian patients: A meta-analysis. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2019;20(2):327–32.
87. Mazahery H, Conlon CA, Beck KL, Mugridge O, Kruger MC, Stonehouse W, et al. Inflammation (IL-1 β) Modifies the Effect of Vitamin D and Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids on Core Symptoms of Autism Spectrum Disorder—An Exploratory Pilot Study. *Nutrients* [Internet]. 2020 [cited 2020 Nov 26];12(3):661.

Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/3/661>

88. Swanson D, Block R, Mousa SA. Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA : Health. Review. *J Adv Nutr* [Internet]. 2012;3:1–7. Available from: <http://advances.nutrition.org/content/3/1/1.short>
89. Ghaly AE, Ramakrishnan V V., Brooks MS, Budge SM, Dave D. Fish processing wastes as a potential source of proteins, amino acids and oils: A critical review. *J Microb Biochem Technol*. 2013;5(4):107–29.
90. Boran G, Regenstein JM. Optimization of gelatin extraction from silver carp skin. *J Food Sci* [Internet]. 2009 Oct 1 [cited 2021 Oct 7];74(8):E432–41. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1750-3841.2009.01328.x>
91. Mulero Cánovas J, Zafrilla Rentero P, Martínez-Cachá Martínez A, Leal Hernández M, Abellán Alemán J. Péptidos bioactivos. *Clínica e Investig en Arterioscler* [Internet]. 2011 Sep 1 [cited 2022 May 21];23(5):219–27. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-clinica-e-investigacion-arteriosclerosis-15-articulo-peptidos-bioactivos-S0214916811001057>
92. Guo N, Sun J, Zhang Z, Mao X. Recovery of Chitin and Protein from Shrimp Head Waste by Endogenous Enzyme Autolysis and Fermentation. *J Ocean Univ China* [Internet]. 2019 [cited 2021 Oct 7];18(3):719–26. Available from: <http://www.ouc.edu.cn/xbywb/>
93. Hooshmand H, Shabanpour B, Moosavi-Nasab M, Golmakani MT. Optimization of carotenoids extraction from blue crab (*Portunus pelagicus*) and shrimp (*Penaeus semisulcatus*) wastes using organic solvents and vegetable oils. *J Food Process Preserv* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2021 Oct 7];41(5):e13171. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jfpp.13171>
94. Gomez. Adela Emilia. Terapia insulínica. Revisión y actualización [Internet]. *Offarm*. 2008 [cited 2022 May 21]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13128906>
95. Haldar D, Purkait MK. Micro and nanocrystalline cellulose derivatives of lignocellulosic biomass: A review on synthesis, applications and advancements. *Carbohydr Polym*. 2020 Dec 15;250:116937.
96. Wang J, Qian W, He Y, Xiong Y, Song P, Wang RM. Reutilization of discarded biomass for preparing functional polymer materials. *Waste Manag*. 2017 Jul 1;65:11–21.
97. Mishra S, Kharkar PS, Pethe AM. Biomass and waste materials as potential sources of nanocrystalline cellulose: Comparative review of preparation methods (2016 – Till date).

- Carbohydr Polym. 2019 Mar 1;207:418–27.
98. Cequier E, Aguilera J, Balcells M, Canela-Garayoa R. Extraction and characterization of lignin from olive pomace: a comparison study among ionic liquid, sulfuric acid, and alkaline treatments. *Biomass Convers Biorefinery*. 2019;9(2):241–52.
 99. García Calvo-Flores F, Dobado JA. Química sostenible : una alternativa creíble. In: *Química y Medio Ambiente*. 2008. p. 205.
 100. Xing Y, Li Z, Fan Y, Hou H. Biohydrogen production from dairy manures with acidification pretreatment by anaerobic fermentation. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 2010 Jun 5 [cited 2021 Oct 7];17(2):392–9. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-009-0187-4>
 101. Parlamento Europeo. RESOLUTION Objection RPS animals proteins [Internet]. Bruselas; 2021 p. 1–6. Available from: https://www.europarl.europa.eu/meetdocs/2014_2019/plmrep/COMMITTEES/ENVI/DV/2021/06-21/RE_Objection_RPS_animals_proteins_EN.pdf
 102. Ramkumar A, Sivakumar N, Victor R. Fish Waste-Potential Low Cost Substrate for Bacterial Protease Production: A Brief Review. *Open Biotechnol J*. 2016 Nov 14;10(1):335–41.
 103. Adhikari BB, Chae M, Bressler DC. Utilization of slaughterhouse waste in value-added applications: Recent advances in the development of wood adhesives. *Polymers (Basel)* [Internet]. 2018 Feb 11 [cited 2021 Oct 7];10(2):176. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4360/10/2/176/htm>
 104. Espinosa S, Diaz MS, Brignole EA. Food additives obtained by supercritical extraction from natural sources. *J Supercrit Fluids* [Internet]. 2008;45(2):213–9. Available from: https://www.researchgate.net/publication/244361508_Food_additives_obtained_by_supercritical_extraction_from_natural_sources
 105. Angulo B, Fraile JM, Gil L, Herrerías CI. Comparison of Chemical and Enzymatic Methods for the Transesterification of Waste Fish Oil Fatty Ethyl Esters with Different Alcohols. *ACS Omega* [Internet]. 2020;5(3):1479–87. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6990435/>
 106. Kwatra B. a Review on Potential Properties and Therapeutic Applications of Lycopene. *Int J Med Biomed Stud*. 2020;4(4).
 107. Joshi DR, Adhikari N. An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. *J Pharm Res Int*. 2019;28(3):1–18.

108. Larsen C, Lundberg P, Tang S, Ràfols-Ribé J, Sandström A, Mattias Lindh E, et al. A tool for identifying green solvents for printed electronics. *Nat Commun* [Internet]. 2021 Jul 23 [cited 2021 Oct 20];12(1):1–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-24761-x>
109. Fisher Scientific. Disolventes | Fisher Scientific [Internet]. [cited 2021 Oct 19]. Available from: <https://www.fishersci.es/es/es/products/I9C8K3RF/solvents.html>
110. Sharma R, Oberoi HS, Dhillon GS. Fruit and Vegetable Processing Waste: Renewable Feed Stocks for Enzyme Production [Internet]. *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production: Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass*. Elsevier Inc.; 2016. 23–59 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802392-1.00002-2>
111. Baiano A. Recovery of biomolecules from food wastes - A review. *Molecules*. 2014;19(9):14821–42.
112. Henderson RK, Jiménez-González C, Constable DJC, Alston SR, Inglis GGA, Fisher G, et al. Expanding GSK's solvent selection guide – embedding sustainability into solvent selection starting at medicinal chemistry. *Green Chem*. 2011;13(4):854–62.
113. Alder CM, Hayler JD, Henderson RK, Redman AM, Shukla L, Shuster E, et al. Updating and further expanding GSK's solvent sustainability guide. *R Soc Chem*. 2016;18:3879–90.
114. Gadea R, Romano D, Santos T. Folleto campaña de disolventes- Proyecto prevención y control de sustancias disolventes peligrosas. [Internet]. Vol. 2008, Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud- ISTAS. 2008 [cited 2021 Oct 21]. p. 12. Available from: [http://istas.net/descargas/Sustancias disolventes peligrosas.pdf](http://istas.net/descargas/Sustancias%20disolventes%20peligrosas.pdf)
115. Gadea R, Romano D, Santos T. Sustitución de sustancias disolventes peligrosas - GUÍA PARA DELEGADOS Y DELEGADAS DE PREVENCIÓN. Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud- ISTAS. 2007. p. 72.
116. Clarke CJ, Tu W-CC, Levers O, Bröhl A, Hallett JP. Green and Sustainable Solvents in Chemical Processes. *Chem Rev* [Internet]. 2018 Jan 24;118(2):747–800. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.7b00571>
117. Prat D, Wells A, Hayler J, Sneddon H, Mcelroy CR, Abou-shehada S, et al. CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. *Green Chem* [Internet]. 2015;(September). Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/c5gc01008j>
118. Dopico-Ramírez D, Hernández-Corvo Y, León-Fernández V, Bordallo-López E. Líquidos iónicos para la transformación de biomasa lignocelulósica. *ICIDCA Sobre los Deriv la Caña*

- Azúcar. 2013;47(1):26–37.
119. Benvenuti L, Zielinski AAF, Ferreira SRS. Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES? *Trends Food Sci Technol*. 2019;90(January):133–46.
 120. Płotka-Wasyłka J, de la Guardia M, Andruch V, Vilková M. Deep eutectic solvents vs ionic liquids: Similarities and differences. *Microchem J*. 2020;159.
 121. Zdanowicz M, Wilpiszewska K, Spychaj T. Deep eutectic solvents for polysaccharides processing. A review. *Carbohydr Polym*. 2018;200(July):361–80.
 122. Wankat PC. *Ingeniería de procesos de separación (2a. ed.)*. [Internet]. Pearson Educación; 2008 [cited 2021 Oct 28]. 772 p. Available from: <https://elibro.net/es/ereader/udl/107793?page=500>
 123. Luque de Castro MD, Valcárcel Cases M, Tena Vázquez de la Torre MT. *Extracción fluidos supercríticos proceso analítico* [Internet]. 1993 [cited 2021 Oct 28]. 480 p. Available from: https://books.google.es/books?id=7l4d5wSXjYOC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q=expandido&f=false
 124. Klett AS, Payne AM, Phongpreecha T, Hodge DB, Thies MC. Benign Fractionation of Lignin with CO₂-Expanded Solvents of Acetic Acid + Water. *Ind Eng Chem Res* [Internet]. 2017 Aug 30 [cited 2021 Oct 28];56(34):9778–82. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.iecr.7b02272>
 125. Pollet P, Eckertabc CA, Liotta CL. Switchable solvents. *Chem Sci* [Internet]. 2011 [cited 2021 Oct 28];2(4):609–14. Available from: www.rsc.org/chemicalscience
 126. Abbott AP, Capper G, Davies DL, Munro HL, Rasheed RK, Tambyrajah V. Preparation of novel, moisture-stable, lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains. *Chem Commun* [Internet]. 2001 Oct 15 [cited 2021 Oct 29];1(19):2010–1. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2001/cc/b106357j>
 127. El Achkar T, Greige-Gerges H, Fourmentin S. Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environ Chem Lett* [Internet]. 2021;19(4):3397–408. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01225-8>
 128. Smith EL, Abbott AP, Ryder KS. Deep Eutectic Solvents (DESS) and Their Applications. *Chem Rev*. 2014;114(21):11060–82.
 129. Wu J, Liang Q, Yu X, Lü Q, Ma L, Qin X, et al. Deep Eutectic Solvents for Boosting Electrochemical Energy Storage and Conversion : A Review and Perspective. *Adv functional Mater*. 2021;2011102:1–25.

130. Zhang Q, De Oliveira Vigier K, Royer S, Jérôme F. Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2012;41(21):7108–46. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/cs/c2cs35178a>
131. Tomé LIN, Baião V, da Silva W, Brett CMA. Deep eutectic solvents for the production and application of new materials. *Appl Mater Today* [Internet]. 2018;10:30–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apmt.2017.11.005>
132. Yara-Varón E, Li Y, Balcells M, Canela-Garayoa R, Fabiano-Tixier AS, Chemat F. Vegetable oils as alternative solvents for green oleo-extraction, purification and formulation of food and natural products. *Molecules* [Internet]. 2017;22(9):1474–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28872605/>
133. Mannu A, Blangetti M, Baldino S, Prandi C. Promising technological and industrial applications of deep eutectic systems. *Materials (Basel)* [Internet]. 2021 May [cited 2021 Jun 15];14(10):2494. Available from: <https://www.mdpi.com/1996-1944/14/10/2494>
134. Choi YH, van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IWCE, et al. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol* [Internet]. 2011 Aug 5 [cited 2021 Oct 29];156(4):1701–5. Available from: <https://academic.oup.com/plphys/article/156/4/1701/6108881>
135. Rahman MS, Roy R, Jadhav B, Hossain MN, Halim MA, Raynie DE. Formulation, structure, and applications of therapeutic and amino acid-based deep eutectic solvents: An overview. *J Mol Liq.* 2021;321:114745.
136. Hansen BB, Spittle S, Chen B, Poe D, Zhang Y, Klein JM, et al. Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chem Rev* [Internet]. 2021;121(3):1232–85. Available from: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>
137. Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Vasuki T. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem Commun* [Internet]. 2003;70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12610970/>
138. Abbott AP, Barron JC, Ryder KS, Wilson D. Eutectic-based ionic liquids with metal-containing anions and cations. *Chem - A Eur J* [Internet]. 2007 Jul 27 [cited 2021 Oct 29];13(22):6495–501. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/chem.200601738>
139. Abranches DO, Martins MAR, Silva LP, Schaeffer N, Pinho SP, Coutinho JAP. Phenolic hydrogen bond donors in the formation of non-ionic deep eutectic solvents: The quest for type v des. *Chem Commun* [Internet]. 2019 Aug 22 [cited 2021 Oct 29];55(69):10253–

6. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/cc/c9cc04846d>
140. Makoś P, Słupek E, Gębicki J. Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques—A review. *Microchem J*. 2020 Jan 1;152:104384.
141. Hammond OS, Bowron DT, Edler KJ. The Effect of Water upon Deep Eutectic Solvent Nanostructure: An Unusual Transition from Ionic Mixture to Aqueous Solution. *Angew Chemie - Int Ed [Internet]*. 2017 Aug 7 [cited 2021 Nov 3];56(33):9782–5. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.201702486>
142. Li X, Row KH. Development of deep eutectic solvents applied in extraction and separation. *J Sep Sci [Internet]*. 2016 Sep 1 [cited 2021 Nov 3];39(18):3505–20. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jssc.201600633>
143. Florindo C, Oliveira FS, Rebelo LPN, Fernandes AM, Marrucho IM. Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids. *ACS Sustain Chem Eng [Internet]*. 2014 Oct 6 [cited 2021 Nov 3];2(10):2416–25. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/sc500439w>
144. Francisco M, Van Den Bruinhorst A, Kroon MC. Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents. *Angew Chemie - Int Ed*. 2013;52(11):3074–85.
145. Alkhatib III, Bahamon D, Llovel F, Abu-Zahra MRM, Vega LF. Perspectives and guidelines on thermodynamic modelling of deep eutectic solvents. *J Mol Liq [Internet]*. 2020;298:112183. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112183>
146. Liu Y, Friesen JB, McAlpine JB, Lankin DC, Chen SN, Pauli GF. Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J Nat Prod*. 2018;81(3):679–90.
147. Scelsi E, Angelini A, Pastore C. Deep Eutectic Solvents for the Valorisation of Lignocellulosic Biomasses towards Fine Chemicals. *Biomass [Internet]*. 2021 Jul 12 [cited 2022 Apr 20];1(1):29–59. Available from: <https://www.mdpi.com/2673-8783/1/1/3/htm>
148. Abbott AP, Harris RC, Ryder KS, D’Agostino C, Gladden LF, Mantle MD. Glycerol eutectics as sustainable solvent systems. *Green Chem [Internet]*. 2011 Jan 10 [cited 2021 Dec 2];13(1):82–90. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2011/gc/c0gc00395f>
149. Alonso D, Baeza A, Chinchilla R, Gómez Lucas C, Guillena G, Maset X, et al. Mezclas eutécticas como alternativa sostenible a los disolventes convencionales en Química Orgánica. *An la Real Soc Española Química*. 2018;114(2):79–87.
150. Martins MAR, Pinho SP, Coutinho JAP. Insights into the Nature of Eutectic and Deep

- Eutectic Mixtures. *J Solution Chem.* 2019 Jul 31;48(7):962–82.
151. El Achkar T, Fourmentin S, Greige-Gerges H. Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds. *J Mol Liq.* 2019 Aug 15;288:111028.
 152. Kalhor P, Ghandi K. Deep eutectic solvents for pretreatment, extraction, and catalysis of biomass and food waste. *Molecules.* 2019;24(22).
 153. Du C, Zhao B, Chen XB, Birbilis N, Yang H. Effect of water presence on choline chloride-2urea ionic liquid and coating platings from the hydrated ionic liquid. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Jul 6 [cited 2021 Nov 4];6(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep29225>
 154. Lim WL, Gunny AAN, Kasim FH, AlNashef IM, Arbain D. Alkaline deep eutectic solvent: a novel green solvent for lignocellulose pulping. *Cellulose* [Internet]. 2019;26(6):4085–98. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02346-8>
 155. Tan YT, Chua ASM, Ngoh GC. Deep eutectic solvent for lignocellulosic biomass fractionation and the subsequent conversion to bio-based products – A review. *Bioresour Technol* [Internet]. 2020;297(November 2019). Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852419317523?casa_token=mxuq57IXJZcAAAAA:lxULtwAN1rhgVwmvYjM-bTREtBoTzGP87X5L6s0fv4Qm68eORTx6i5U6S7ioVJ3jXckLdw0kSxc
 156. APROMAR. *Apromar Informe acuicultura 2019.* 2019;
 157. Fisher RA, Dupaul B. *A Fisherman’s Guide: Getting the Most Out of Monkfish* A Fisherman’s Guide: Getting the Most Out of Monkfish. *Mar Resour Advis* [Internet]. 1990 [cited 2022 May 23];37:7. Available from: <http://dx.doi.org/>
 158. Vasco G del P. *Manipulación de la pesca del día en embarcaciones de red de enmalle* [Internet]. [cited 2022 May 23]. Available from: https://www.euskadi.eus/contenidos/informacion/coleccion_itsaso/eu_dapa/adjuntos/manipulacion_pesca.pdf
 159. Organización de Productores de Buques Congeladores de Merlúcidos Cefalópodos y Especies varias. *Guía de Buenas Prácticas de Higiene para Buques Palengreros y Buques Factoría Congeladores.* 2017.
 160. Pacetti D, Alberti F, Boselli E, Frega NG. Characterisation of furan fatty acids in Adriatic fish. *Food Chem.* 2010 Sep 1;122(1):209–15.
 161. Yara-Varón E, Fabiano-Tixier AS, Balcells M, Canela-Garayoa R, Bily A, Chemat F. Is it possible to substitute hexane with green solvents for extraction of carotenoids? A

- theoretical versus experimental solubility study. *RSC Adv.* 2016;6(33):27750–9.
162. Chemat F, Vian MA, Ravi HK, Khadhraoui B, Hilali S, Perino S, et al. Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects. *Molecules.* 2019;24(16).
 163. Yara-Varón E, Selka A, Fabiano-Tixier AS, Balcells M, Canela-Garayoa R, Bily A, et al. Solvent from forestry biomass. Pinane a stable terpene derived from pine tree byproducts to substitute n-hexane for the extraction of bioactive compounds. *Green Chem.* 2016;18(24):6596–608.
 164. FAO F and AO of the U, States. The future of food and agriculture: trends and challenges [Internet]. Vol. 4, The future of food and agriculture: trends and challenges. 2014. 1951–1960 p. Available from: <https://www.fao.org/3/i6583e/i6583e.pdf>
 165. Sillanpää M, Ncibi C. The Circular Economy: Case Studies about the Transition from the Linear Economy [Internet]. Academic Press; 2019. 1–334 p. Available from: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128152676/the-circular-economy>
 166. Cascant MM, Breil C, Garrigues S, de la Guardia M, Fabiano-Tixier AS, Chemat F. A green analytical chemistry approach for lipid extraction: computation methods in the selection of green solvents as alternative to hexane. *Anal Bioanal Chem.* 2017;409(14):3527–39.
 167. Sicaire AG, Vian M, Fine F, Joffre F, Carré P, Tostain S, et al. Alternative bio-based solvents for extraction of fat and oils: Solubility prediction, global yield, extraction kinetics, chemical composition and cost of manufacturing. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2015;16(4):8430–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25884332/>
 168. Méndez J, Ramon C, Mercè T. Kinetic study of palmitic acid esterification catalyzed by *Rhizopus oryzae* resting cells. *Acta Biológica Colomb.* 2009;14(1):161–72.
 169. Gallart-Sirvent P, Yara E, Villorbina G, Balcells M, Sala N, Canela-Garayoa R. Recycling *Rhizopus oryzae* resting cells as biocatalyst to prepare near eutectic palmitic-stearic acid mixtures from non-edible fat. *J Mol Catal B Enzym* [Internet]. 2016;134:172–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.11.015>
 170. Fang Y, Gu S, Liu S, Zhang J, Ding Y, Liu J. Extraction of oil from high-moisture tuna liver by subcritical dimethyl ether: Feasibility and optimization by the response surface method. *RSC Adv.* 2018;8(5):2723–32.
 171. Routray W, Dave D, Ramakrishnan V V., Murphy W. Production of High Quality Fish Oil by Enzymatic Protein Hydrolysis from Cultured Atlantic Salmon By-Products: Investigation on Effect of Various Extraction Parameters Using Central Composite

- Rotatable Design. *Waste and Biomass Valorization*. 2018;9(11):2003–14.
172. Ciriminna R, Scurria A, Fabiano-Tixier AS, Lino C, Avellone G, Chemat F, et al. Omega-3 Extraction from Anchovy Fillet Leftovers with Limonene: Chemical, Economic, and Technical Aspects. *ACS Omega*. 2019;4(13):15359–63.
 173. Nestor G, Bankefors J, Schlechtriem C, Brännäs E, Pickova J, Sandström C. High-resolution 1H magic angle spinning nmr spectroscopy of intact arctic char (*Salvelinus Alpinus*) muscle. quantitative analysis of n-3 fatty acids, EPA and DHA. *J Agric Food Chem*. 2010;58(20):10799–803.
 174. Catrin TE, Brecker L, Wagner KH. 1H NMR spectroscopy as tool to follow changes in the fatty acids of fish oils. *Eur J Lipid Sci Technol* [Internet]. 2008;110(2):141–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ejlt.200700150>
 175. Bratu A, Mihalache M, Hanganu A, Chira NA, Todașcă MC, Roșca S. Quantitative determination of fatty acids from fish oils using GC-MS method and 1H-NMR spectroscopy. *UPB Sci Bull Ser B Chem Mater Sci*. 2013;75(2):23–32.
 176. Gavahian M, Mousavi Khaneghah A, Lorenzo JM, Munekata PES, Garcia-Mantrana I, Collado MC, et al. Health benefits of olive oil and its components: Impacts on gut microbiota antioxidant activities, and prevention of noncommunicable diseases. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2019;88(March):220–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.008>
 177. Djoussé L, Matsumoto C, Hanson NQ, Weir NL, Tsai MY, Gaziano JM. Plasma cis-vaccenic acid and risk of heart failure with antecedent coronary heart disease in male physicians. *Clin Nutr* [Internet]. 2014;33(3):478–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2013.07.001>
 178. Field CJ, Blewett HH, Proctor S, Vine D. Human health benefits of vaccenic acid. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009;34(5):979–91.
 179. Sissener NH, Ørnsrud R, Sanden M, Frøyland L, Remø S, Lundebye AK. Erucic acid (22:1n-9) in fish feed, farmed, and wild fish and seafood products. *Nutrients*. 2018;10(10):1–12.
 180. Khoddami A. Quality and fatty acid profile of the oil extracted from fish waste (head, intestine and liver) (*Euthynnus affinis*). *African J Biotechnol*. 2012;11(7).
 181. Salih AW, Najim SM, Al-Noor JM. Some Physical, Chemical and Sensory Properties of Fish Oil Extracted from Fish Wastes by Physical and Chemical Methods. *Biol Appl Environ Res* [Internet]. 2021 [cited 2021 Nov 20];5(1):152–62. Available from: <https://doi.org/10.51304/baer.2021.5.1.152>

182. Hofmann T, Barth M, Meister A, Kastiris PL, Schmidt C. Thin-Layer Chromatography and Coomassie Staining of Phospholipids for Fast and Simple Lipidomics Sample Preparation. *Anal Sens.* 2021;1(4):171–9.
183. Byun HG, Eom TK, Jung WK, Kim SK. Characterization of fish oil extracted from fish processing by-products. *J Food Sci Nutr.* 2008;13(1):7–11.
184. Axelsson M, Gentili F. A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. *PLoS One.* 2014;9(2):17–20.
185. de Jesus SS, Filho RM. Recent advances in lipid extraction using green solvents. *Renew Sustain Energy Rev.* 2020;133(September).
186. Castejón N, Señoráns FJ. Strategies for Enzymatic Synthesis of Omega-3 Structured Triacylglycerols from *Camelina sativa* Oil Enriched in EPA and DHA. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2019;121(5).
187. Moharana TR, Byreddy AR, Puri M, Barrow C, Rao NM. Selective enrichment of omega-3 fatty acids in oils by phospholipase A1. *PLoS One.* 2016;11(3):1–14.
188. Xu Y, Wang D, Mu XQ, Zhao GA, Zhang KC. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinesis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase. *J Mol Catal B Enzym.* 2002;18(1–3):29–37.
189. Aarthy M, Saravanan P, Ayyadurai N, Gowthaman MK, Kamini NR. A two step process for production of omega 3-polyunsaturated fatty acid concentrates from sardine oil using *Cryptococcus* sp. MTCC 5455 lipase. *J Mol Catal B Enzym* [Internet]. 2016;125:25–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.12.013>
190. Fraga ME, Santana DMN, Gatti MJ, Direito GM, Cavaglieri LR, Rosa CAR. Characterization of *Aspergillus* species based on fatty acid profiles. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(6):540–4.
191. Asci F, Aydin B, Akkus GU, Unal A, Erdogmus SF, Korcan SE, et al. Fatty acid methyl ester analysis of *Aspergillus fumigatus* isolated from fruit pulps for biodiesel production using GC-MS spectrometry. *Bioengineered* [Internet]. 2020;11(1):408–15. Available from: <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1739379>
192. Schuchardt JP, Neubronner J, Kressel G, Merkel M, von Schacky C, Hahn A. Moderate doses of EPA and DHA from re-esterified triacylglycerols but not from ethyl-esters lower fasting serum triacylglycerols in statin-treated dyslipidemic subjects: Results from a six month randomized controlled trial. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* [Internet]. 2011;85(6):381–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2011.07.006>

193. Ashjari M, Mohammadi M, Badri R. Selective concentration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil with immobilized/stabilized preparations of *Rhizopus oryzae* lipase. *J Mol Catal B Enzym* [Internet]. 2015;122:147–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.08.017>
194. Gallart-Sirvent P, Martín M, Villorbina G, Balcells M, Solé A, Barrenche C, et al. Fatty acid eutectic mixtures and derivatives from non-edible animal fat as phase change materials. *RSC Adv* [Internet]. 2017 May 3 [cited 2021 Nov 30];7(39):24133–9. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/ra/c7ra03845c>
195. Nogueira D, Oliveira RR, Rocha AB. Glycerol chlorination reaction mechanism. *Int J Chem Kinet*. 2021;53(3):369–78.
196. Luo ZH, You XZ, Li HR. Direct preparation kinetics of 1,3-dichloro-2-propanol from glycerol using acetic acid catalyst. *Ind Eng Chem Res* [Internet]. 2009 [cited 2021 Jul 13];48(1):446–52. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
197. U.S. Department of Health and Human Services. Review of Toxicological Literature Review of Toxicological Literature [Internet]. National Toxicology Program. 2004. Available from: https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/dichloropropanol_508.pdf
198. Richey WF. Chlorohydrins. *Kirk-Othmer Encycl Chem Technol* [Internet]. 2000 Dec 4 [cited 2021 Jul 13]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/0471238961.0308121518090308.a01>
199. Hou X, Fu Y, Zhu X, Yin H, Wang A. Chlorination of glycerol with HCl to 1,3-dichloro-2-propanol catalyzed by aliphatic carboxylic acids. *ASIA-PACIFIC J Chem Eng*. 2015;10:626–32.
200. Raub S, Steffen A, Kämper A, Marian CM. AIScore — Chemically Diverse Empirical Scoring Function Employing Quantum Chemical Binding Energies of Hydrogen-Bonded Complexes. *J Chem Inf Model* [Internet]. 2008 [cited 2021 Jun 15];48(7):1492–510. Available from: <https://doi.org/10.1021/ci7004669>
201. Lu I-LL, Mahindroo N, Liang P-HH, Peng Y-HH, Kuo C-JJ, Tsai K-CC, et al. Structure-Based Drug Design and Structural Biology Study of Novel Nonpeptide Inhibitors of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Main Protease. *J Med Chem* [Internet]. 2006 [cited 2021 Jun 15];49(17):5154–61. Available from: <https://doi.org/10.1021/jm060207o>
202. Beckett MA, Bland CC, Sukumar Varma K. A ¹¹B NMR study of zwitterionic and cationic

- monoborate complexes with cationic 1,2-diol ligands. *Polyhedron*. 2008;27(9–10):2226–30.
203. Kohli R. Applications of ionic liquids in removal of surface contaminants. In: *Developments in Surface Contamination and Cleaning: Applications of Cleaning Techniques Volume 11*. Elsevier; 2018. p. 619–80.
204. Hammond OS, Bowron DT, Edler KJ. Liquid structure of the choline chloride-urea deep eutectic solvent (reline) from neutron diffraction and atomistic modelling. *Green Chem* [Internet]. 2016 May 3 [cited 2022 Feb 19];18(9):2736–44. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/gc/c5gc02914g>
205. Schwöbel J, Ebert R-U, Kühne R, Schüürmann G. Prediction of the Intrinsic Hydrogen Bond Acceptor Strength of Organic Compounds by Local Molecular Parameters. *J Chem Inf Model* [Internet]. 2009 Apr 27 [cited 2021 Jun 15];49(4):956–62. Available from: <https://doi.org/10.1021/ci900040z>
206. Schwöbel J, Ebert RU, Kühne R, Schüürmann G. Prediction of the intrinsic hydrogen bond acceptor strength of chemical substances from molecular structure. *J Phys Chem A* [Internet]. 2009;113(37):10104–12. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jp904812b>
207. Naseem Z, Shehzad RA, Ihsan A, Iqbal J, Zahid M, Pervaiz A, et al. Theoretical investigation of supramolecular hydrogen-bonded choline chloride-based deep eutectic solvents using density functional theory. *Chem Phys Lett* [Internet]. 2021 Apr 16 [cited 2022 Feb 18];769:138427. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000926142100110X?casa_token=k5PHHGGu0DEAAAAA:wsM-LbRK8wKM5tqJHsBZxEAnL-eFM0H4npLCeZIFVSe56REAugAfDhXEI801_ptdoB-WJKHzIZI
208. García Calvo-Florez F. Parametros Para El Analisis De Las Reacciones En Química. *An la Real Soc Española Química*. 2009;105(1):42–9.
209. Sigma-Aldrich. IR Spectrum Table [Internet]. Sigma-Aldrich. 2019 [cited 2021 Dec 21]. p. 1. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table>
210. Canela-Xandri A, Villorbina G, Balcells M, Fernández-Francos X, Cabeza LF, Canela-Garayoa R. Synthesis and thermophysical characterization of fatty amides for thermal energy storage. *Molecules*. 2019;24(20):1–10.

211. Banjare MK, Behera K, Satnami ML, Pandey S, Ghosh KK. Self-assembly of a short-chain ionic liquid within deep eutectic solvents. *RSC Adv* [Internet]. 2018 Feb 20 [cited 2022 Feb 22];8(15):7969–79. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/ra/c7ra13557b>
212. Torres P, Balcells M, Cequier E, Canela-Garayoa R. Effect of four novel bio-based DES (Deep Eutectic Solvents) on hardwood fractionation. *Molecules*. 2020;25(9).
213. Ghaedi H, Ayoub M, Sufian S, Lal B, Uemura Y. Thermal stability and FT-IR analysis of Phosphonium-based deep eutectic solvents with different hydrogen bond donors. *J Mol Liq*. 2017 Sep 1;242:395–403.
214. Chen Y, Yu D, Chen W, Fu L, Mu T. Water absorption by deep eutectic solvents. *Phys Chem Chem Phys* [Internet]. 2019 Jan 30 [cited 2021 Dec 16];21(5):2601–10. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/cp/c8cp07383j>
215. Ijardar SP, Singh V, Gardas RL. Revisiting the Physicochemical Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents. *Molecules* [Internet]. 2022;27:1368. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules27041368>
216. Ouellette RJ, Rawn JD. Amines and Amides. In: *Organic Chemistry* [Internet]. 2014. p. 803–42. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/ammonium-salt>
217. Kallenberger PA, Fröba M. Water harvesting from air with a hygroscopic salt in a hydrogel-derived matrix. *Commun Chem* [Internet]. 2018;1(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s42004-018-0028-9>
218. Monroe J, Barry M, DeStefano A, Aydogan Gokturk P, Jiao S, Robinson-Brown D, et al. Water Structure and Properties at Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2020;11:523–57.
219. Jahanbakhsh Bonab P, Rastkar Ebrahimzadeh A, Jahanbin Sardroodi J. Insights into the interactions and dynamics of a DES formed by phenyl propionic acid and choline chloride. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Mar 18 [cited 2022 Feb 19];11(1):1–18. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-85260-z>
220. Lee SH, Tahir PM, Lum WC, Tan LP, Bawon P, Park BD, et al. A review on citric acid as green modifying agent and binder for wood. *Polymers (Basel)* [Internet]. 2020;12(8):1–21. Available from: www.mdpi.com/journal/polymers
221. Umemura K, Sugihara O, Kawai S. Investigation of a new natural adhesive composed of citric acid and sucrose for particleboard. *J Wood Sci*. 2013;59(3):203–8.

222. Halpern JM, Urbanski R, Weinstock AK, Iwig DF, Mathers RT, Von Recum HA. A biodegradable thermoset polymer made by esterification of citric acid and glycerol. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2014;102(5):1467–77.
223. Duereh A, Sato Y, Smith RL, Inomata H. Analysis of the Cybotactic Region of Two Renewable Lactone-Water Mixed-Solvent Systems that Exhibit Synergistic Kamlet-Taft Basicity. *J Phys Chem B [Internet]*. 2016 [cited 2021 Dec 30];120(19):4467–81. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
224. Cui Y, Fulfer KD, Ma J, Weldeghiorghis TK, Kuroda DG. Solvation dynamics of an ionic probe in choline chloride-based deep eutectic solvents. *Phys Chem Chem Phys*. 2016;18(46):31471–9.
225. Choi H, Kang H, Park H. New solvation free energy function comprising intermolecular solvation and intramolecular self-solvation terms. *J Cheminform [Internet]*. 2013 Feb 4 [cited 2022 Feb 19];5(2):1–13. Available from: <https://jcheminf.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-2946-5-8>
226. Vaz ICM, Bastos M, Bernardes CES, Canongia Lopes JN, Santos LMNBF. Solvation of alcohols in ionic liquids-understanding the effect of the anion and cation. *Phys Chem Chem Phys*. 2018;20(4):2536–48.
227. Vilas M, Rocha MAA, Fernandes AM, Tojo E, Santos LMNBF. Novel 2-alkyl-1-ethylpyridinium ionic liquids: Synthesis, dissociation energies and volatility. *Phys Chem Chem Phys [Internet]*. 2015;17(4):2560–72. Available from: www.rsc.org/pccp
228. He Y, Zhu B, Inoue Y. Hydrogen bonds in polymer blends. Vol. 29, *Progress in Polymer Science (Oxford)*. Pergamon; 2004. p. 1021–51.
229. Eike DM, Brennecke JF, Maginn EJ. Predicting melting points of quaternary ammonium ionic liquids. *Green Chem [Internet]*. 2003 [cited 2022 Feb 15];5(3):323–8. Available from: <http://www.rsc.org/suppdata/gc/b3/b301217d/>
230. Pandey A, Rai R, Pal M, Pandey S. How polar are choline chloride-based deep eutectic solvents? *Phys Chem Chem Phys [Internet]*. 2014 [cited 2022 Feb 18];16(4):1559–68. Available from: www.rsc.org/pccp
231. Torres M, Balcells M, Sala N, Sanchis V, Canela R. Bactericidal and fungicidal activity of aspergillus ochraceus metabolites and some derivatives. *Pestic Sci [Internet]*. 1998;53(1):9–14. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/Bactericidal-and-fungicidal-activity-of-Aspergillus-Torres-Balcells/686af6e2fa13269f427737474ea9a2cb16dc2e30>

232. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc.* 2008;3(2):163–75.
233. Rodríguez-Juan E, López S, Abia R, J. G. Muriana F, Fernández-Bolaños J, García-Borrego A. Antimicrobial activity on phytopathogenic bacteria and yeast, cytotoxicity and solubilizing capacity of deep eutectic solvents. *J Mol Liq.* 2021 Sep 1;337:116343.
234. Chesney AM. The latent period in the growth of bacteria. *J Exp Med* [Internet]. 1916 [cited 2021 Dec 29];24(4):387–418. Available from: <http://rupress.org/jem/article-pdf/24/4/387/1174164/387.pdf>
235. Sánchez-García E, Castillo-Hernández SL, García-Palencia P. Actividad antimicrobiana. *Investig en plantas importancia médica* [Internet]. 2016;77–100. Available from: <https://www.omniascience.com/books/index.php/monographs/catalog/download/97/410/816-1?inline=1>
236. Tang B, Row KH. Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences. *Monatshefte fur Chemie* [Internet]. 2013 Aug 22 [cited 2021 Dec 3];144(10):1427–54. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00706-013-1050-3>
237. Shahbaz K, Baroutian S, Mjalli FS, Hashim MA, Alnashef IM. Densities of ammonium and phosphonium based deep eutectic solvents: Prediction using artificial intelligence and group contribution techniques. *Thermochim Acta.* 2012 Jan 10;527:59–66.
238. Siongco KR, Leron RB, Li MH. Densities, refractive indices, and viscosities of N,N-diethylethanol ammonium chloride-glycerol or -ethylene glycol deep eutectic solvents and their aqueous solutions. *J Chem Thermodyn.* 2013;65:65–72.
239. Shah D, Mjalli FS. Effect of water on the thermo-physical properties of Reline: An experimental and molecular simulation based approach. *Phys Chem Chem Phys* [Internet]. 2014 Oct 15 [cited 2021 Dec 2];16(43):23900–7. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/cp/c4cp02600d>
240. Lapeña D, Lomba L, Artal M, Lafuente C, Giner B. Thermophysical characterization of the deep eutectic solvent choline chloride:ethylene glycol and one of its mixtures with water. *Fluid Phase Equilib.* 2019;492:1–9.
241. Cardellini F, Tiecco M, Germani R, Cardinali G, Corte L, Roscini L, et al. Novel zwitterionic deep eutectic solvents from trimethylglycine and carboxylic acids: Characterization of their properties and their toxicity. *RSC Adv.* 2014;4(99):55990–6002.
242. Gabriele F, Chiarini M, Germani R, Tiecco M, Spreti N. Effect of water addition on choline

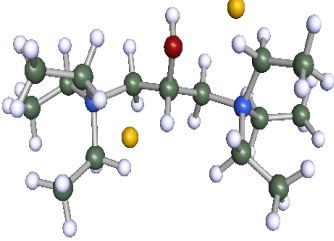
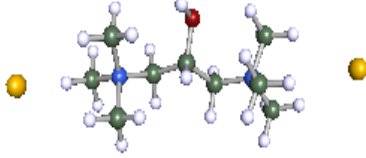
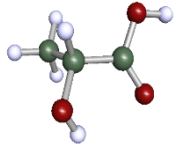
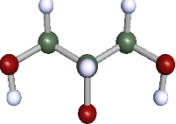
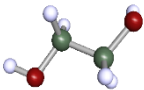
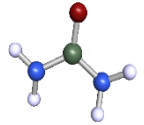
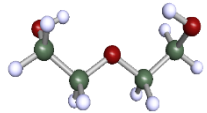
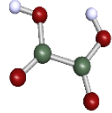
- chloride/glycol deep eutectic solvents: Characterization of their structural and physicochemical properties. *J Mol Liq* [Internet]. 2019;291:111301. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111301>
243. García G, Aparicio S, Ullah R, Atilhan M. Deep eutectic solvents: Physicochemical properties and gas separation applications. *Energy and Fuels*. 2015;29(4):2616–44.
244. Boisset A, Jacquemin J, Anouti M. Physical properties of a new Deep Eutectic Solvent based on lithium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide and N-methylacetamide as superionic suitable electrolyte for lithium ion batteries and electric double layer capacitors. *Electrochim Acta* [Internet]. 2013;102:120–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2013.03.150>
245. Sedghamiz MA, Raeissi S. Physical properties of deep eutectic solvents formed by the sodium halide salts and ethylene glycol, and their mixtures with water. *J Mol Liq* [Internet]. 2018;269:694–702. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.08.045>
246. Cao Y, Chen Y, Sun X, Zhang Z, Mu T. Water sorption in ionic liquids: Kinetics, mechanisms and hydrophilicity. *Phys Chem Chem Phys*. 2012;14(35):12252–62.
247. Hansen PE, Spanget-Larsen J. NMR and IR investigations of strong intramolecular hydrogen bonds. *Molecules* [Internet]. 2017 Mar 29 [cited 2022 Feb 23];22(4):552. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/4/552/htm>
248. Banno M, Ohta K, Yamaguchi S, Hirai S, Tominaga K. Vibrational Dynamics of Hydrogen-Bonded Complexes in Solutions Studied with Ultrafast Infrared Pump–Probe Spectroscopy. *Acc Chem Res* [Internet]. 2009;42(9):1259–69. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
249. Chromá R, Vilková M, Shepa I, Makoś-Chełstowska P, Andruch V. Investigation of tetrabutylammonium bromide-glycerol-based deep eutectic solvents and their mixtures with water by spectroscopic techniques. *J Mol Liq*. 2021 May 15;330:115617.
250. Tran PH, Thi Hang AH. Deep eutectic solvent-catalyzed arylation of benzoxazoles with aromatic aldehydes. *RSC Adv* [Internet]. 2018;8(20):11127–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C8RA01094C>
251. Scheiner S. Assessment of the presence and strength of H-bonds by means of corrected NMR. *Molecules*. 2016 Nov 1;21(11).
252. Marchel M, Cieśliński H, Boczkaj G. Deep eutectic solvents microbial toxicity: Current state of art and critical evaluation of testing methods. *J Hazard Mater* [Internet]. 2022

- Mar 5 [cited 2022 Feb 27];425:127963. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389421029320?casa_token=7EYg2s3ApaEAAAAA:-_39X4A8nYgwr-c1mgif0IZywwHBSKKSb41VsrG2HjumSYIqPSjzJNSQiI05u5OHyKodWEazA6U
253. Juneidi I, Hayyan M, Mohd Ali O. Toxicity profile of choline chloride-based deep eutectic solvents for fungi and *Cyprinus carpio* fish. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 2016;23(8):7648–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-6003-4>
 254. Mao S, Li K, Hou Y, Liu Y, Ji S, Qin H, et al. Synergistic effects of components in deep eutectic solvents relieve toxicity and improve the performance of steroid biotransformation catalyzed by *Arthrobacter simplex*. *J Chem Technol Biotechnol* [Internet]. 2018;93(9):2729–36. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389421029320?casa_token=7EYg2s3ApaEAAAAA:-_39X4A8nYgwr-c1mgif0IZywwHBSKKSb41VsrG2HjumSYIqPSjzJNSQiI05u5OHyKodWEazA6U
 255. Picazo JJ, Garcia-Rodríguez JA, Canton R, Gomes-Lus ML, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Avial C, et al. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2000;1–54.
 256. Wikene KO, Rukke HV, Bruzell E, Tønnesen HH. Investigation of the antimicrobial effect of natural deep eutectic solvents (NADES) as solvents in antimicrobial photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2022 Feb 27];171:27–33. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1011134417302865>
 257. Zhao D, Liao Y, Zhang ZD. Toxicity of ionic liquids. *Clean - Soil, Air, Water*. 2007;35(1):42–8.
 258. Mbous YP, Hayyan M, Hayyan A, Wong WF, Hashim MA, Looi CY. Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2017;35(2):105–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.006>
 259. Kudłak B, Owczarek K, Namieśnik J. Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review. Vol. 22, *Environmental Science and Pollution Research*. 2015. p. 11975–92.
 260. Badri KH, Juan CA, Hassan O, Mustapha WAW. Analytical approaches of determining

- monosaccharides from alkaline-treated palm fiber. *Malaysian J Anal Sci.* 2015;19(1):46–54.
261. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J Dairy Sci.* 1991;74(10):3583–97.
262. Van Soest, Peter J Robertson JB. Analysis of forages and fibrous foods. In: Animal Science Department., editor. Analysis of forages and fibrous foods. Cornell University; 1985. p. 202.
263. Jablonský M, Škulcová A, Kamenská L, Vrška M, Šima J. Deep Eutectic Solvents: Fractionation of Wheat Straw. *BioResources.* 2015;10(4):8039–47.
264. Zhang H, Lang J, Lan P, Yang H, Lu J, Wang Z. Study on the dissolution mechanism of cellulose by ChCl-based deep eutectic solvents. *Materials (Basel).* 2020;13(2):1–12.
265. Zhou M, Fakayode OA, Ahmed Yagoub AEG, Ji Q, Zhou C. Lignin fractionation from lignocellulosic biomass using deep eutectic solvents and its valorization. *Renew Sustain Energy Rev.* 2022 Mar 1;156:111986.
266. De D, Naga Sai MS, Aniya V, Satyavathi B. Strategic biorefinery platform for green valorization of agro-industrial residues: A sustainable approach towards biodegradable plastics. *J Clean Prod [Internet].* 2021 Mar 25 [cited 2022 Apr 22];290:125184. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652620352288>
267. Bhatia SK, Jagtap SS, Bedekar AA, Bhatia RK, Patel AK, Pant D, et al. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresour Technol [Internet].* 2020 Mar 1 [cited 2022 Apr 20];300:1–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122724>
268. Pereira PHF, Ornaghi HL, Arantes V, Cioffi MOH. Effect of chemical treatment of pineapple crown fiber in the production, chemical composition, crystalline structure, thermal stability and thermal degradation kinetic properties of cellulosic materials. *Carbohydr Res.* 2021 Jan 1;499:108227.

ANEXOS

Tabla A1. Estructuras moleculares más descritas en esta Memoria.

| N° | Nombre de la Molécula | Figura |
|----|---|---|
| 1 | Cloruro de 1,3 (bis)triethylamonium-2-propanol |  |
| 2 | Cloruro de 1,3 (bis)trimetilamonium-2-propanol |  |
| 3 | Ácido láctico |  |
| 4 | Glicerol |  |
| 5 | Etilenglicol |  |
| 6 | Urea |  |
| 7 | Dietilenglicol |  |
| 8 | Ácido oxálico |  |

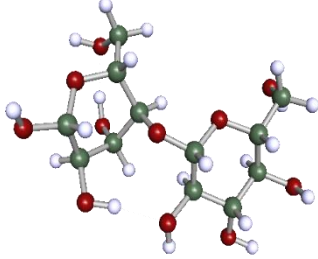
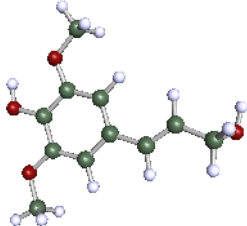
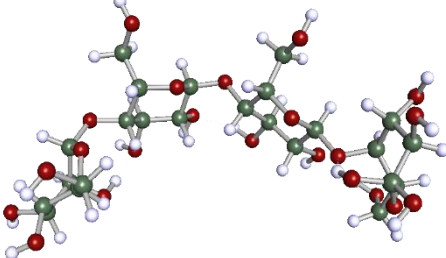
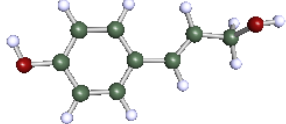
| | | |
|----|--------------------|---|
| 9 | Celubiosa |  |
| 10 | Alcohol Sinapílico |  |
| 11 | Celulotetraosa |  |
| 12 | Alcohol cumarílico |  |

Tabla A2. Predicción obtenida con el COSMO-RS para el estudio de la solubilidad del aceite de hígado de rape (AHR) en distintos solventes (datos obtenidos del software).

| Solvente | TAG 1 | | TAG 2 | | TAG 3 | | TAG 4 | |
|---|---------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|--------------------|-------------|
| | log10(x _solub) | w_sol ub | log10(x _solub) | w_sol ub | log10(x _solub) | w_sol ub | log10(x _solub) | w_s olub |
| 2-Metiltetrahidrofuran (2MTHF) | 0,0 | 0 | 0,0 | NA | 0,0 | NA | 0,0 | NA |
| Ciclopentil metil-eter (CPME) | 0,0 | 0 | 0,0 | NA | 0,0 | NA | 0,0 | NA |
| Dimetilcarbonato (DMC) | - 0,9720 8741 | 1,165 32321 | - 0,8726 4801 | 1,511 58846 | - 0,6799 0929 | 2,731 78005 | 0,0 | NA |
| Limoneno | 0,0 | NA | 0,0 | NA | 0,0 | NA | 0,0 | NA |
| Cloroformo:Metanol (1:2) | - 1,7546 657 | 0,251 77045 | - 1,5750 6666 | 0,384 24251 | - 1,4406 081 | 0,560 24456 | 0,0 | NA |
| Composición de TAG's: TAG1=R1(C16:0); R2(C22:6); R3(C16:0). TAG2=R1(C18:1); R2(C20:5); R3(C16:0). TAG3 = R1(C18:1); R2(C22:6); R3(C18:1). TAG4 = R1(C22:6); R2(C22:6); R3 (C22:6) | | | | | | | | |
| Composición base del Aceite de hígado de Rape: C16:0 = 18,7 %, C18:1 = 15,1 %, C20:5 = 8,7 %, C22:6 = 21,6 % | | | | | | | | |

Tabla A3. Asignaciones de las señales más comunes de los grupos funcionales y enlaces de los compuestos de los espectros de FT-IR en relación a la longitud de onda (cm^{-1}) (167,194,209–212).

| <i>Grupo funcional o enlace</i> | <i>Intervalo de frecuencia de transmitancia/absorción cm^{-1}</i> | | | |
|---------------------------------|---|-----------|-----------|-----------|
| <i>O-H</i> | 3650-3590 | | | |
| <i>N-H</i> | 3500-3300 | 1650-1590 | 900-650 | |
| <i>=C-H</i> | 3100-3070 | 1420-1410 | 900-880 | |
| <i>=C-H</i> | 3100-3000 | 2000-1600 | | |
| <i>C-H</i> | 2900-2700 | 1440-1320 | | |
| <i>=-CH₃</i> | 2880-2860 | 2970-2950 | 1380-1370 | 1470-1430 |
| <i>O-H</i> | 2700-2500 | 1320-1210 | 950-900 | |
| <i>C≡C</i> | 2140-2100 | | | |
| <i>C=O</i> | 1750-1700 | | | |
| <i>C=C</i> | 1600-1500 | | | |
| <i>C-N</i> | 1340-1250 | | | |
| <i>C-O-C</i> | 1200-1180 | | | |
| <i>-C-H</i> | 770-730 | | | |

Tabla A4. Datos completos descargados del software COSMO-RS de la predicción obtenida para el estudio teórico de los DES's como solvente de fraccionamiento de biomasa lignocelulósica.

| Solvent | R a t i o | Glucose (Cellulose) | | | | Cellutetraose (Cellulose) | | | | p-coumaryl alcohol (Lignin) | | | | Sinapyl alcohol (lignin) | | | |
|-----------------------|-----------------------|---------------------|--------|--|--------|---------------------------|--------|--|------|-----------------------------|--------|--|------|--------------------------|--------|--|------|
| | | Log10(X-RS) | | Proba b i l i t y (%) | | Log10(X-RS) | | Proba b i l i t y (%) | | Log10(X-RS) | | Proba b i l i t y (%) | | Log10(X-RS) | | Proba b i l i t y (%) | |
| | | 60 °C | 120 °C | 6 °C | 1 °C | 60 °C | 120 °C | 6 °C | 1 °C | 60 °C | 120 °C | 6 °C | 1 °C | 60 °C | 120 °C | 6 °C | 1 °C |
| S a l t 1 | Lactic acid | 1 | - | - | 1,0 | 0,0 | 7,01 | 0,4 | 0,3 | - | - | 1,0 | 0,0 | - | - | 1,0 | 0,0 |
| | | : | 1,7 | 3,6 | 8,0 | 0,0 | 856 | 735 | 0,3 | 0,8 | 2,5 | 3,2 | 2,0 | 1,9 | 3,2 | 0,0 | 0,0 |
| | 1 | 262 | 733 | 8,8 | 2,2 | 123 | 091 | 0,6 | 795 | 997 | 2,5 | 5,5 | 677 | 875 | 8,8 | 5,5 | |
| | | 313 | 036 | | | | 3 | 0,1 | 903 | 834 | 0,0 | | 504 | 704 | | | |
| | | 3 | | | | | | | 9 | 8 | | | 7 | 2 | | | |
| | S a l t 2 | | - | - | 1,0 | 0,0 | 6,80 | 0,2 | 0,5 | - | - | 5,0 | 0,0 | - | - | 0,0 | 0,0 |
| | | 1,7 | 3,7 | 6,0 | 0,0 | 573 | 777 | 0,2 | 1,2 | 2,9 | 7,1 | 2,4 | 3,7 | 3,3 | 3,0 | 3,0 | |
| | | 766 | 269 | 7,7 | 2,2 | 364 | 774 | 0,7 | 434 | 109 | 1,2 | 852 | 592 | 3,3 | 3,2 | 3,2 | |
| | | 456 | 615 | | | | 4 | 0,5 | 386 | 842 | | 674 | 708 | | | | |
| | | 6 | 4 | | | | | | 2 | 9 | | 5 | 4 | | | | |
| S a l t 1 | 0 | - | - | 0,0 | 0,0 | 5,01 | - | 0,2 | - | - | 4,0 | 0,0 | - | - | 0,0 | 0,0 | |
| | 2,4 | 4,0 | 3,0 | 0,0 | 577 | 0,6 | 0,4 | 1,3 | 2,8 | 3,1 | 2,0 | 3,3 | 3,8 | 8,0 | 8,0 | | |
| | 415 | 626 | 6,6 | 1,1 | 082 | 044 | 0,8 | 658 | 710 | 1,3 | 931 | 224 | 1,1 | 5,5 | 1,5 | | |
| | 851 | 998 | | | | 616 | 1,6 | 953 | 969 | | 998 | 682 | | | | | |
| | 9 | 8 | | | | 2 | | 8 | 5 | | 1 | 5 | | | | | |
| S a l t 2 | | - | - | 0,0 | 0,0 | 5,36 | - | 0,3 | - | - | 3,0 | 0,0 | - | - | 0,0 | 0,0 | |
| | 2,3 | 4,0 | 5,0 | 0,0 | 108 | 0,4 | 0,4 | 1,4 | 3,0 | 2,1 | 2,3 | 3,5 | 4,4 | 4,0 | 4,0 | | |
| | 025 | 016 | 0,0 | 0,1 | 244 | 628 | 0,4 | 859 | 059 | 7,0 | 747 | 895 | 2,2 | 3,3 | 3,3 | | |
| | 732 | 845 | | | | 652 | 0,5 | 896 | 184 | | 991 | 270 | | | | | |
| | 8 | 3 | | | | 1 | | 2 | 4 | | 7 | 9 | | | | | |
| S a l t 1 | 1 | - | - | 1,0 | 0,0 | 9,41 | 1,9 | 0,1 | - | - | 5,0 | 0,0 | - | - | 2,0 | 0,0 | |
| | 0,8 | 3,1 | 4,0 | 0,0 | 313 | 171 | 0,2 | 0,3 | 2,2 | 0,5 | 1,6 | 3,0 | 3,3 | 3,0 | 3,0 | | |
| | 517 | 446 | 0,0 | 0,7 | 394 | 947 | 0,0 | 005 | 296 | 0,9 | 299 | 952 | 4,4 | 8,8 | 4,4 | | |
| | 708 | 156 | 7,7 | | | 0 | 0,0 | 796 | 369 | 5,5 | 907 | 852 | | | | | |
| | 4 | 5 | | | | | | 9 | 5 | | 1 | 4 | | | | | |
| S a l t 2 | | - | - | 5,0 | 0,0 | 8,23 | 1,1 | 0,7 | - | - | 1,0 | 0,0 | - | - | 0,0 | 0,0 | |
| | 1,2 | 3,4 | 5,0 | 0,0 | 415 | 193 | 0,6 | 0,9 | 2,7 | 0,1 | 2,4 | 3,8 | 3,3 | 3,0 | 3,0 | | |
| | 563 | 171 | 4,4 | 4,4 | 336 | 144 | 0,0 | 614 | 598 | 9,7 | 592 | 208 | 5,5 | 2,2 | 2,2 | | |
| | 549 | 954 | | | | 4 | 0,0 | 235 | 550 | 3,3 | 386 | 886 | | | | | |
| | 3 | 7 | | | | | | 2 | 6 | | | 1 | | | | | |
| S a l t 1 | 0 | - | - | 0,0 | 0,0 | 4,23 | - | 0,9 | - | - | 2,0 | 0,0 | - | - | 1,0 | 0,0 | |
| | 2,7 | 4,2 | 2,0 | 0,0 | 302 | 1,0 | 0,3 | 1,6 | 2,9 | 5,1 | 1,8 | 3,1 | 3,3 | 3,0 | 3,0 | | |
| | 066 | 152 | 0,0 | 0,1 | 036 | 291 | 0,5 | 028 | 898 | 0,0 | 873 | 645 | 0,0 | 0,7 | 0,7 | | |
| | 878 | 759 | | | | 593 | 6,6 | 925 | 109 | | 584 | 497 | | | | | |
| | 8 | 8 | | | | 5 | | 5 | | | 8 | 7 | | | | | |
| S 2 | | NA | NA | N A | N A | NA | NA | N A | NA | NA | NA | NA | NA | NA | N A | N A | |
| S a l t 1 | Glyce rol | 1 | - | - | 7,0 | 0,0 | 8,71 | 1,7 | 0,1 | - | - | 5,0 | 0,0 | - | - | 2,0 | 0,0 |
| | | : | 1,1 | 3,2 | 5,0 | 0,0 | 702 | 314 | 0,8 | 0,3 | 2,1 | 0,6 | 1,5 | 2,9 | 9,9 | 9,9 | |
| | 1 | 209 | 320 | 7,7 | 6,6 | 603 | 233 | 0,6 | 000 | 791 | 1,6 | 281 | 606 | 6,6 | 6,6 | | |
| | | 763 | 117 | | | | 6 | 0,0 | 537 | 913 | 1,1 | 296 | 598 | | | | |
| | | 4 | 3 | | | | | | 5 | 3 | | 2 | 8 | | | | |
| S a l t 2 | | - | - | 4,0 | 0,0 | 8,78 | 1,6 | 0,2 | - | - | 1,0 | 0,0 | - | - | 0,0 | 0,0 | |
| | | 1,3 | 3,3 | 8,0 | 0,0 | 752 | 746 | 0,1 | 0,7 | 2,5 | 7,2 | 2,1 | 3,4 | 7,7 | 7,7 | | |
| | | 137 | 728 | 6,6 | 4,4 | 814 | 444 | 0,2 | 581 | 415 | 4,9 | 212 | 712 | 6,6 | 6,6 | | |
| | | 333 | 224 | | | | 2 | 0,0 | 873 | 951 | 5,5 | 256 | 115 | | | | |
| | | 7 | 3 | | | | | | 8 | 3 | | 4 | 2 | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-----------------------|-----|-----|----|----|------|-----|----|----|-----|-----|----|----|-----|-----|----|----|
| S a l t 1 | 0 : 5 : 1 | - | - | 2, | 0, | 7,24 | 0,8 | 0, | 1 | - | - | 2 | 0, | - | - | 1, | 0, |
| | | 1,6 | 3,5 | 2 | 0 | 000 | 354 | 0 | 4, | 0,6 | 2,4 | 1, | 3 | 1,7 | 3,0 | 8 | 0 |
| S a l t 2 | 5 : 1 | 583 | 626 | 0 | 3 | 367 | 144 | 0 | 6 | 746 | 136 | 1 | 9 | 249 | 600 | 8 | 9 |
| | | 609 | 079 | | | | 9 | 0 | 1 | 428 | 504 | 5 | | 38 | 887 | 1 | |
| S a l t 1 | 1 : 0 : 5 | - | - | 3 | 0, | 10,3 | 2,7 | 0, | 0, | 0,0 | - | 8 | 1, | - | - | 5, | 0, |
| | | 0,5 | 2,8 | 1, | 1 | 813 | 703 | 0 | 1 | 928 | 1,9 | 0, | 2 | 1,2 | 2,8 | 2 | 1 |
| S a l t 2 | 5 : 1 | 072 | 444 | 1 | 4 | 965 | 044 | 0 | 7 | 015 | 170 | 7 | 1 | 773 | 127 | 8 | 5 |
| | | 571 | 609 | 0 | | 3 | 3 | 0 | | 7 | 727 | 6 | | 362 | 493 | | |
| S a l t 1 | 0 : 2 : 1 | - | - | 0, | 0, | 6,03 | 0,1 | 0, | 7 | - | - | 9, | 0, | - | - | 1, | 0, |
| | | 0,9 | 3,1 | 1, | 0 | 190 | 795 | 0 | 6 | 0,5 | 2,4 | 6, | 3 | 2,1 | 3,5 | 7 | 0 |
| S a l t 2 | 5 : 1 | 440 | 540 | 3 | 7 | 411 | 873 | 0 | 6 | 772 | 539 | 4 | 5 | 103 | 379 | 8 | 3 |
| | | 343 | 631 | 8 | | | 9 | 0 | | 785 | 197 | 7 | | 561 | 730 | | |
| S a l t 1 | 0 : 2 : 1 | - | - | 8, | 0, | 8,70 | 1,6 | 0, | 2, | - | - | 8, | 0, | - | - | 0, | 0, |
| | | 2,0 | 3,8 | 8 | 0 | 997 | 100 | 0 | 7, | 1,0 | 2,6 | 5 | 2 | 1,8 | 3,1 | 4 | 0 |
| S a l t 2 | 5 : 1 | 887 | 282 | 2 | 1 | 729 | 088 | 0 | 6 | 181 | 184 | 9 | 4 | 535 | 087 | 0 | 8 |
| | | 355 | 517 | | | 1 | | 0 | 2 | 778 | 570 | | | 346 | 751 | | |
| S a l t 1 | 1 : 1 | NA | NA | N | N | NA | NA | N | N | NA | NA | N | N | NA | NA | N | N |
| | | NA | NA | A | A | NA | NA | A | A | NA | NA | A | A | NA | NA | A | A |
| S a l t 1 | 1 : 1 | - | - | 8, | 0, | 8,70 | 1,6 | 0, | 2, | - | - | 8, | 0, | - | - | 0, | 0, |
| | | 1,0 | 3,2 | 0 | 0 | 296 | 131 | 0 | 4 | 1,0 | 2,8 | 4 | 1 | 2,4 | 3,7 | 3 | 0 |
| S a l t 2 | 5 : 1 | 958 | 638 | 2 | 5 | 492 | 147 | 0 | 4 | 725 | 060 | 6 | 6 | 179 | 509 | 8 | 2 |
| | | 483 | 647 | | | 2 | | 0 | | 446 | 747 | | | 403 | 675 | | |
| S a l t 1 | 0 : 5 : 1 | - | - | 3, | 0, | 7,75 | 0,9 | 0, | 1 | - | - | 3, | 0, | - | - | 0, | 0, |
| | | 1,4 | 3,4 | 7 | 0 | 869 | 720 | 0 | 0, | 1,5 | 3,1 | 0 | 0 | 2,7 | 4,0 | 1 | 0 |
| S a l t 2 | 5 : 1 | 212 | 917 | 9 | 3 | 082 | 437 | 0 | 6 | 139 | 386 | 6 | 7 | 824 | 427 | 7 | 1 |
| | | 729 | 947 | | | 8 | | 0 | 6 | 807 | 782 | | | 728 | 902 | | |
| S a l t 1 | 1 : 0 : 5 | - | - | 2, | 0, | 7,17 | 0,4 | 0, | 3 | - | - | 1, | 0, | - | - | 0, | 0, |
| | | 1,6 | 3,6 | 3 | 0 | 222 | 286 | 0 | 7, | 1,8 | 3,4 | 3 | 0 | 3,2 | 4,5 | 0 | 0 |
| S a l t 2 | 5 : 1 | 255 | 831 | 7 | 2 | 166 | 461 | 0 | 2 | 584 | 518 | 9 | 4 | 953 | 132 | 5 | 0 |
| | | 917 | 409 | | | 5 | | 0 | 7 | 512 | 734 | | | 122 | 067 | | |
| S a l t 1 | 1 : 0 : 5 | - | - | 9, | 0, | 8,95 | 1,5 | 0, | 2, | - | - | 8, | 0, | - | - | 0, | 0, |
| | | 0,6 | 2,9 | 2, | 1 | 852 | 480 | 0 | 3 | 0,5 | 2,4 | 8, | 3 | 1,9 | 3,4 | 0 | 0 |
| S a l t 2 | 5 : 1 | 528 | 602 | 2 | 1 | 956 | 855 | 0 | 6 | 507 | 153 | 1 | 8 | 796 | 044 | 5 | 4 |
| | | 490 | 990 | 4 | | 4 | | 0 | | 171 | 189 | 4 | | 469 | 392 | | |
| S a l t 1 | 0 : 2 : 1 | - | - | 2, | 0, | 7,00 | 0,4 | 0, | 3 | - | - | 1, | 0, | - | - | 0, | 0, |
| | | 1,6 | 3,6 | 1 | 0 | 301 | 604 | 0 | 4, | 1,9 | 3,4 | 2 | 0 | 3,0 | 4,2 | 0 | 0 |
| S a l t 2 | 5 : 1 | 730 | 698 | 2 | 2 | 99 | 690 | 0 | 6 | 025 | 302 | 5 | 4 | 973 | 938 | 8 | 1 |
| | | 392 | 429 | | | 7 | | 0 | 4 | 654 | 623 | | | 154 | 043 | | |
| S a l t 1 | 0 : 2 : 1 | - | - | 2, | 0, | 7,00 | 0,4 | 0, | 3 | - | - | 1, | 0, | - | - | 0, | 0, |
| | | 1,6 | 3,6 | 1 | 0 | 301 | 604 | 0 | 4, | 1,9 | 3,4 | 2 | 0 | 3,0 | 4,2 | 0 | 0 |
| S a l t 2 | 5 : 1 | 730 | 698 | 2 | 2 | 99 | 690 | 0 | 6 | 025 | 302 | 5 | 4 | 973 | 938 | 8 | 1 |
| | | 392 | 429 | | | 7 | | 0 | 4 | 654 | 623 | | | 154 | 043 | | |
| S a l t 1 | 0 : 2 : 1 | - | - | 2, | 0, | 7,00 | 0,4 | 0, | 3 | - | - | 1, | 0, | - | - | 0, | 0, |
| | | 1,6 | 3,6 | 1 | 0 | 301 | 604 | 0 | 4, | 1,9 | 3,4 | 2 | 0 | 3,0 | 4,2 | 0 | 0 |
| S a l t 2 | 5 : 1 | 730 | 698 | 2 | 2 | 99 | 690 | 0 | 6 | 025 | 302 | 5 | 4 | 973 | 938 | 8 | 1 |
| | | 392 | 429 | | | 7 | | 0 | 4 | 654 | 623 | | | 154 | 043 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|--------------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------|------------------------|-------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|--------------|
| S a l t 2 | | | - 1,7 856 860 9 | - 3,7 745 854 | 1, 6 4 | 0, 0 2 | 6,67 242 594 | 0,1 582 412 8 | 0, 0 0 6 | 6 9, 4 6 | - 2,0 957 480 4 9 | - 3,6 021 712 9 | 0, 0 0 2 | 0, 0 0 2 | - 3,3 824 928 4 | - 4,5 491 950 8 | 0, 0 4 0 | 0, 0 0 0 | |
| S a l t 1 | Oxali c a c i d | 1 : 1 1 | - 2,6 617 036 7 | - 4,2 135 031 3 | 0, 0 2 2 | 0, 0 0 1 | 4,27 372 423 | - 1,1 500 608 5 | 0, 0 0 8 | 7, 0 0 8 | - 1,5 564 336 | - 3,0 876 341 7 | 2, 0 7 8 8 | 0, 0 0 8 8 | - 2,4 476 676 1 | - 3,6 990 255 3 | 0, 0 3 6 2 | 0, 0 6 2 | |
| S a l t 2 | | | - 2,6 105 561 | - 4,3 155 591 5 | 0, 2 5 | 0, 0 0 | 4,35 216 158 | - 1,4 765 464 2 | 0, 0 0 4 | 3, 3 4 | - 1,8 970 742 1 | - 3,4 735 213 6 | 1, 2 7 3 | 0, 0 0 3 | - 3,1 241 044 9 | - 4,3 585 818 2 | 0, 0 8 0 | 0, 0 0 0 | |
| S a l t 1 | | 0 . 5 : 1 | - 2,7 697 410 9 | - 4,3 060 459 3 | 0, 1 7 | 0, 0 0 | 3,80 513 244 | - 1,4 596 910 4 | 0, 0 1 6 | 3, 4 7 | - 1,8 292 449 6 | - 3,2 392 744 5 | 1, 4 8 6 | 0, 0 8 6 | - 2,0 086 888 2 | - 3,4 744 013 9 | 0, 9 8 3 | 0, 0 8 3 | |
| S a l t 2 | | | - 3,0 319 887 2 | - 4,4 693 561 3 | 0, 0 9 | 0, 0 0 | 3,05 801 627 | - 1,9 425 038 9 | 0, 0 8 7 | 1, 1 4 | - 2,1 656 813 8 | - 3,5 395 555 6 | 0, 0 8 3 | 0, 0 0 3 | - 2,7 268 729 6 | - 4,0 181 580 5 | 0, 1 9 1 | 0, 0 9 1 | |
| S a l t 1 | | 1 : 0 . 5 | - 1,4 816 883 5 | - 3,5 935 261 8 | 3, 3 0 | 0, 0 3 | 7,62 150 746 | 0,6 131 633 2 | 0, 0 0 7 | 2, 4 3 | - 0,7 278 840 3 | - 2,5 984 151 1 | 1, 8 7 5 | 0, 2 5 | - 2,0 465 494 6 | - 3,4 731 796 4 | 0, 9 0 3 | 0, 0 3 | |
| S a l t 2 | | | - 1,7 832 140 8 | - 3,8 479 538 2 | 1, 6 5 | 0, 0 1 | 6,71 953 154 | - 0,1 319 228 5 | 0, 0 0 0 | 7, 3 8 0 | - 1,3 565 728 4 | - 3,1 481 932 3 | 4, 4 0 7 | 0, 0 0 7 | - 2,9 237 88 | - 4,2 875 196 | 0, 1 2 1 | 0, 0 1 1 | |
| S a l t 1 | | 0 . 2 : 1 | - 1,8 863 186 8 | - 3,8 746 030 3 | 1, 3 0 | 0, 0 1 | 6,24 478 357 | - 0,2 588 030 9 | 0, 0 0 1 | 5, 5 1 | - 1,4 222 893 6 | - 3,0 133 066 1 | 3, 7 8 | 0, 1 0 | - 0,9 826 046 7 | - 2,8 640 108 8 | 1 0 4 4 | 0, 1 4 4 | |
| S a l t 2 | | | - 2,2 043 908 9 | - 4,0 536 363 4 | 0, 6 2 | 0, 0 1 | 5,32 080 173 | - 0,7 785 672 2 | 0, 0 0 5 | 1, 6 6 5 | - 1,6 835 315 7 | - 3,2 080 848 6 | 2, 0 7 6 | 0, 0 0 6 | - 1,4 130 254 4 | - 3,1 819 402 | 3, 8 6 7 | 0, 0 7 | |
| S a l t 1 | | Ethyl e n e g l y c o l | 1 : 1 1 | - 1,2 145 448 4 | - 3,2 947 838 6 | 6, 1 0 | 0, 0 5 | 9,04 258 094 | 1,9 618 657 9 | 0, 0 0 0 | 1, 0 9 | - 0,5 240 339 9 | - 2,3 243 776 4 | 2, 9 9 2 | 0, 4 7 | - 1,7 182 625 4 | - 3,0 850 800 4 | 1, 9 1 8 | 0, 0 8 |
| S a l t 2 | | | | - 1,3 763 410 2 | - 3,4 115 322 1 | 4, 2 0 | 0, 0 4 | 8,51 675 682 | 1,5 956 517 3 | 0, 0 0 0 | 2, 5 4 | - 0,9 053 084 7 | - 2,6 358 825 1 | 1, 2 4 3 | 0, 2 3 | - 2,2 289 336 5 | - 3,5 367 189 7 | 0, 5 9 3 | 0, 0 3 |
| S a l t 1 | 0 . 5 : 1 | | - 1,6 772 322 6 | - 3,5 683 214 3 | 2, 1 0 | 0, 0 3 | 7,79 037 506 | 1,2 478 088 5 | 0, 0 0 0 | 5, 6 5 | - 0,8 764 066 9 | - 2,5 375 834 2 | 1, 3 2 9 | 0, 2 9 9 | - 1,8 971 993 1 | - 3,1 698 753 9 | 1, 2 7 7 | 0, 0 7 7 | |
| S a l | | | - 1,6 961 | - 3,5 866 | 2, 0 1 | 0, 0 3 | 7,68 935 572 | 1,1 686 | 0, 0 | 6, 7 8 | - 1,0 727 | - 2,7 033 | 8, 4 6 | 0, 2 0 | - 2,1 927 | - 3,4 343 | 0, 6 4 | 0, 0 4 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|---------------|---|-----|-----|----|----|------|-----|----|----|-----|-----|----|----|-----|-----|----|----|
| t | | | 958 | 683 | | | | 176 | 0 | | 915 | 124 | | | 773 | 442 | | |
| 2 | | | 7 | 9 | | | | 8 | 0 | | 2 | 3 | | | 6 | 6 | | |
| S | | 1 | - | - | 2 | 0, | 10,5 | 2,8 | 0, | 0, | - | - | 7 | 0, | - | - | 3, | 0, |
| al | | : | 0,6 | 2,9 | 3, | 1 | 346 | 578 | 0 | 1 | 0,1 | 2,0 | 8, | 8 | 1,4 | 2,9 | 5 | 1 |
| t | | 0 | 280 | 341 | 5 | 2 | 826 | 522 | 0 | 4 | 049 | 543 | 5 | 8 | 508 | 327 | 4 | 2 |
| 1 | | . | 922 | 560 | 5 | | | 2 | 0 | | 240 | 021 | 4 | | 629 | 411 | | |
| | | 5 | 7 | 7 | | | | | | | 3 | 5 | | | 5 | 4 | | |
| S | | | - | - | 9, | 0, | 9,38 | 2,0 | 0, | 0, | - | - | 2 | 0, | - | - | 0, | 0, |
| al | | | 1,0 | 3,2 | 5 | 0 | 785 | 693 | 0 | 8 | 0,6 | 2,5 | 0, | 2 | 2,1 | 3,5 | 6 | 0 |
| t | | | 205 | 072 | 4 | 6 | 01 | 654 | 0 | 5 | 976 | 350 | 0 | 9 | 994 | 937 | 3 | 3 |
| 2 | | | 348 | 948 | | | | 7 | 0 | | 689 | 308 | 6 | | 725 | 262 | | |
| | | | 3 | 9 | | | | | | | | 4 | | 7 | 4 | | | |
| S | Dieth | 1 | - | - | 3 | 0, | 10,9 | 3,0 | 0, | 0, | 0,1 | - | 7 | 1, | - | - | 8, | 0, |
| al | ylene | : | 0,4 | 2,8 | 2, | 1 | 167 | 260 | 0 | 0 | 449 | 1,8 | 1, | 4 | 1,0 | 2,6 | 0 | 2 |
| t | glycol | 1 | 816 | 801 | 9 | 3 | 650 | 503 | 0 | 9 | 082 | 536 | 6 | 0 | 924 | 242 | 8 | 4 |
| 1 | | | 809 | 804 | 9 | | 8 | 4 | 0 | | 9 | 533 | 3 | | 784 | 280 | | |
| | | | 4 | 7 | | | | | | | | 7 | | 2 | 6 | | | |
| S | | | - | - | 1 | 0, | 9,84 | 2,4 | 0, | 0, | - | - | 4 | 0, | - | - | 1, | 0, |
| al | | | 0,8 | 3,0 | 4, | 0 | 498 | 328 | 0 | 3 | 0,3 | 2,2 | 1, | 5 | 1,7 | 3,1 | 9 | 0 |
| t | | | 291 | 735 | 8 | 8 | 758 | 604 | 0 | 7 | 797 | 320 | 7 | 9 | 163 | 196 | 2 | 8 |
| 2 | | | 244 | 149 | 2 | | | 2 | 0 | | 598 | 989 | 1 | | 442 | 425 | | |
| | | | 1 | 3 | | | | | | | 3 | 6 | | 7 | 5 | | | |
| S | | 0 | - | - | 1 | 0, | 9,69 | 2,2 | 0, | 0, | - | - | 7 | 0, | - | - | 5, | 0, |
| al | | . | 0,9 | 3,2 | 0, | 0 | 495 | 063 | 0 | 6 | 0,1 | 2,0 | 4, | 9 | 1,2 | 2,6 | 9 | 2 |
| t | | 5 | 770 | 025 | 5 | 6 | 182 | 966 | 0 | 2 | 307 | 365 | 0 | 2 | 258 | 896 | 5 | 0 |
| 1 | | : | 732 | 681 | 4 | | 4 | 0 | | | 575 | 147 | 0 | | 225 | 683 | | |
| | | 1 | 1 | 4 | | | | | | | 7 | 9 | | 9 | 2 | | | |
| S | | | - | - | 8, | 0, | 9,26 | 2,0 | 0, | 0, | - | - | 3 | 0, | - | - | 2, | 0, |
| al | | | 1,0 | 3,2 | 1 | 0 | 391 | 511 | 0 | 8 | 0,4 | 2,2 | 8, | 5 | 1,5 | 2,9 | 6 | 1 |
| t | | | 912 | 420 | 1 | 6 | 329 | 663 | 0 | 9 | 164 | 290 | 3 | 9 | 758 | 571 | 6 | 1 |
| 2 | | | 463 | 117 | | | | 3 | 0 | | 318 | 273 | 3 | | 216 | 036 | | |
| | | | 7 | 2 | | | | | | | 7 | 4 | | 7 | | | | |
| S | | 1 | - | - | 9 | 0, | 12,0 | 3,7 | 0, | 0, | 0,3 | - | 3 | 2, | - | - | 1 | 0, |
| al | | : | 0,0 | 2,5 | 5, | 2 | 029 | 704 | 0 | 0 | 993 | 1,6 | 9, | 0 | 0,9 | 2,5 | 0, | 2 |
| t | | 0 | 197 | 642 | 5 | 7 | 417 | 631 | 0 | 2 | 010 | 807 | 8 | 9 | 616 | 583 | 9 | 8 |
| 1 | | . | 342 | 752 | 6 | | | 8 | 0 | | 8 | 556 | 7 | | 999 | 98 | 2 | |
| | | 5 | 5 | 2 | | | | | | | | 5 | | 9 | | | | |
| S | | | - | - | 2 | 0, | 10,2 | 2,6 | 0, | 0, | - | - | 4 | 0, | - | - | 1, | 0, |
| al | | | 0,6 | 2,9 | 4, | 1 | 885 | 882 | 0 | 2 | 0,3 | 2,2 | 4, | 5 | 1,8 | 3,2 | 4 | 0 |
| t | | | 129 | 387 | 3 | 2 | 233 | 109 | 0 | 1 | 472 | 487 | 9 | 6 | 484 | 919 | 2 | 5 |
| 2 | | | 760 | 867 | 8 | | 1 | 5 | 0 | | 643 | 494 | 5 | | 251 | 240 | | |
| | | | 2 | 5 | | | | | | | 2 | 7 | | 1 | 7 | | | |
| S | | 0 | - | - | 3, | 0, | 8,28 | 1,2 | 0, | 5, | - | - | 3 | 0, | - | - | 4, | 0, |
| al | | . | 1,5 | 3,5 | 1 | 0 | 187 | 696 | 0 | 3 | 0,4 | 2,2 | 5, | 5 | 1,3 | 2,7 | 2 | 1 |
| t | | 2 | 005 | 337 | 6 | 3 | 006 | 490 | 0 | 7 | 484 | 446 | 6 | 7 | 725 | 646 | 4 | 7 |
| 1 | | : | 316 | 996 | | | | 1 | 0 | | 119 | 891 | 1 | | 731 | 45 | | |
| | | 1 | | 1 | | | | | | | 7 | 7 | | 3 | | | | |
| S | | | - | - | 3, | 0, | 8,31 | 1,3 | 0, | 4, | - | - | 2 | 0, | - | - | 3, | 0, |
| al | | | 1,4 | 3,4 | 4 | 0 | 204 | 808 | 0 | 1 | 0,5 | 2,2 | 9, | 5 | 1,4 | 2,8 | 2 | 1 |
| t | | | 680 | 905 | 0 | 3 | 364 | 364 | 0 | 6 | 318 | 925 | 3 | 1 | 937 | 525 | 1 | 4 |
| 2 | | | 147 | 526 | | | | 7 | 0 | | 962 | 148 | 8 | | 861 | 947 | | |
| | | | 6 | 9 | | | | | | | 4 | 1 | | 3 | 5 | | | |
| S | | 0 | - | - | 1, | 0, | 7,55 | 0,7 | 0, | 1 | - | - | 2 | 0, | - | - | 3, | 0, |
| al | | . | 1,7 | 3,6 | 8 | 0 | 888 | 902 | 0 | 6, | 0,6 | 2,3 | 4, | 4 | 1,4 | 2,8 | 5 | 1 |
| t | | 1 | 402 | 867 | 2 | 2 | 742 | 528 | 0 | 2 | 134 | 527 | 3 | 4 | 456 | 042 | 8 | 6 |
| 1 | | : | 941 | 936 | | | | | 0 | 1 | 317 | 983 | 5 | | 063 | 419 | | |
| | | 1 | 6 | 9 | | | | | | | 3 | 8 | | 7 | 5 | | | |
| S | | | - | - | 2, | 0, | 7,66 | 0,9 | 0, | 1 | - | - | 2 | 0, | - | - | 3, | 0, |
| al | | | 1,6 | 3,6 | 0 | 0 | 672 | 185 | 0 | 2, | 0,6 | 2,3 | 3, | 4 | 1,4 | 2,8 | 2 | 1 |
| t | | | 949 | 435 | 2 | 2 | 317 | 001 | 0 | 0 | 362 | 613 | 1 | 4 | 934 | 371 | 1 | 5 |
| 2 | | | 893 | 189 | | | | 9 | 0 | 6 | 71 | 672 | 1 | | 112 | 992 | | |
| | | | 3 | 6 | | | | | | | | 7 | | 2 | 6 | | | |

Salt 1 (S1): 1,3-triethylammonium-2-hydroxypropyl-chloride. Cloruro de 1,3 (bis) trietilamonio-2-propanol.

Salt 2 (S2): 1,3-bisammonium-2-hydroxypropanol-chloride. Cloruro de 1,3 (bis) trimetilamonio-2-propanol.

NA: no aplica

ESPECTROS RMN

Ensayos Disales

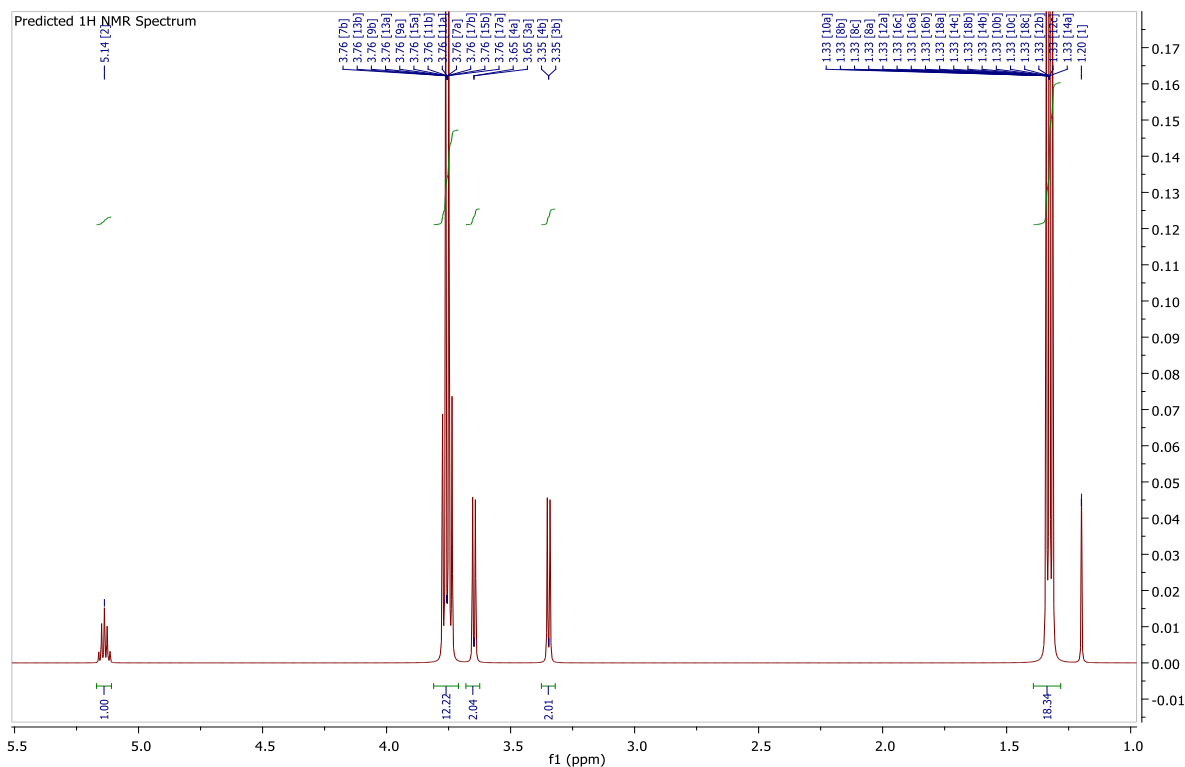


Figura A1. ^1H -RMN Disal 1-Predicción Mest renova

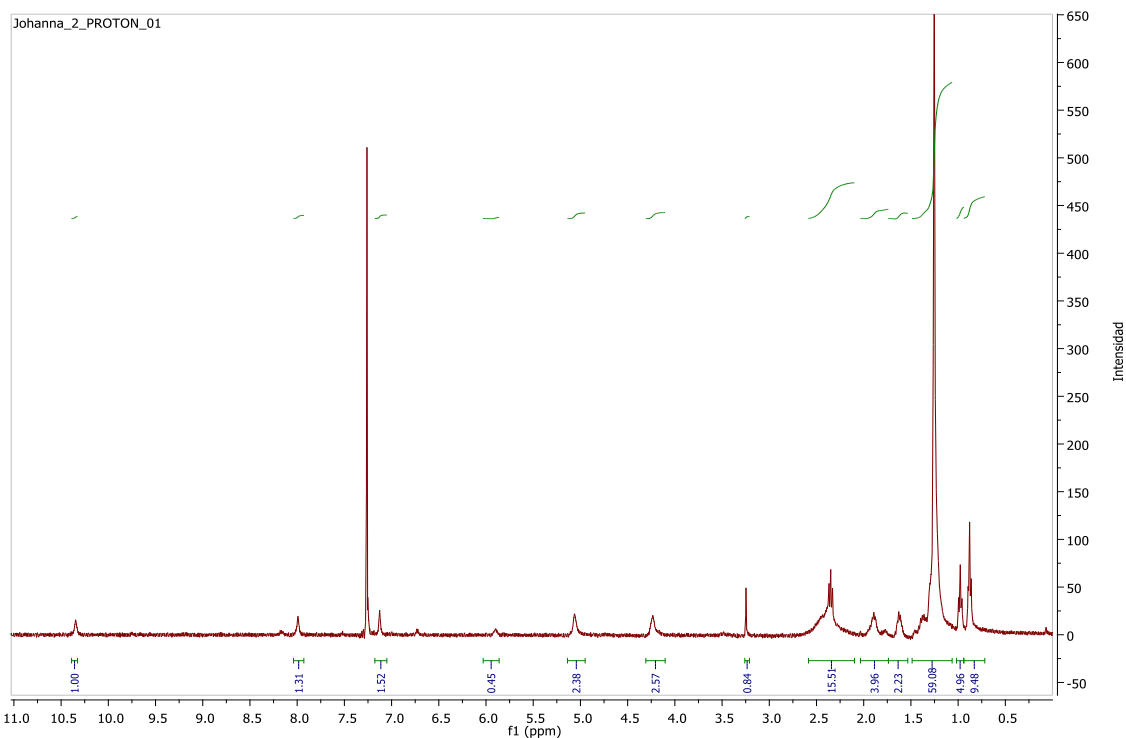


Figura A2. ^1H -RMN Disal 1 –Ensayo A0. ^1H NMR (400 MHz, cdCl_3) δ 10.34 (s, 8H), 7.99 (s, 9H), 7.12 (s, 11H), 5.06 (s, 16H), 4.23 (s, 17H), 3.24 (s, 4H), 2.59 – 2.18 (m, 104H), 1.89 (s, 25H), 1.62 (s, 16H), 1.25 (s, 403H), 0.97 (t, $J = 7.3$ Hz, 32H), 0.91 (dd, $J = 39.4, 7.2$ Hz, 86H).

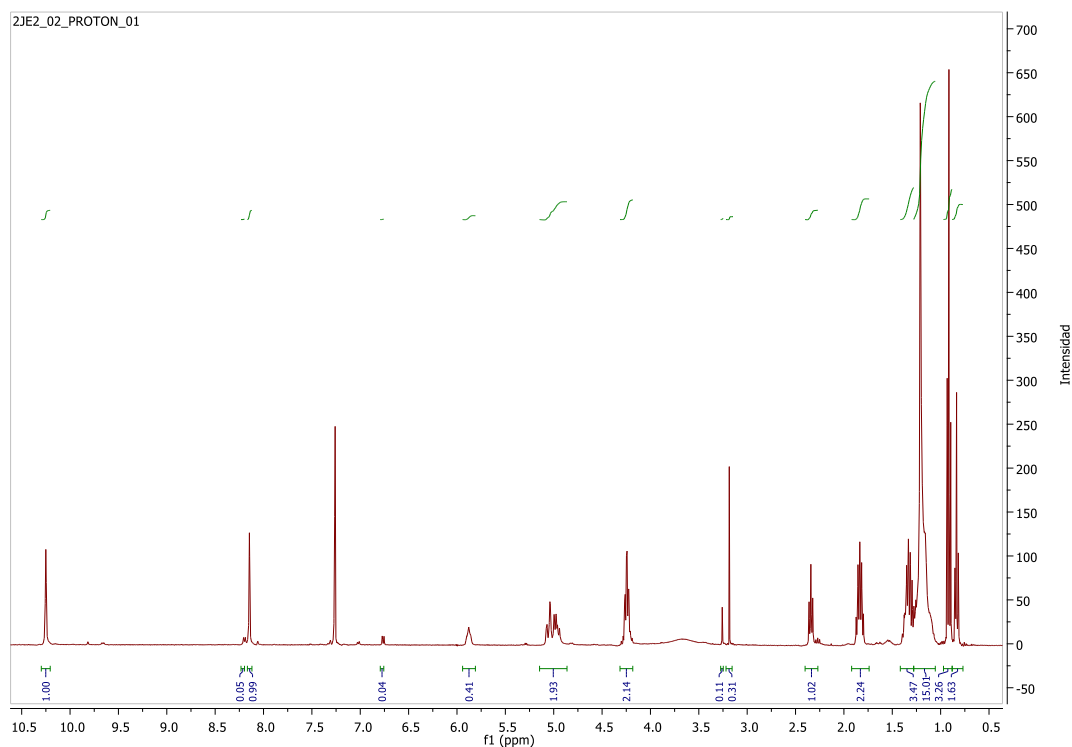


Figura A3. ^1H -RMN Disal 1 –Ensayo A2. ^1H NMR (400 MHz, cdCl_3) δ 10.25 (s, 116H), 8.21 (s, 5H), 8.15 (s, 115H), 6.76 (d, $J = 6.3$ Hz, 5H), 5.88 (s, 48H), 5.00 (dt, $J = 14.1, 9.9$ Hz, 224H), 4.31 – 4.18 (m, 248H), 3.26 (s, 13H), 3.18 (s, 36H), 2.40 – 2.27 (m, 118H), 1.92 – 1.74 (m, 260H), 1.42 – 1.28 (m, 403H), 1.28 – 1.06 (m, 1741H), 0.91 (t, $J = 7.4$ Hz, 378H), 0.83 (t, $J = 6.9$ Hz, 189H).

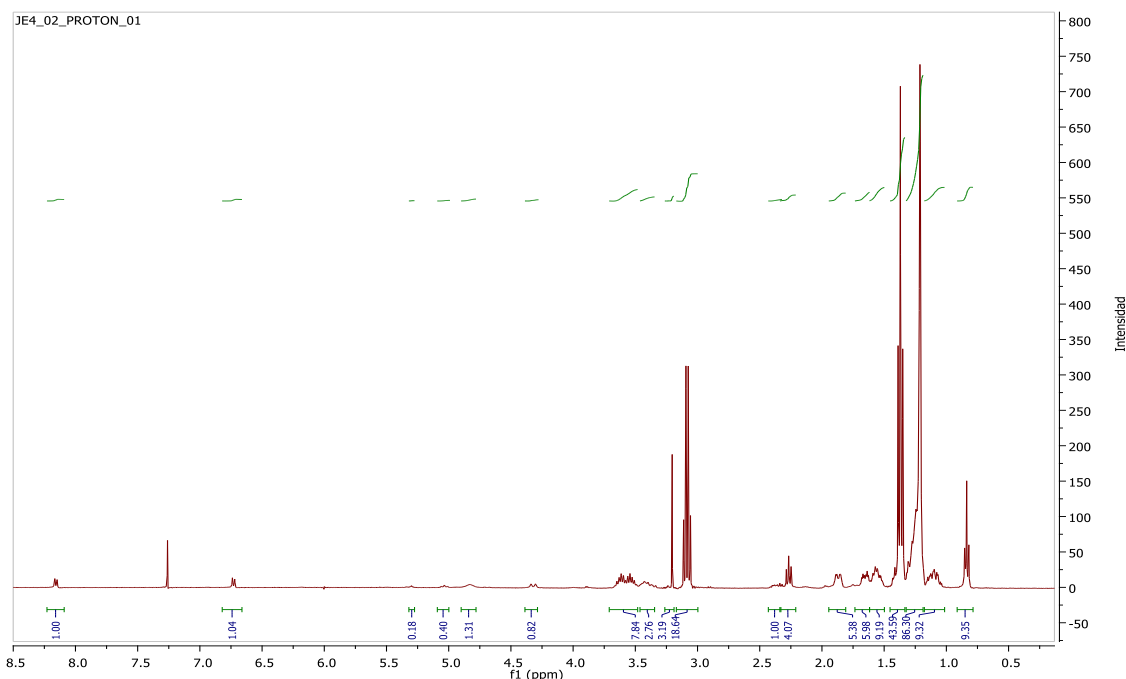


Figura A4. ^1H -RMN Disal 1 –Ensayo A4. ^1H NMR (400 MHz, cdCl_3) δ 8.16 (d, $J = 7.5$ Hz, 33H), 6.73 (d, $J = 7.4$ Hz, 34H), 5.30 (s, 6H), 5.03 (t, $J = 10.0$ Hz, 13H), 4.83 (s, 43H), 4.32 (d, $J = 14.4$ Hz, 27H), 3.57 (ddt, $J = 35.0, 13.9, 7.0$ Hz, 258H), 3.46 – 3.35 (m, 91H), 3.20 (s, 105H), 3.08 (q, $J = 7.3$ Hz, 614H), 2.43 – 2.33 (m, 33H), 2.28 (dd, $J = 18.1, 10.6$ Hz, 134H), 1.87 (dd, $J = 12.6, 3.3$ Hz, 177H), 1.73 – 1.62 (m, 197H), 1.62 – 1.50 (m, 303H), 1.45 – 1.33 (m, 1436H), 1.32 – 1.19 (m, 2843H), 1.18 – 1.01 (m, 307H), 0.84 (t, $J = 6.8$ Hz, 308H).

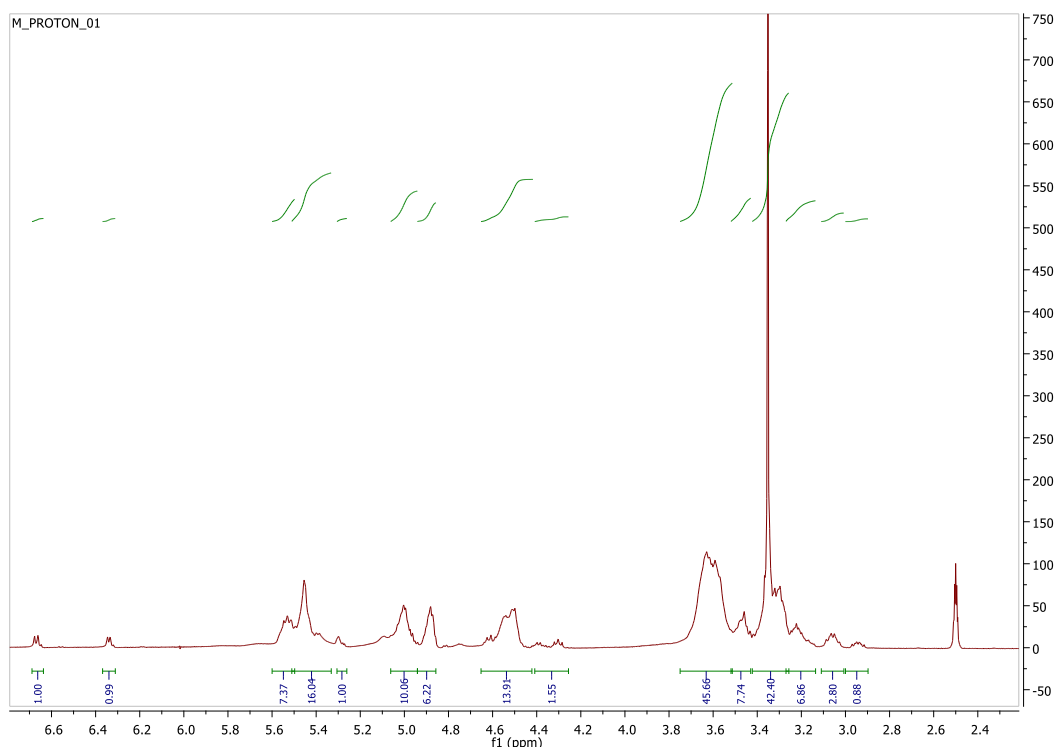


Figura A5. ^1H -RMN Disal 1 –Ensayo A7. ^1H NMR (400 MHz, dmsol) δ 6.66 (t, $J = 6.1$ Hz, 8H), 6.33 (t, $J = 5.3$ Hz, 8H), 5.52 (dd, $J = 13.2, 6.0$ Hz, 58H), 5.43 (dd, $J = 32.4, 10.4$ Hz, 126H), 5.31 – 5.26 (m, 8H), 5.06 – 4.94 (m, 79H), 4.88 (d, $J = 3.4$ Hz, 49H), 4.65 – 4.42 (m, 109H), 4.41 – 4.26 (m, 12H), 3.61 (dd, $J = 10.1, 5.2$ Hz, 359H), 3.46 (t, $J = 8.3$ Hz, 61H), 3.42 – 3.26 (m, 333H), 3.27 – 3.14 (m, 54H), 3.06 (dd, $J = 14.8, 9.2$ Hz, 22H), 2.94 (dd, $J = 13.4, 8.3$ Hz, 7H).

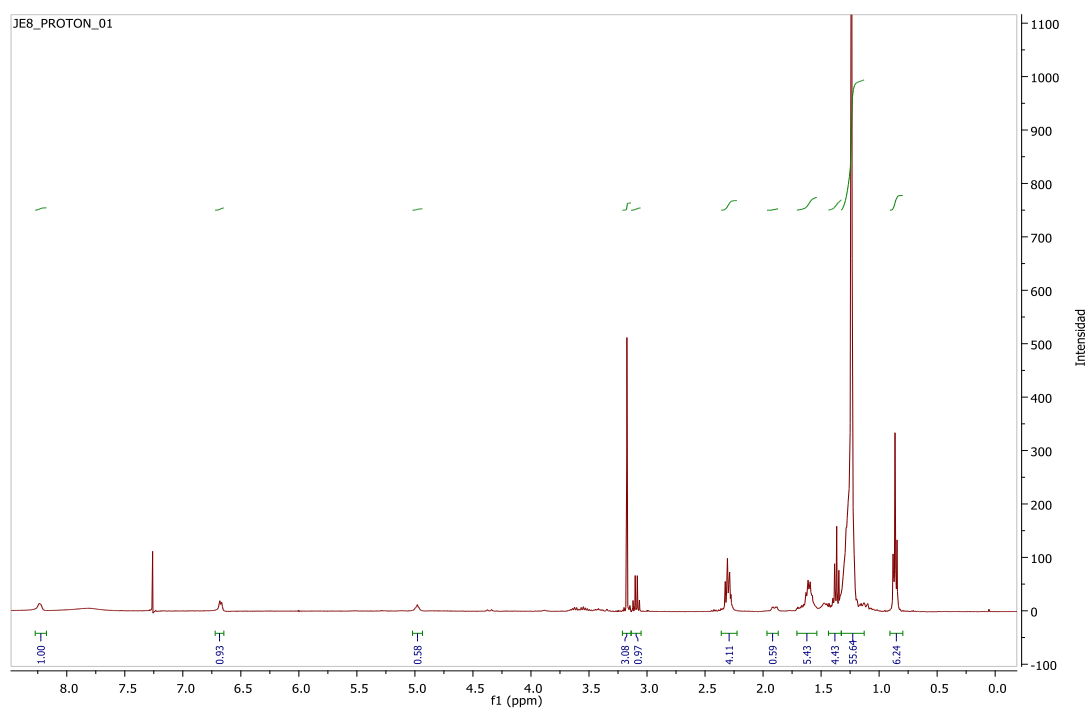


Figura A6. ^1H -RMN Disal 1 –Ensayo A8. ^1H NMR (400 MHz, cdcl_3) δ 8.24 (s, 3H), 6.67 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 4.98 (s, 2H), 3.17 (s, 10H), 3.09 (q, $J = 7.3$ Hz, 3H), 2.36 – 2.22 (m, 13H), 1.90 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 1.71 – 1.54 (m, 17H), 1.38 (tt, $J = 15.8, 7.9$ Hz, 14H), 1.26 (d, $J = 18.3$ Hz, 176H), 0.91 – 0.80 (m, 20H).

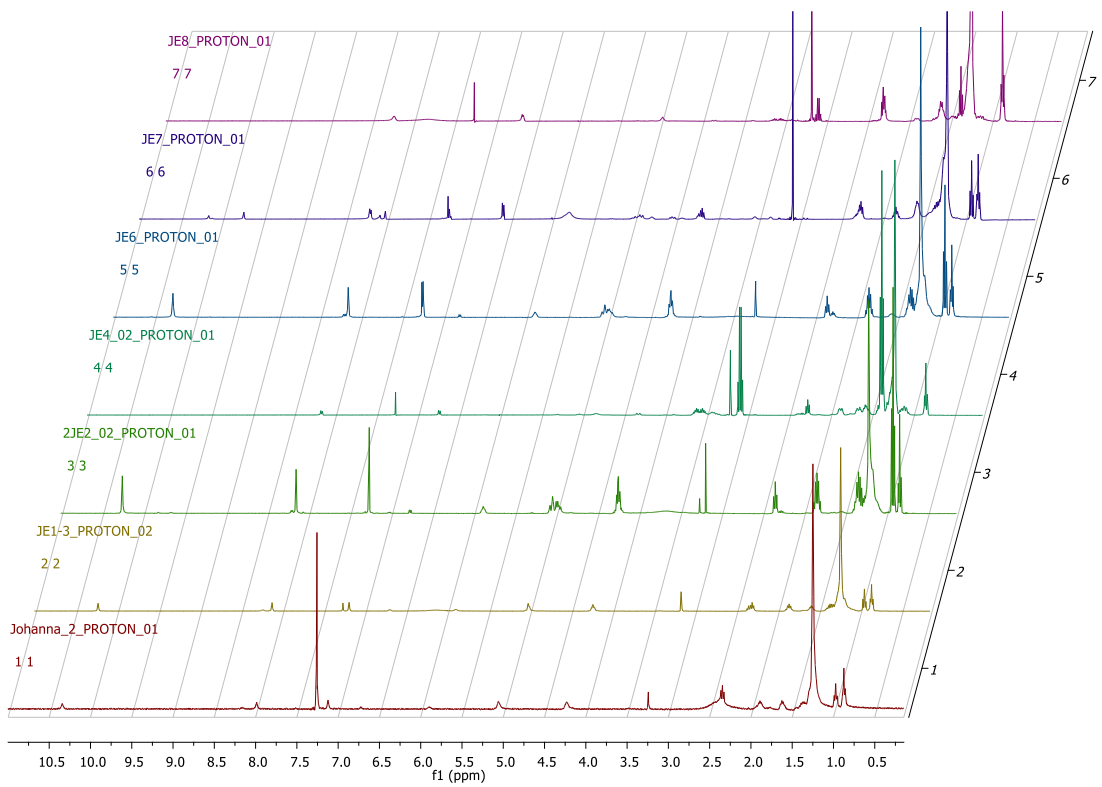


Figura A7. ¹H-RMN Disal 1–Comparaciones ensayos.

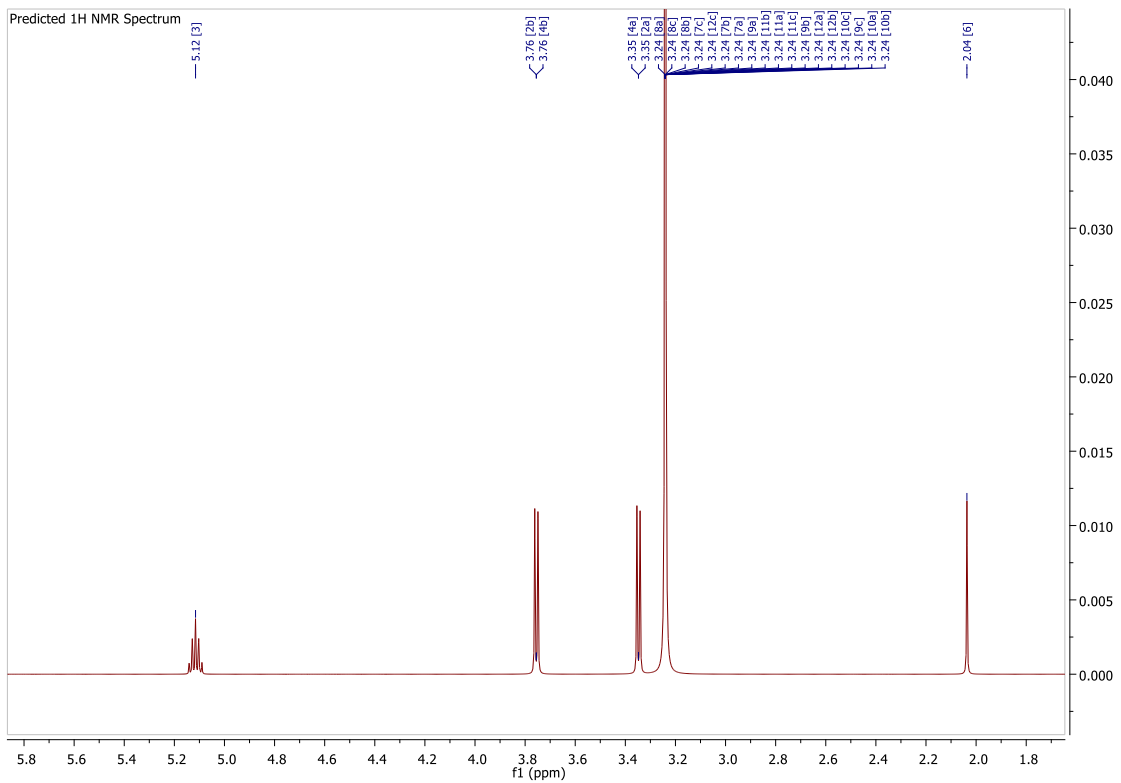


Figura A8. ¹H-RMN Predicción Disal 2

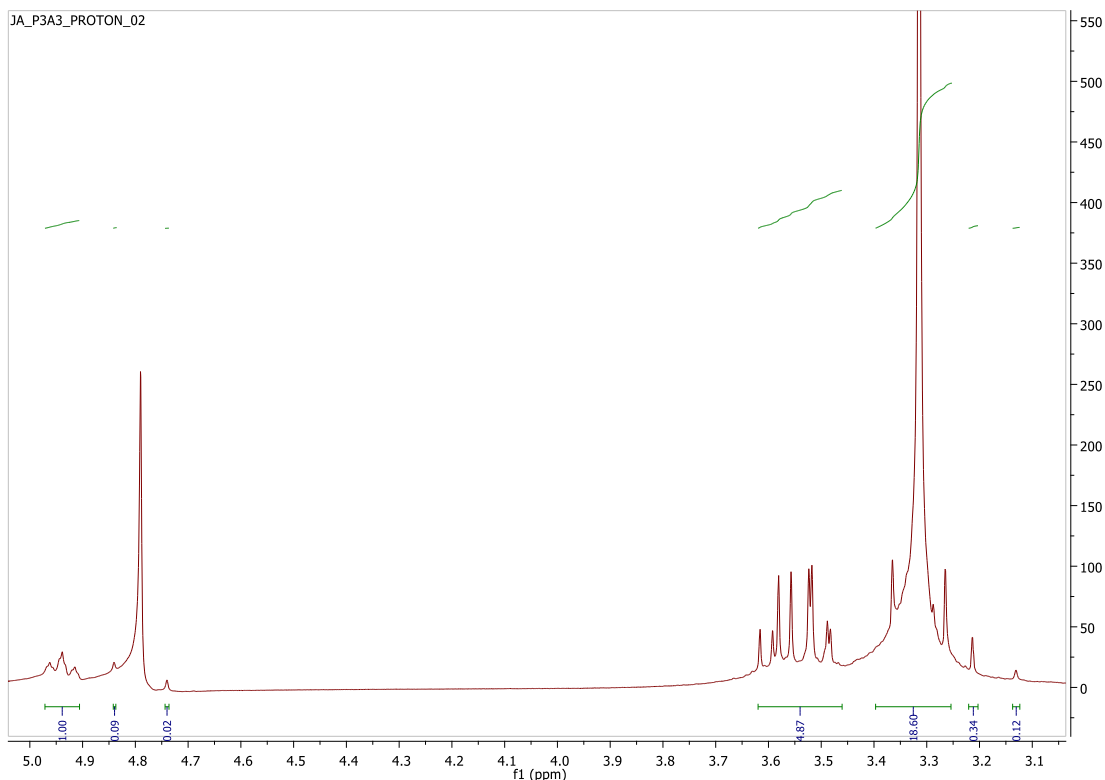


Figura A9. ^1H -RMN Disal 2 –Ensayo B1. ^1H NMR (400 MHz, d_2O) δ 4.94 (t, $J = 9.5$ Hz, 500H), 4.84 (s, 43H), 4.74 (s, 11H), 3.62 – 3.46 (m, 2434H), 3.40 – 3.25 (m, 9301H), 3.21 (d, $J = 0.4$ Hz, 172H), 3.13 (s, 62H), 2.80 (s, 61H), 2.26 – 2.24 (m, 5H).

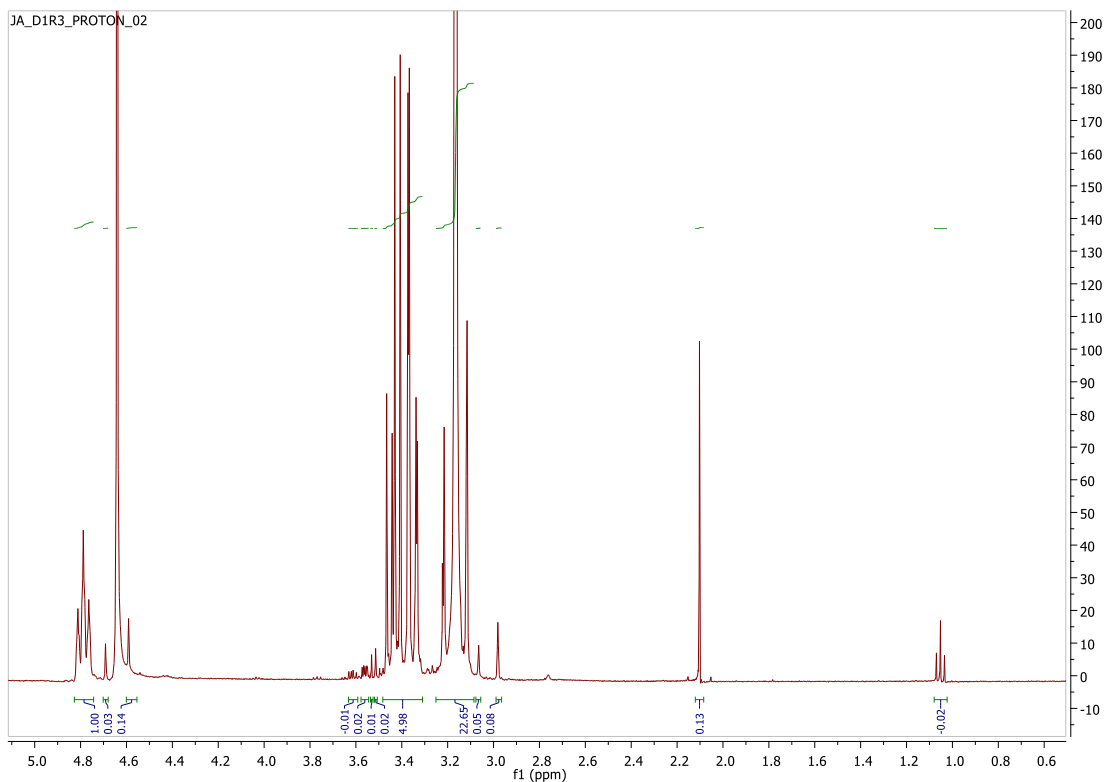


Figura A10. ^1H -RMN Disal 2 –Ensayo B3. ^1H NMR (400 MHz, d_2O) δ 4.79 (t, $J = 9.5$ Hz, 248H), 4.69 (s, 7H), 4.59 (s, 35H), 3.63 – 3.59 (m, 1H), 3.58 – 3.54 (m, 6H), 3.53 (s, 2H), 3.31 (s, 4H), 3.48 – 3.31 (m, 1235H), 3.14 (d, $J = 19.8$ Hz, 5617H), 3.06 (s, 12H), 2.98 (s, 20H), 2.10 (d, $J = 0.5$ Hz, 33H), 1.05 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H).

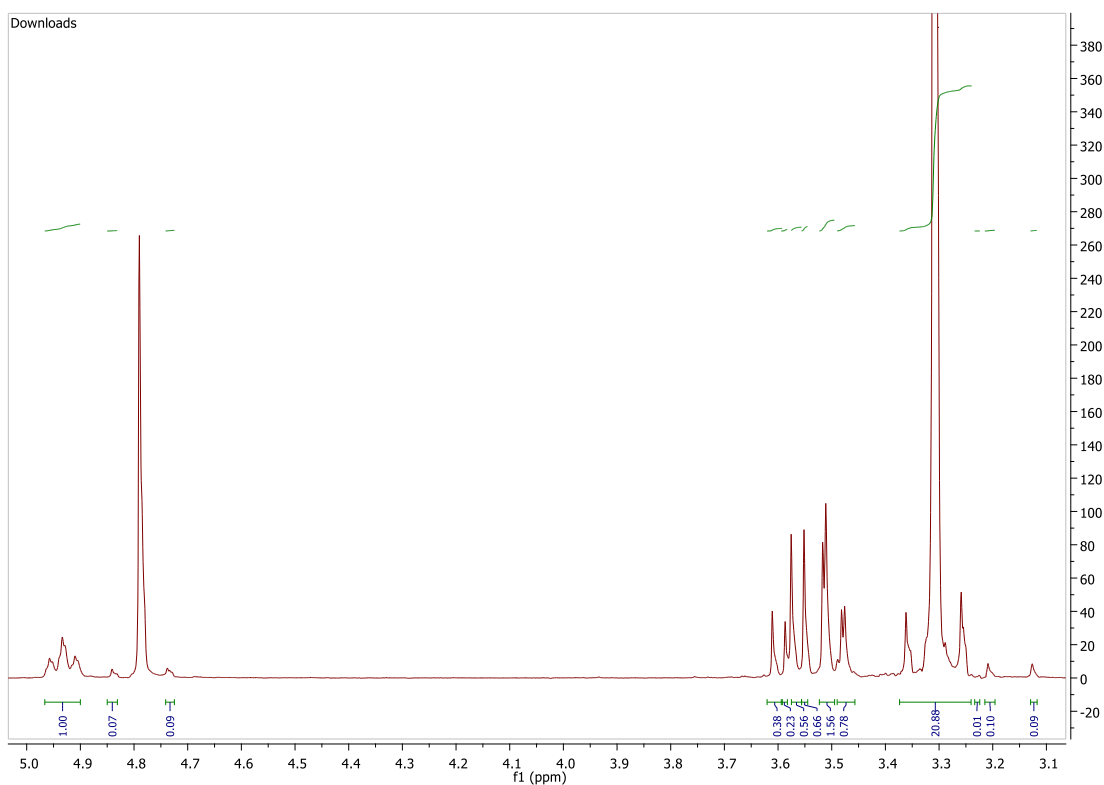


Figura A11. ^1H -RMN Disal 2–Ensayo B2. ^1H NMR (400 MHz, d_2o) δ 4.93 (t, $J = 9.5$ Hz, 237H), 4.84 (s, 16H), 4.74 (s, 22H), 3.61 (s, 89H), 3.59 (s, 54H), 3.56 (s, 133H), 3.55 (s, 157H), 3.51 (d, $J = 2.3$ Hz, 369H), 3.49 – 3.46 (m, 185H), 3.28 (d, $J = 20.7$ Hz, 4945H), 3.23 – 3.22 (m, 3H), 3.21 (s, 24H), 3.13 (s, 20H).

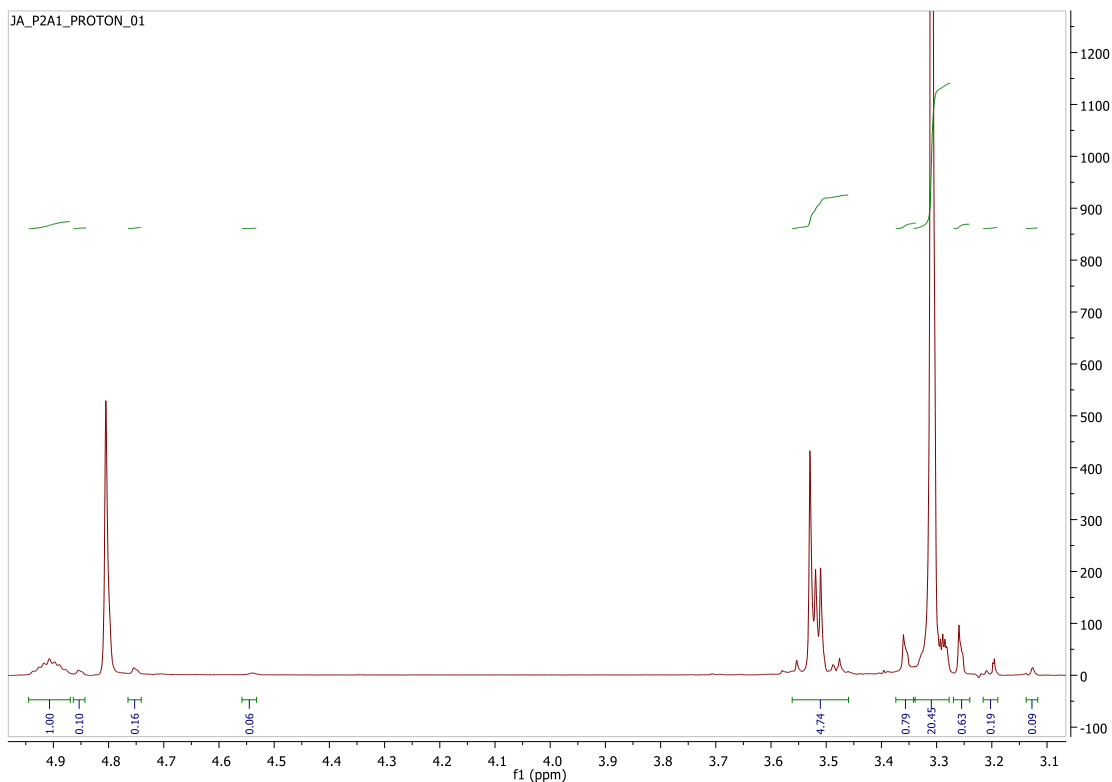


Figura A12. ^1H -RMN Disal 2–Ensayo B4. ^1H NMR (400 MHz, cd_3od) δ 4.94 – 4.87 (m, 32H), 4.85 (s, 3H), 4.75 (s, 5H), 4.54 (s, 2H), 3.56 – 3.46 (m, 151H), 3.35 (d, $J = 8.2$ Hz, 25H), 3.31 (s, 651H), 3.26 (s, 20H), 3.20 (dd, $J = 3.1, 2.5$ Hz, 6H), 3.13 (s, 3H).

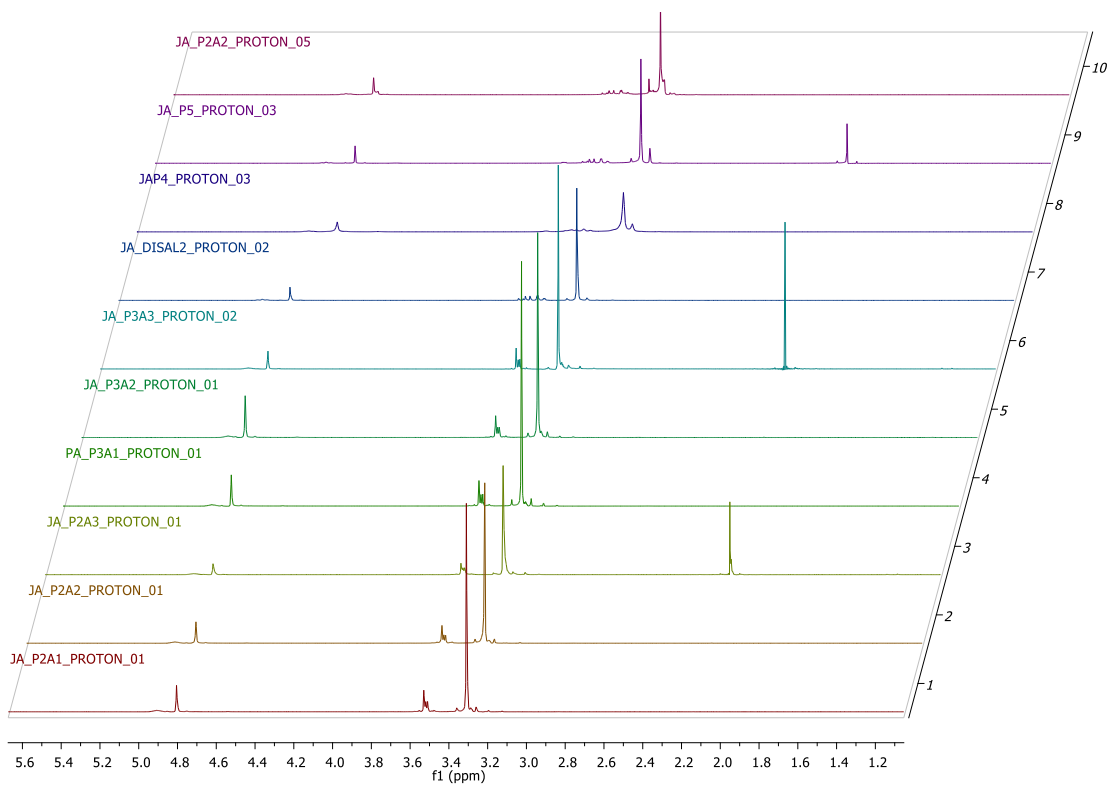


Figura A13. ^1H -RMN Disal 2—Comparaciones entre ensayos B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11.

RMN DES's

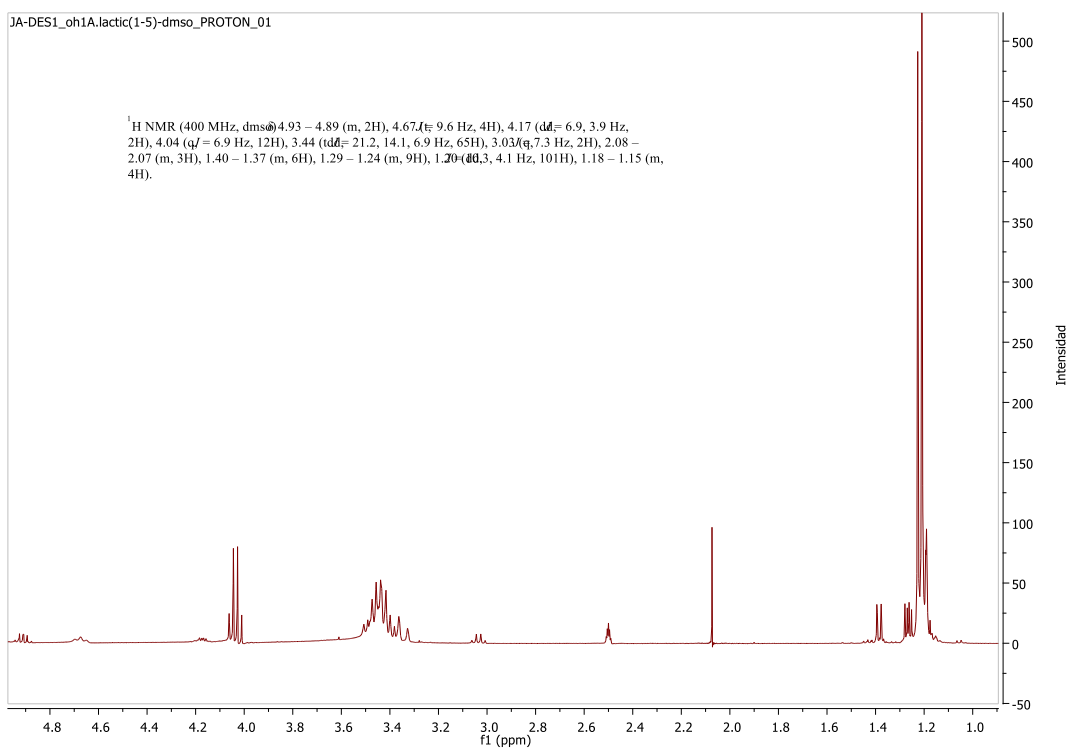


Figura A14. ^1H -RMN DES1.

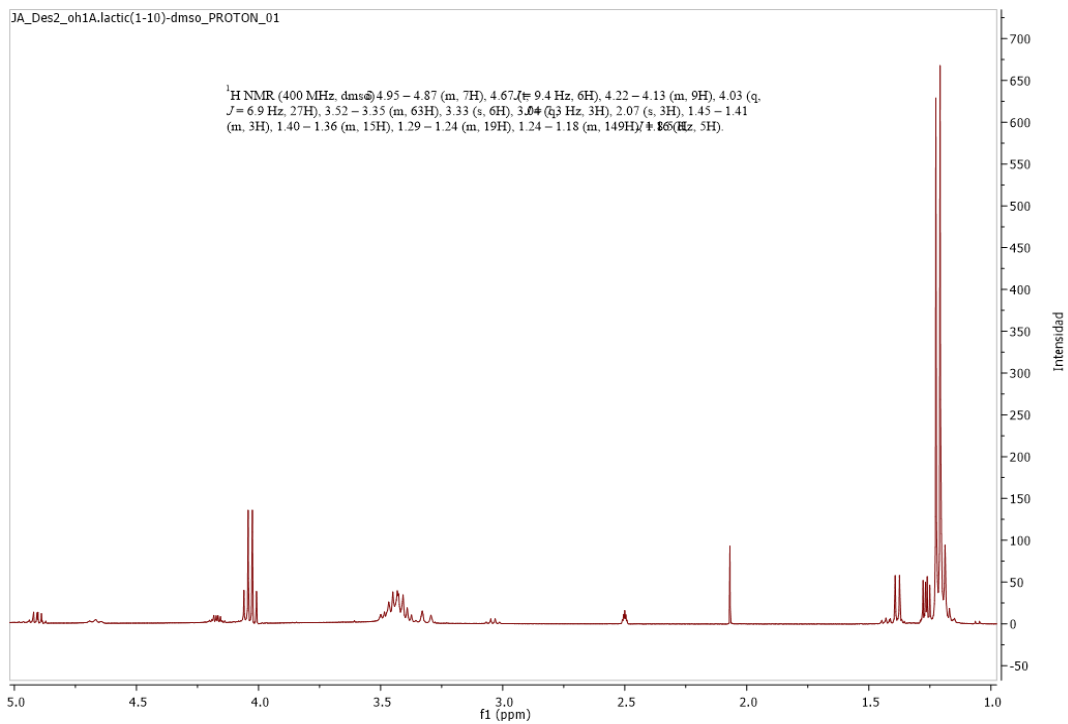


Figura A15. ^1H -RMN DES2.

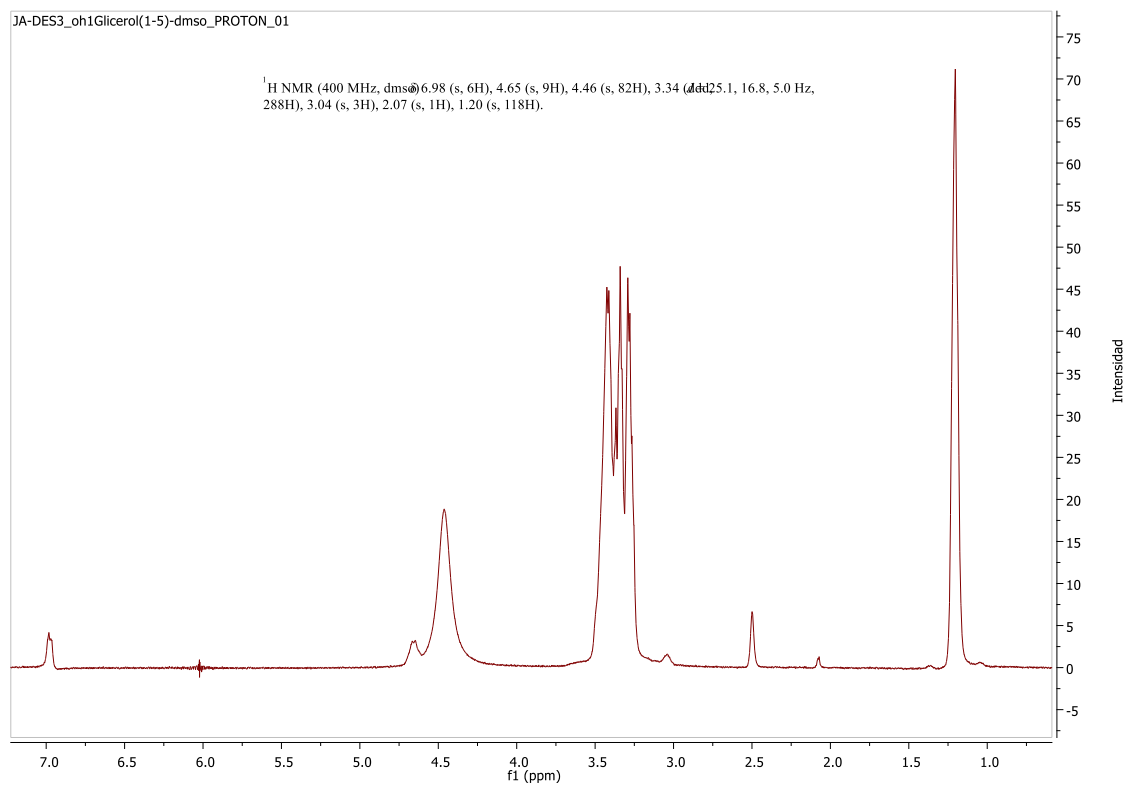


Figura A16. ^1H -RMN DES3.

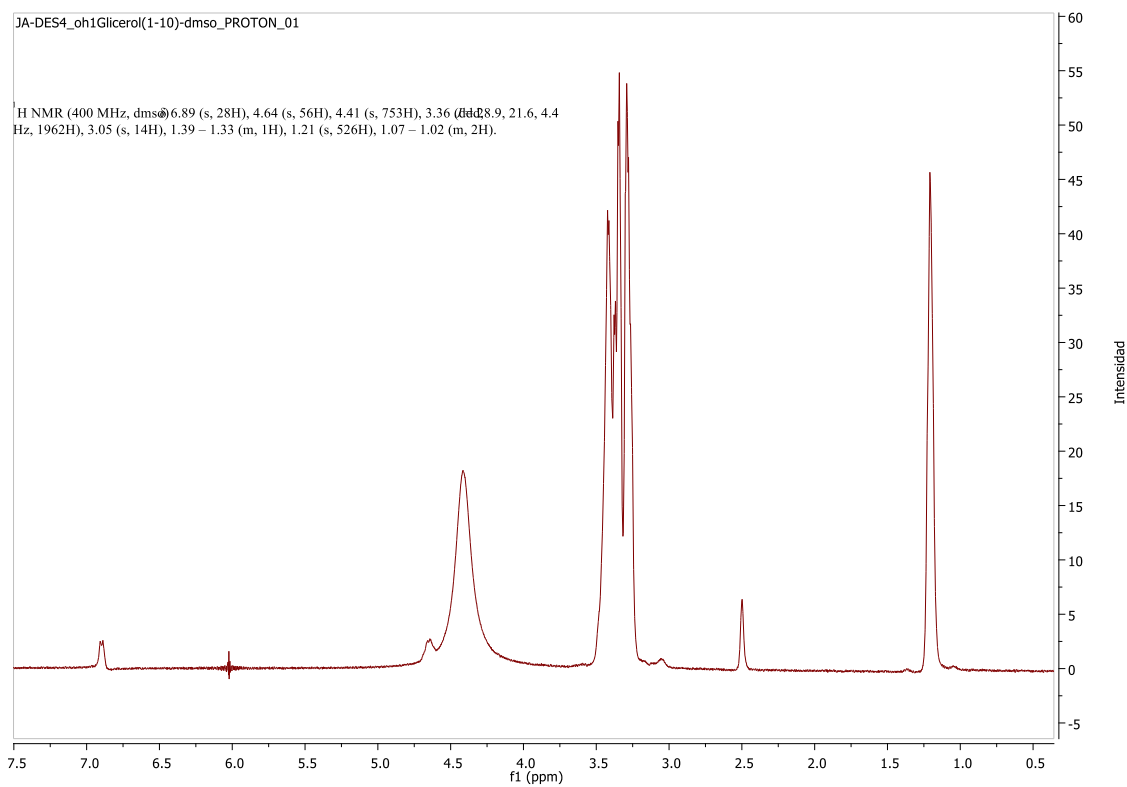


Figura A17. ¹H-RMN DES4.

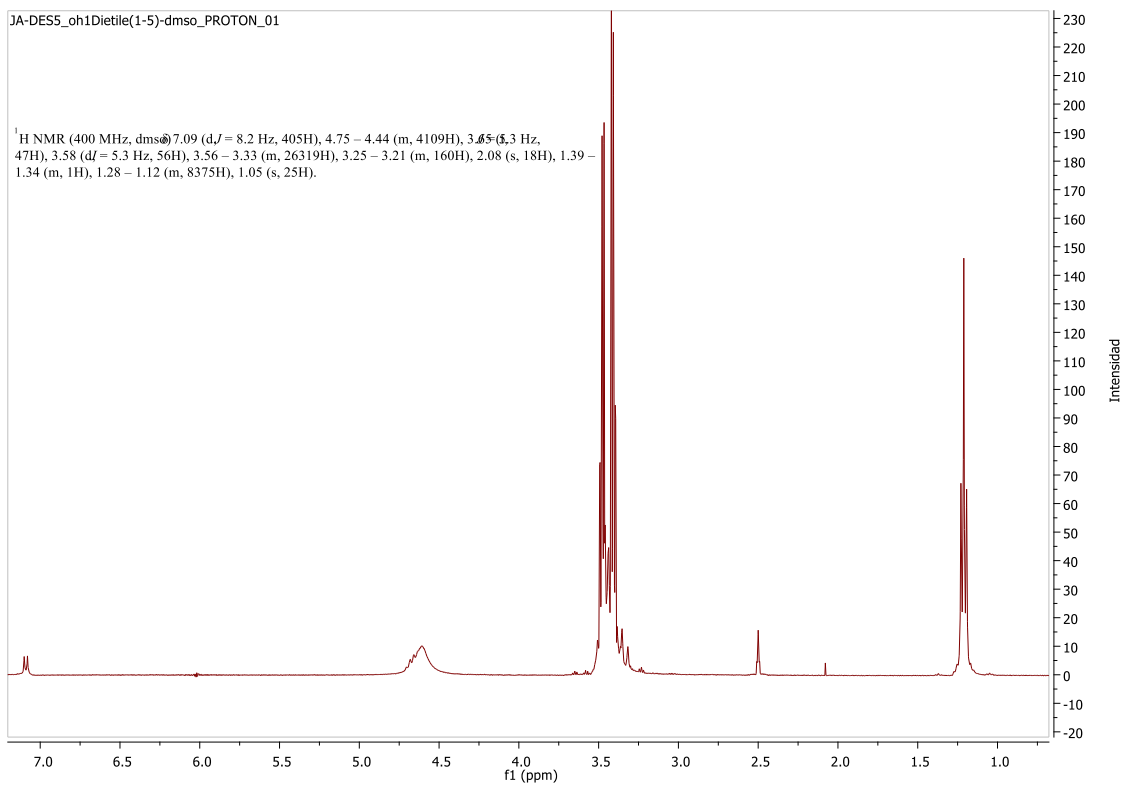


Figura A18. ¹H-RMN DES5.

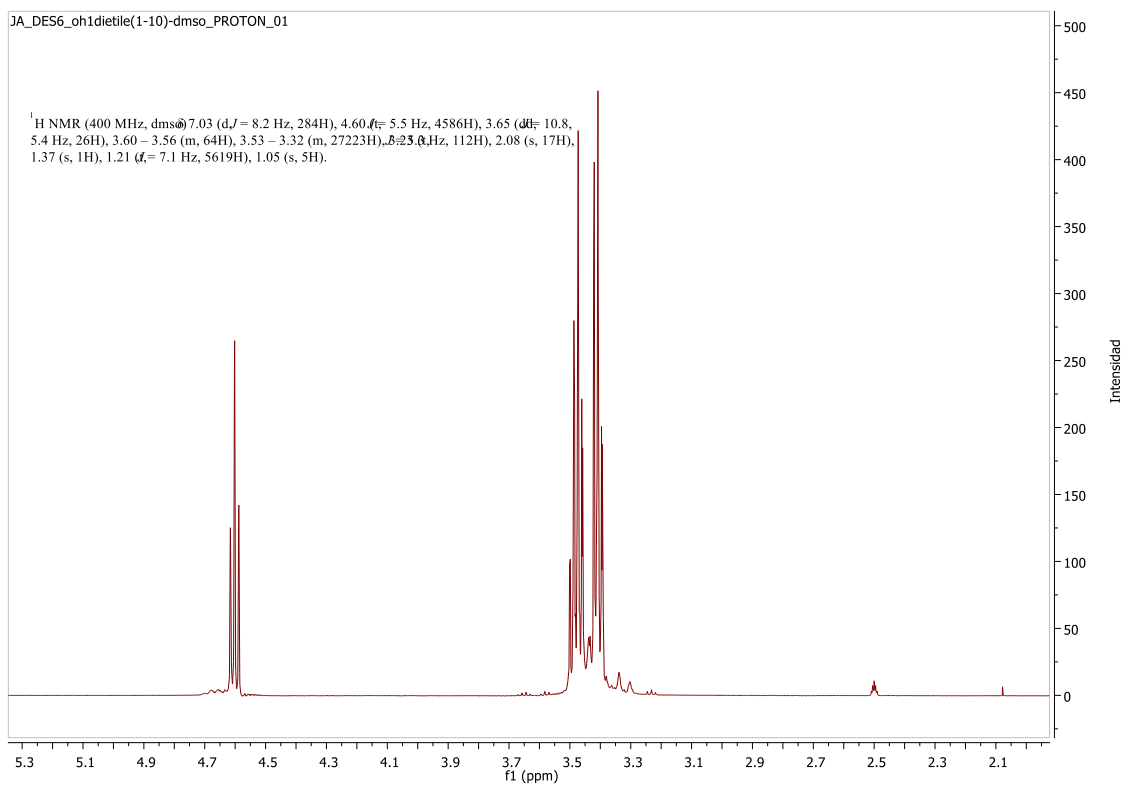


Figura A19. ¹H-RMN DES6.

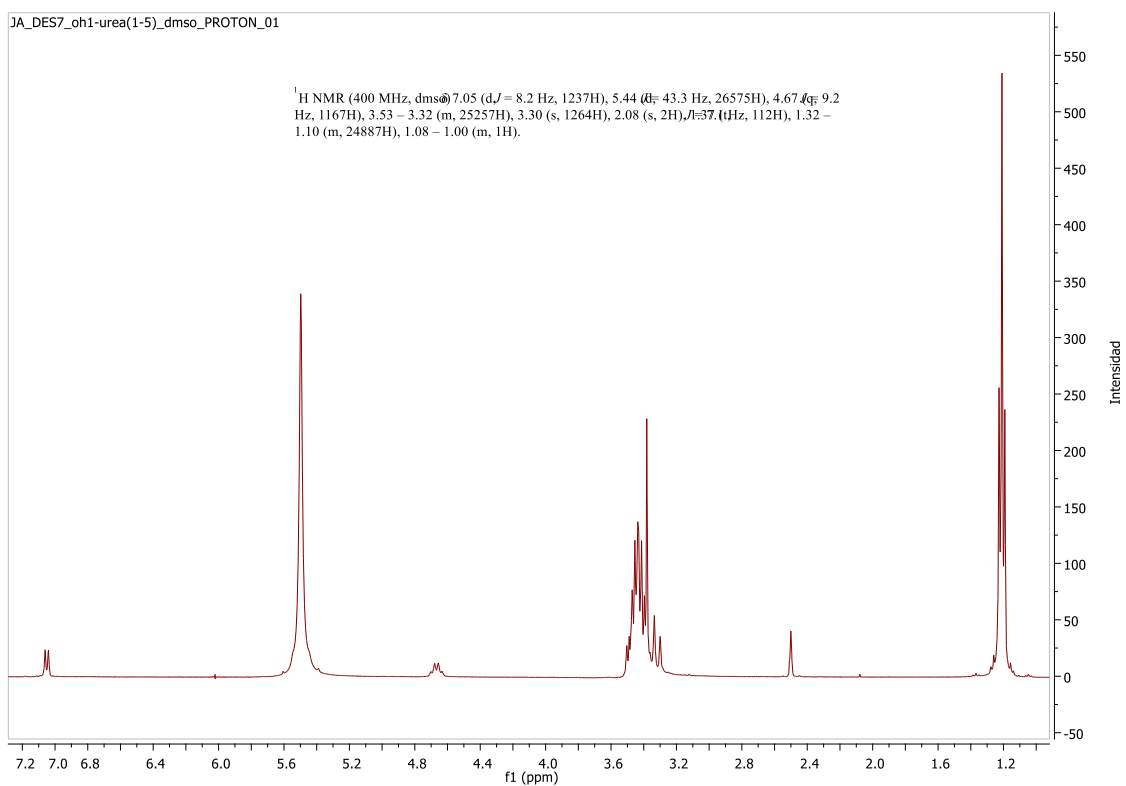


Figura A20. ¹H-RMN DES7.

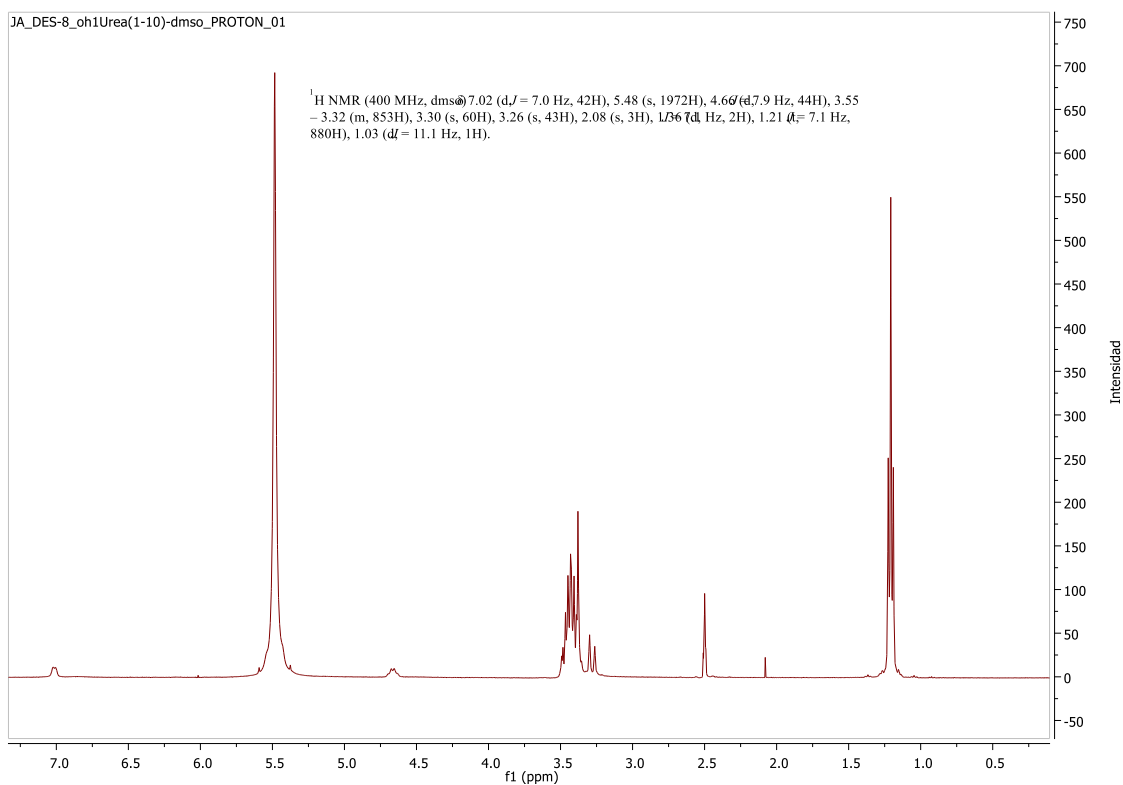


Figura A21. ¹H-RMN DES8.

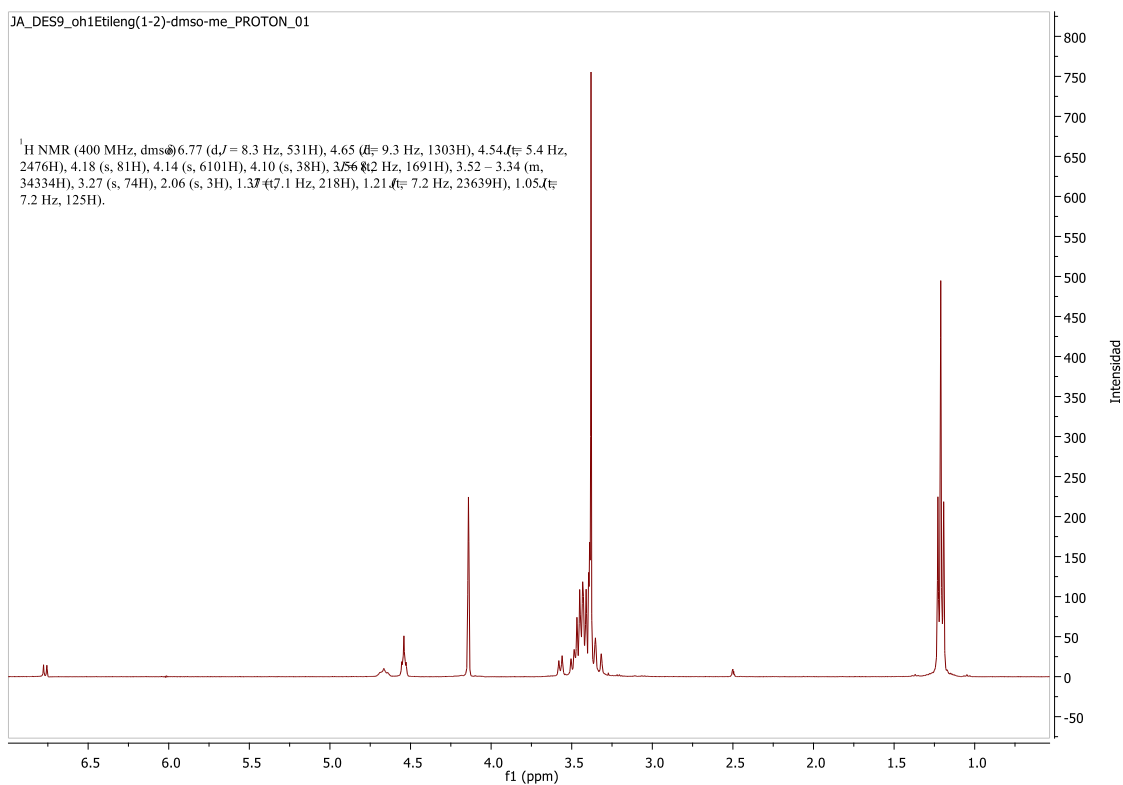


Figura A22. ¹H-RMN DES9.

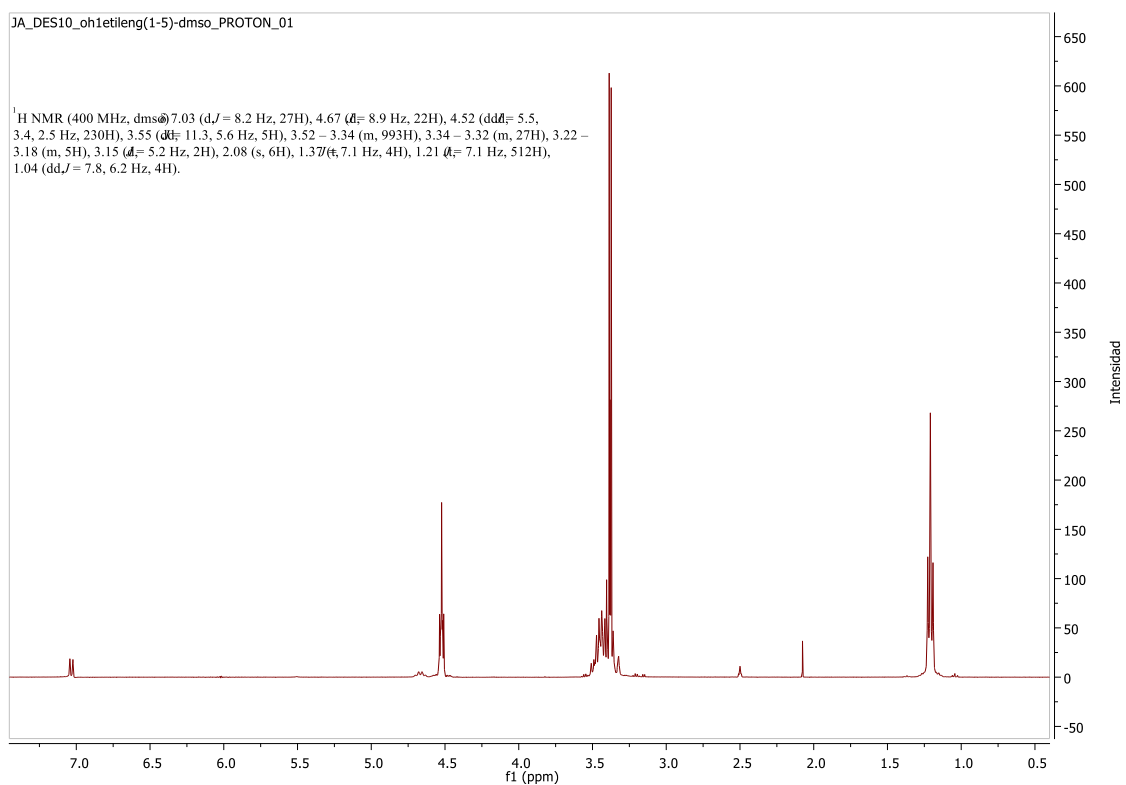


Figura A23. ¹H-RMN DES10.

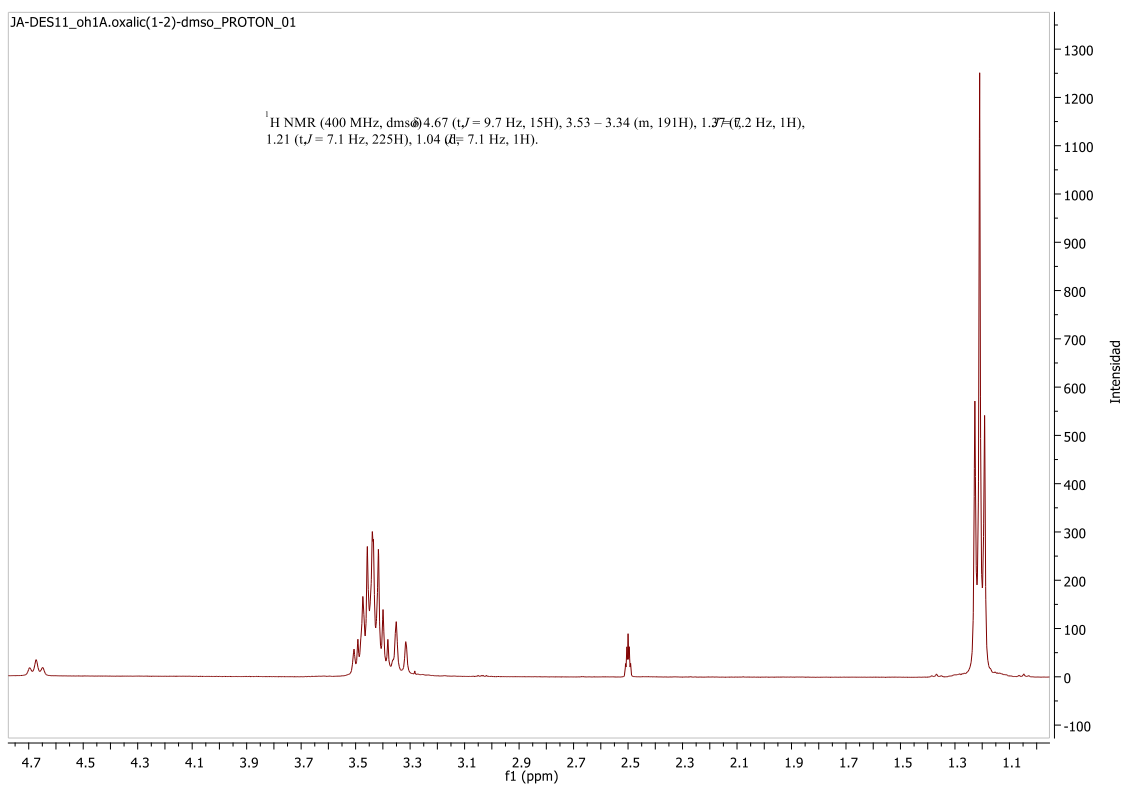


Figura A24. ¹H-RMN DES11.

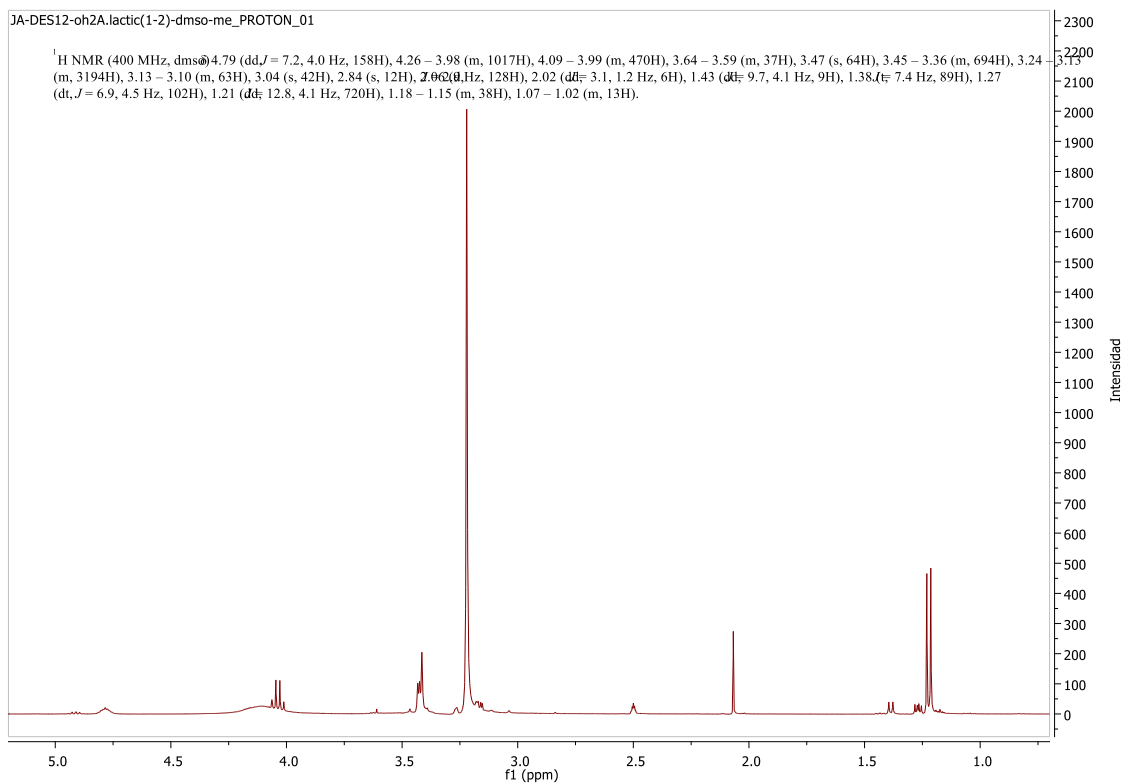


Figura A25. ¹H-RMN DES12.

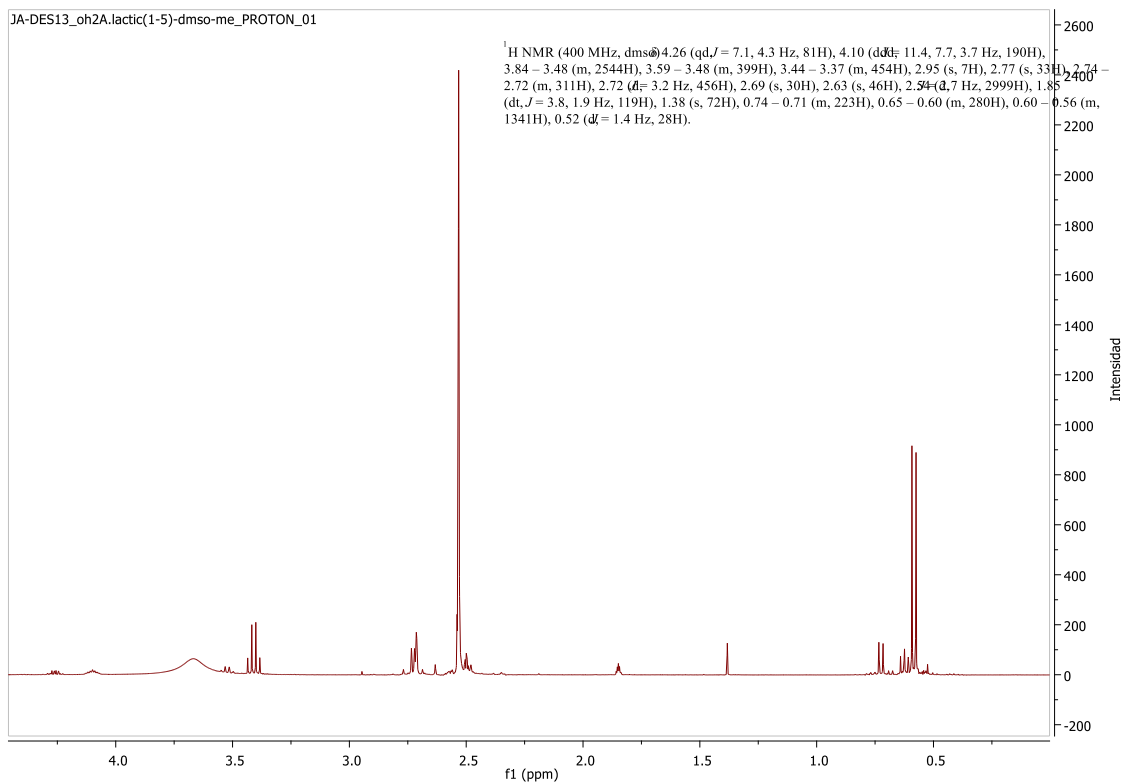


Figura A26. ¹H-RMN DES13.

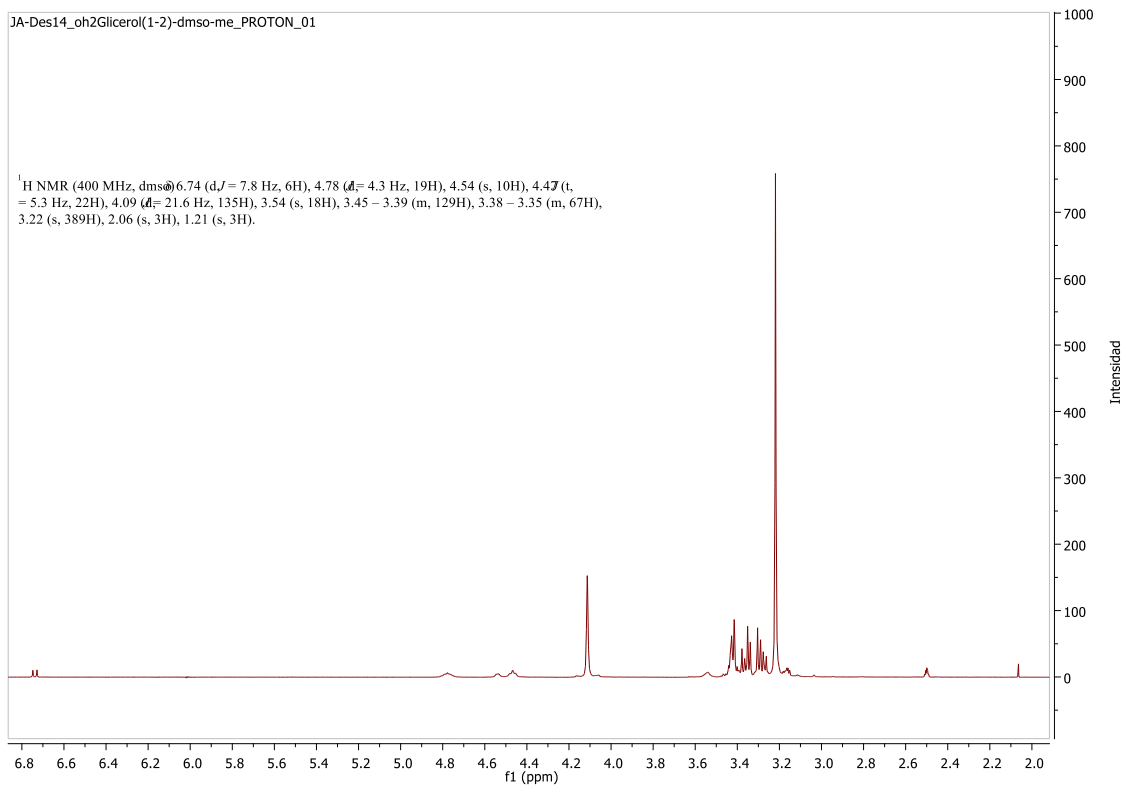


Figura A27. ¹H-RMN DES14.

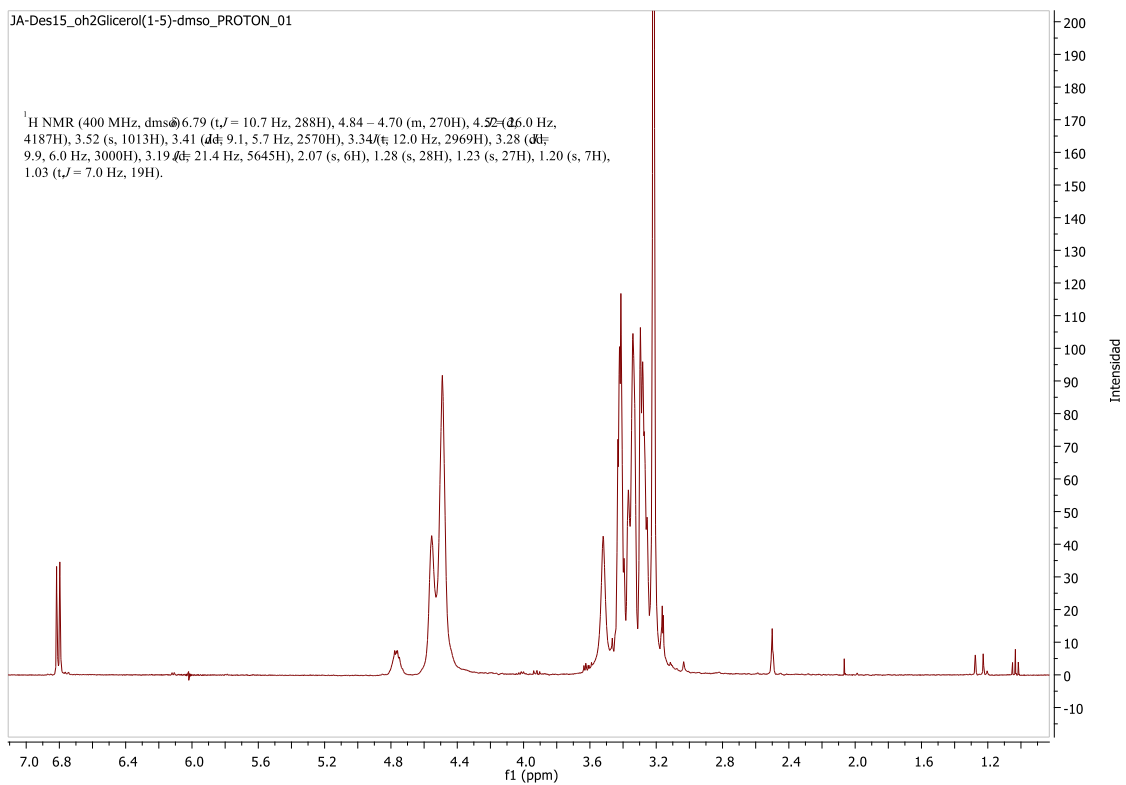


Figura A28. ¹H-RMN DES15.

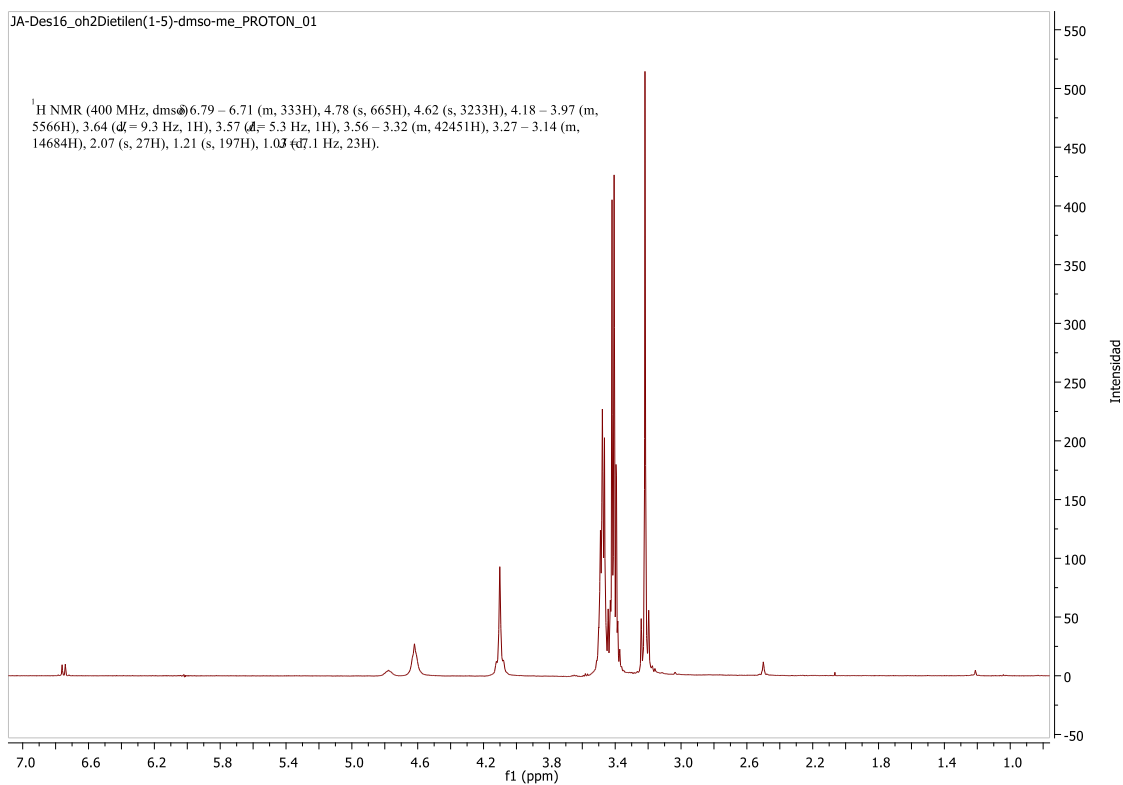


Figura A29. ¹H-RMN DES16.

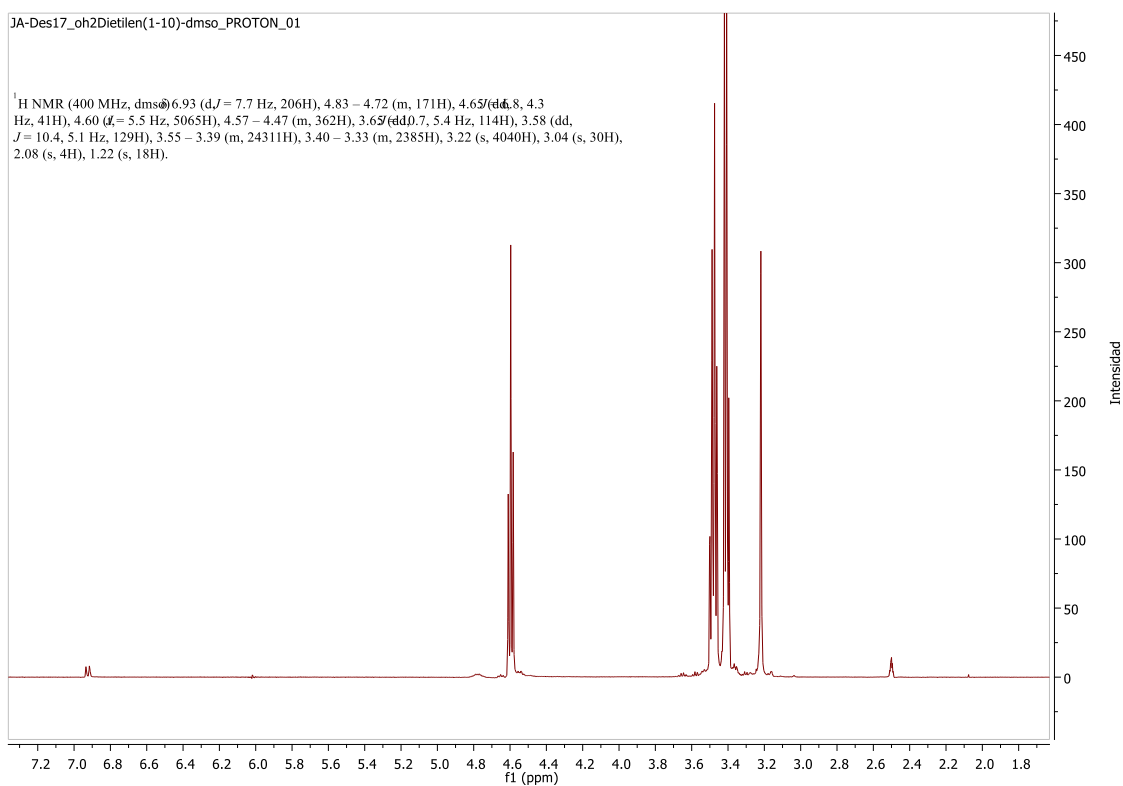


Figura A30. ¹H-RMN DES17.

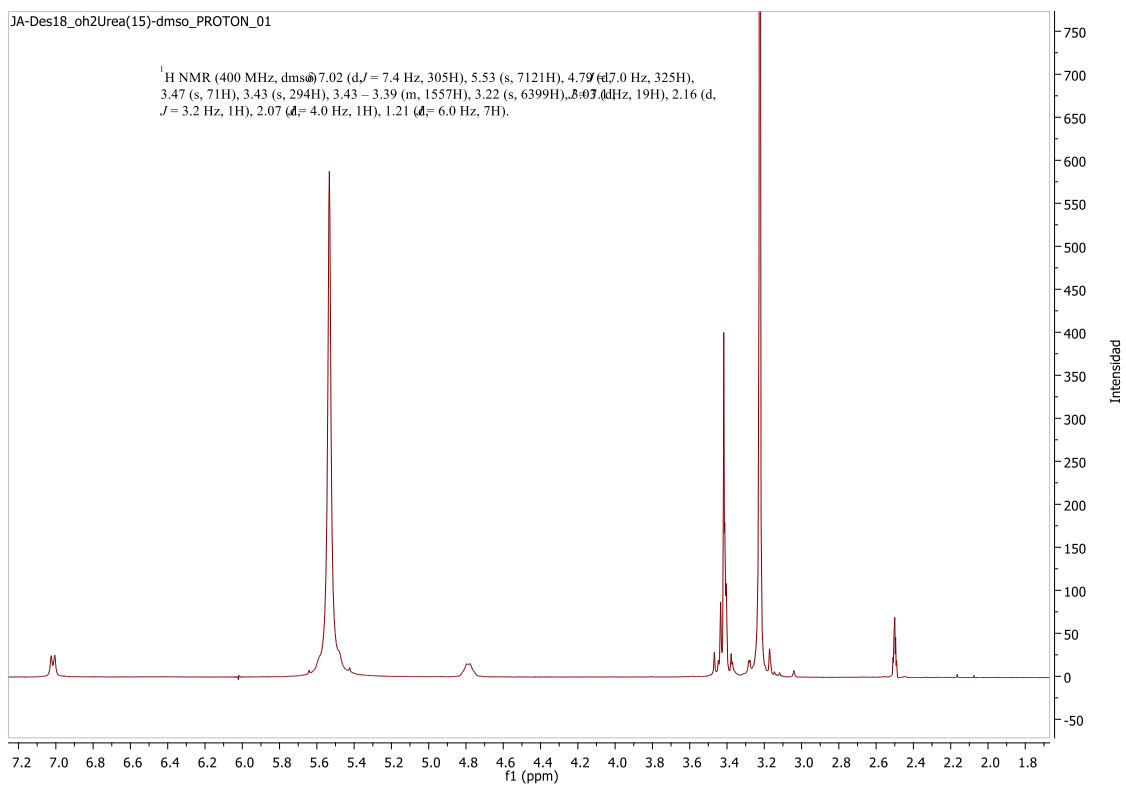


Figura A31. ¹H-RMN DES18.

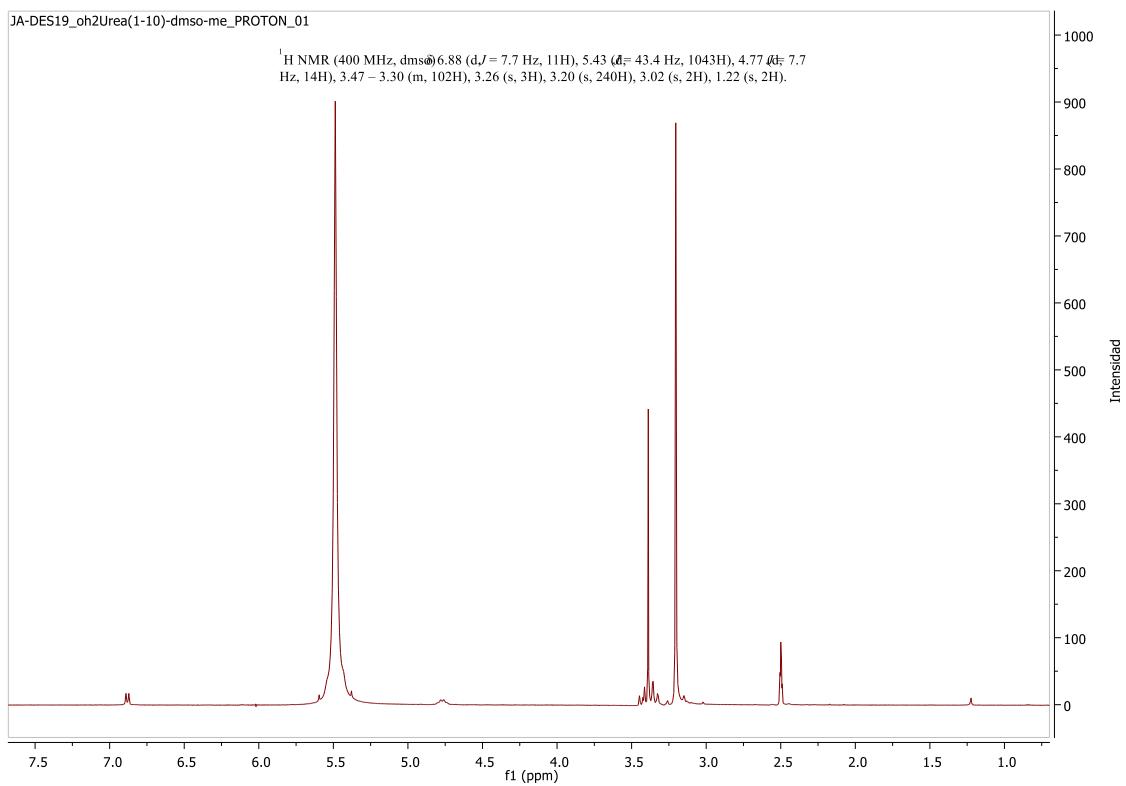


Figura A32. ¹H-RMN DES19.

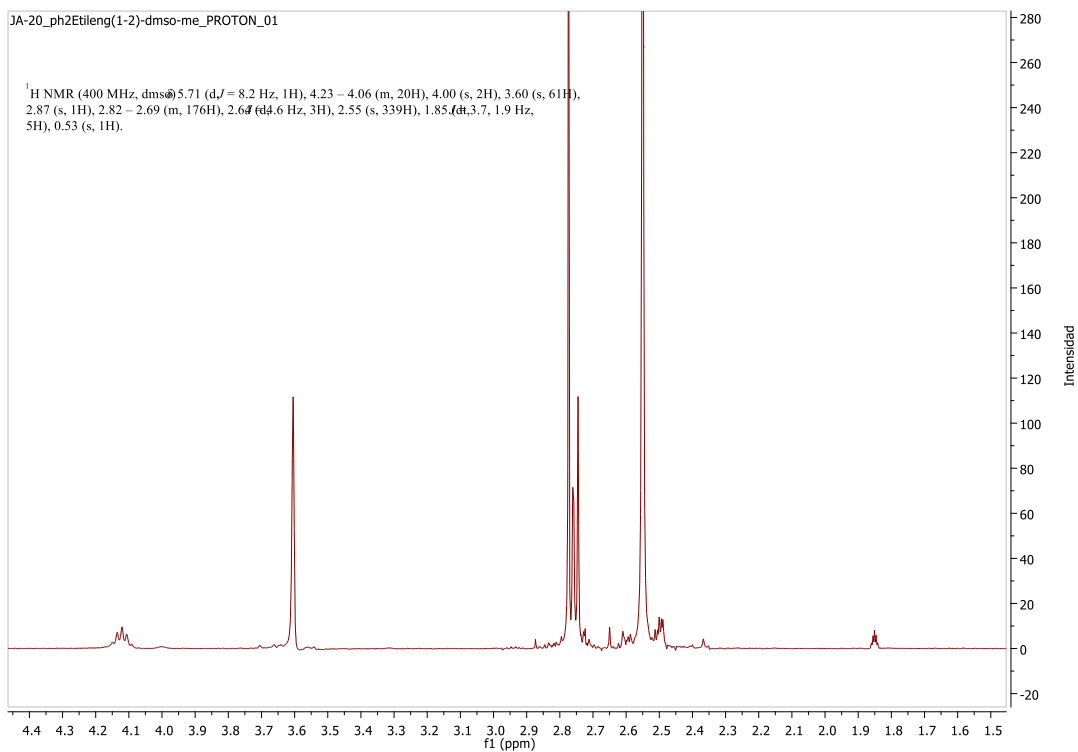


Figura A33. ¹H-RMN DES20.

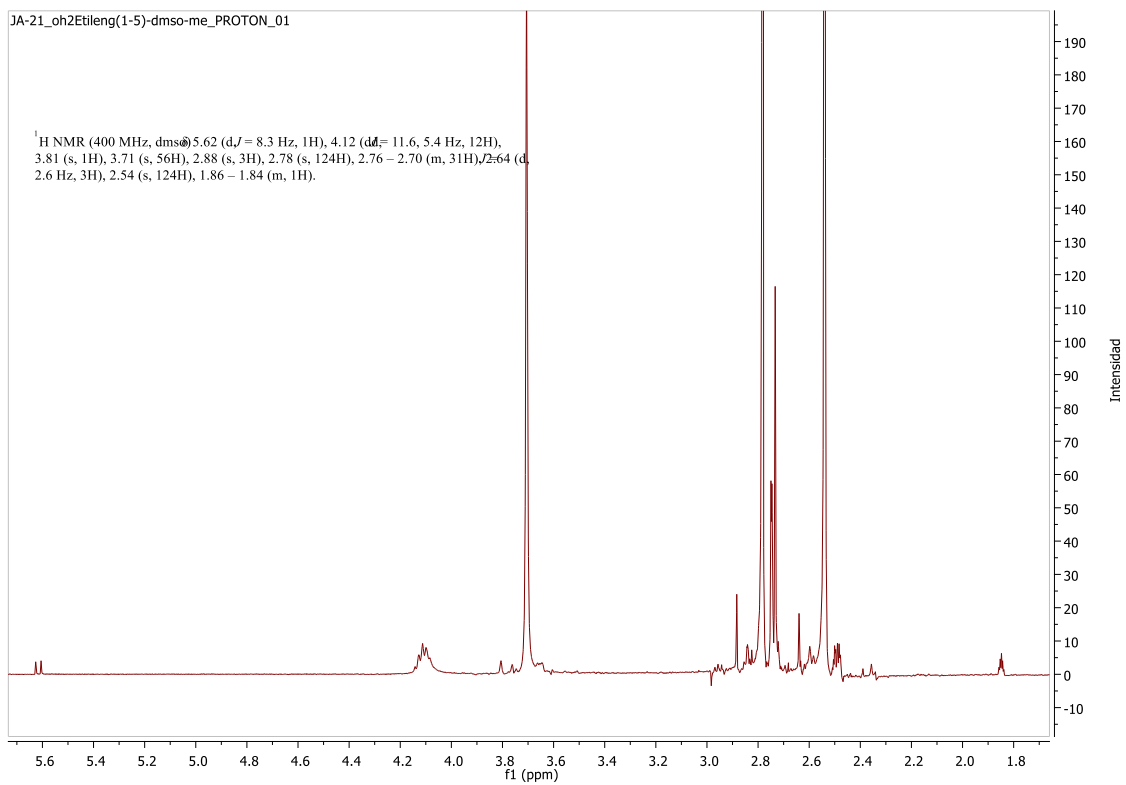


Figura A34. ¹H-RMN DES21.

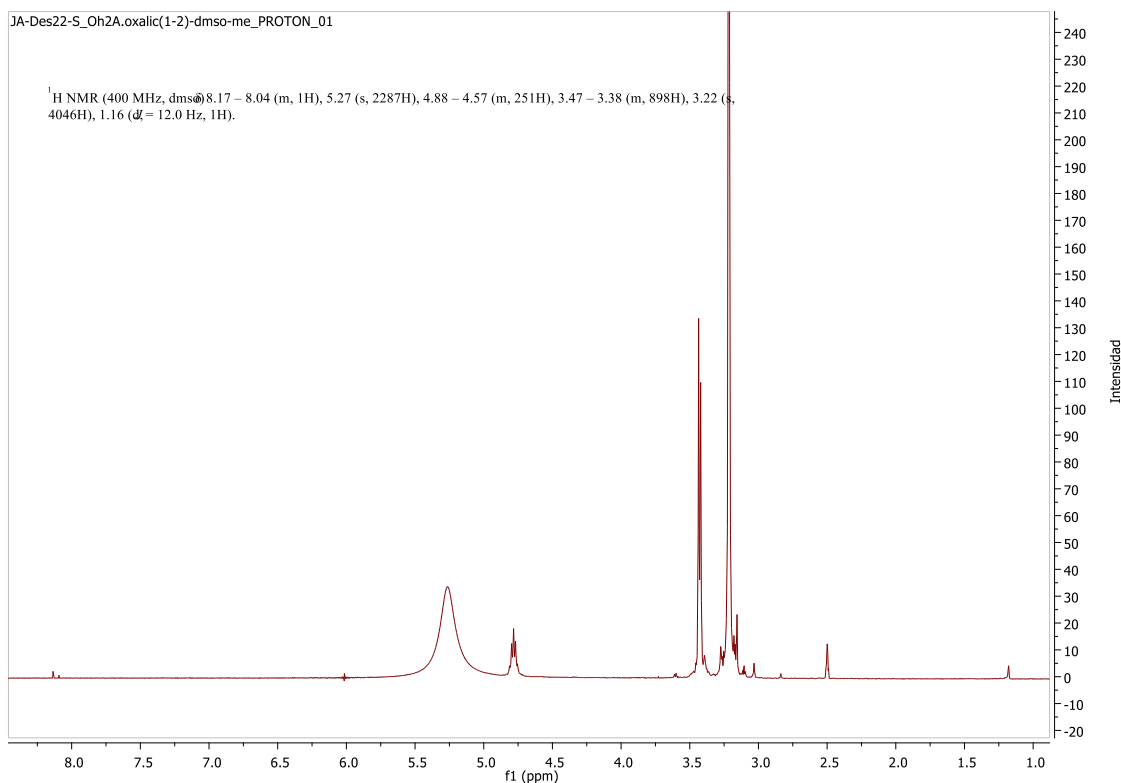


Figura A35. ¹H-RMN DES22.

INFORMES DES's

DES 1. (¹H NMR; 400 MHz; dmsd) δ 4.93 – 4.89 (m, 2H), 4.67 (t, $J = 9.6$ Hz, 4H), 4.17 (dd, $J = 6.9, 3.9$ Hz, 2H), 4.04 (q, $J = 6.9$ Hz, 12H), 3.44 (tdd, $J = 21.2, 14.1, 6.9$ Hz, 65H), 3.03 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.08 – 2.07 (m, 3H), 1.40 – 1.37 (m, 6H), 1.29 – 1.24 (m, 9H), 1.20 (dd, $J = 10.3, 4.1$ Hz, 101H), 1.18 – 1.15 (m, 4H)).

DES2. (¹H NMR; 400 MHz; dmsd) δ 4.95 – 4.87 (m, 7H), 4.67 (t, $J = 9.4$ Hz, 6H), 4.22 – 4.13 (m, 9H), 4.03 (q, $J = 6.9$ Hz, 27H), 3.52 – 3.35 (m, 63H), 3.33 (s, 6H), 3.04 (q, $J = 7.3$ Hz, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.45 – 1.41 (m, 3H), 1.40 – 1.36 (m, 15H), 1.29 – 1.24 (m, 19H), 1.24 – 1.18 (m, 149H), 1.16 (d, $J = 8.5$ Hz, 5H)).

DES3. (¹H NMR; 400 MHz; dmsd) δ 6.98 (s, 6H), 4.65 (s, 9H), 4.46 (s, 82H), 3.34 (ddd, $J = 25.1, 16.8, 5.0$ Hz, 288H), 3.04 (s, 3H), 2.07 (s, 1H), 1.20 (s, 118H)).

DES4. (¹H NMR; 400 MHz; dmsd) δ 6.89 (s, 28H), 4.64 (s, 56H), 4.41 (s, 753H), 3.36 (ddd, $J = 28.9, 21.6, 4.4$ Hz, 1962H), 3.05 (s, 14H), 1.39 – 1.33 (m, 1H), 1.21 (s, 526H), 1.07 – 1.02 (m, 2H)).

DES5. (¹H NMR; 400 MHz; dmsd) δ 7.09 (d, $J = 8.2$ Hz, 405H), 4.75 – 4.44 (m, 4109H), 3.65 (t, $J = 5.3$ Hz, 47H), 3.58 (d, $J = 5.3$ Hz, 56H), 3.56 – 3.33 (m, 26319H), 3.25 – 3.21 (m, 160H), 2.08 (s, 18H), 1.39 – 1.34 (m, 1H), 1.28 – 1.12 (m, 8375H), 1.05 (s, 25H)).

DES6. (¹H NMR; 400 MHz; dmsd) δ 7.03 (d, $J = 8.2$ Hz, 284H), 4.60 (t, $J = 5.5$ Hz, 4586H), 3.65 (dd, $J = 10.8, 5.4$ Hz, 26H), 3.60 – 3.56 (m, 64H), 3.53 – 3.32 (m, 27223H), 3.23 (t, $J = 5.3$ Hz, 112H), 2.08 (s, 17H), 1.37 (s, 1H), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 5619H), 1.05 (s, 5H)).

DES7. (¹H NMR; 400 MHz; dmso) δ 7.05 (d, J = 8.2 Hz, 1237H), 5.44 (d, J = 43.3 Hz, 26575H), 4.67 (q, J = 9.2 Hz, 1167H), 3.53 – 3.32 (m, 25257H), 3.30 (s, 1264H), 2.08 (s, 2H), 1.37 (t, J = 7.1 Hz, 112H), 1.32 – 1.10 (m, 24887H), 1.08 – 1.00 (m, 1H)).

DES8. (¹H NMR; 400 MHz; dmso) δ 7.02 (d, J = 7.0 Hz, 42H), 5.48 (s, 1972H), 4.66 (d, J = 7.9 Hz, 44H), 3.55 – 3.32 (m, 853H), 3.30 (s, 60H), 3.26 (s, 43H), 2.08 (s, 3H), 1.36 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 880H), 1.03 (d, J = 11.1 Hz, 1H)).

DES9. (¹H NMR; 400 MHz; dmso) δ 6.77 (d, J = 8.3 Hz, 531H), 4.65 (d, J = 9.3 Hz, 1303H), 4.54 (t, J = 5.4 Hz, 2476H), 4.18 (s, 81H), 4.14 (s, 6101H), 4.10 (s, 38H), 3.56 (t, J = 8.2 Hz, 1691H), 3.52 – 3.34 (m, 34334H), 3.27 (s, 74H), 2.06 (s, 3H), 1.37 (t, J = 7.1 Hz, 218H), 1.21 (t, J = 7.2 Hz, 23639H), 1.05 (t, J = 7.2 Hz, 125H)).

DES10. (¹H 1H NMR; 400 MHz; dmso) δ 7.03 (d, J = 8.2 Hz, 27H), 4.67 (d, J = 8.9 Hz, 22H), 4.52 (ddd, J = 5.5, 3.4, 2.5 Hz, 230H), 3.55 (dd, J = 11.3, 5.6 Hz, 5H), 3.52 – 3.34 (m, 993H), 3.34 – 3.32 (m, 27H), 3.22 – 3.18 (m, 5H), 3.15 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 2.08 (s, 6H), 1.37 (t, J = 7.1 Hz, 4H), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 512H), 1.04 (dd, J = 7.8, 6.2 Hz, 4H)).

DES11. (¹H 1H NMR; 400 MHz; dmso) δ 4.67 (t, J = 9.7 Hz, 15H), 3.53 – 3.34 (m, 191H), 1.37 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 225H), 1.04 (d, J = 7.1 Hz, 1H)).

DES12. (¹H NMR; 400 MHz; dmso) δ 4.79 (dd, J = 7.2, 4.0 Hz, 158H), 4.26 – 3.98 (m, 1017H), 4.09 – 3.99 (m, 470H), 3.64 – 3.59 (m, 37H), 3.47 (s, 64H), 3.45 – 3.36 (m, 694H), 3.24 – 3.13 (m, 3194H), 3.13 – 3.10 (m, 63H), 3.04 (s, 42H), 2.84 (s, 12H), 2.06 (d, J = 2.9 Hz, 128H), 2.02 (dd, J = 3.1, 1.2 Hz, 6H), 1.43 (dd, J = 9.7, 4.1 Hz, 9H), 1.38 (t, J = 7.4 Hz, 89H), 1.27 (dt, J = 6.9, 4.5 Hz, 102H), 1.21 (dd, J = 12.8, 4.1 Hz, 720H), 1.18 – 1.15 (m, 38H), 1.07 – 1.02 (m, 13H)).

DES13. (¹H NMR; 400 MHz; dmso) δ 4.26 (qd, J = 7.1, 4.3 Hz, 81H), 4.10 (ddd, J = 11.4, 7.7, 3.7 Hz, 190H), 3.84 – 3.48 (m, 2544H), 3.59 – 3.48 (m, 399H), 3.44 – 3.37 (m, 454H), 2.95 (s, 7H), 2.77 (s, 33H), 2.74 – 2.72 (m, 311H), 2.72 (d, J = 3.2 Hz, 456H), 2.69 (s, 30H), 2.63 (s, 46H), 2.54 (d, J = 2.7 Hz, 2999H), 1.85 (dt, J = 3.8, 1.9 Hz, 119H), 1.38 (s, 72H), 0.74 – 0.71 (m, 223H), 0.65 – 0.60 (m, 280H), 0.60 – 0.56 (m, 1341H), 0.52 (d, J = 1.4 Hz, 28H)).

DES14. (¹H NMR; 400 MHz; dmso) δ 6.74 (d, J = 7.8 Hz, 6H), 4.78 (d, J = 4.3 Hz, 19H), 4.54 (s, 10H), 4.47 (t, J = 5.3 Hz, 22H), 4.09 (d, J = 21.6 Hz, 135H), 3.54 (s, 18H), 3.45 – 3.39 (m, 129H), 3.38 – 3.35 (m, 67H), 3.22 (s, 389H), 2.06 (s, 3H), 1.21 (s, 3H)).

DES15. (¹H NMR; 400 MHz; dmso) δ 6.79 (t, J = 10.7 Hz, 288H), 4.84 – 4.70 (m, 270H), 4.52 (d, J = 26.0 Hz, 4187H), 3.52 (s, 1013H), 3.41 (dd, J = 9.1, 5.7 Hz, 2570H), 3.34 (t, J = 12.0 Hz, 2969H), 3.28 (dd, J = 9.9, 6.0 Hz, 3000H), 3.19 (d, J = 21.4 Hz, 5645H), 2.07 (s, 6H), 1.28 (s, 28H), 1.23 (s, 27H), 1.20 (s, 7H), 1.03 (t, J = 7.0 Hz, 19H)).

DES16. (¹H NMR; 400 MHz; dmso) δ 6.79 – 6.71 (m, 333H), 4.78 (s, 665H), 4.62 (s, 3233H), 4.18 – 3.97 (m, 5566H), 3.64 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 3.57 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 3.56 – 3.32 (m, 42451H), 3.27 – 3.14 (m, 14684H), 2.07 (s, 27H), 1.21 (s, 197H), 1.03 (d, J = 7.1 Hz, 23H)).

DES17. (¹H NMR; 400 MHz; dmso) δ 6.93 (d, J = 7.7 Hz, 206H), 4.83 – 4.72 (m, 171H), 4.65 (dd, J = 6.8, 4.3 Hz, 41H), 4.60 (t, J = 5.5 Hz, 5065H), 4.57 – 4.47 (m, 362H), 3.65 (dd, J = 10.7, 5.4 Hz, 114H), 3.58 (dd, J =

10.4, 5.1 Hz, 129H), 3.55 – 3.39 (m, 24311H), 3.40 – 3.33 (m, 2385H), 3.22 (s, 4040H), 3.04 (s, 30H), 2.08 (s, 4H), 1.22 (s, 18H)).

DES18. (^1H NMR; 400 MHz; dmso) δ 7.02 (d, $J = 7.4$ Hz, 305H), 5.53 (s, 7121H), 4.79 (d, $J = 7.0$ Hz, 325H), 3.47 (s, 71H), 3.43 (s, 294H), 3.43 – 3.39 (m, 1557H), 3.22 (s, 6399H), 3.03 (d, $J = 7.1$ Hz, 19H), 2.16 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 2.07 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 1.21 (d, $J = 6.0$ Hz, 7H)).

DES19. (^1H 1H NMR; 400 MHz; dmso) δ 6.88 (d, $J = 7.7$ Hz, 11H), 5.43 (d, $J = 43.4$ Hz, 1043H), 4.77 (d, $J = 7.7$ Hz, 14H), 3.47 – 3.30 (m, 102H), 3.26 (s, 3H), 3.20 (s, 240H), 3.02 (s, 2H), 1.22 (s, 2H).

DES20. (^1H NMR; 400 MHz; dmso) δ 5.71 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.23 – 4.06 (m, 20H), 4.00 (s, 2H), 3.60 (s, 61H), 2.87 (s, 1H), 2.82 – 2.69 (m, 176H), 2.64 (d, $J = 4.6$ Hz, 3H), 2.55 (s, 339H), 1.85 (dt, $J = 3.7, 1.9$ Hz, 5H), 0.53 (s, 1H)).

DES21. (^1H NMR; 400 MHz; dmso) δ 5.62 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.12 (dd, $J = 11.6, 5.4$ Hz, 12H), 3.81 (s, 1H), 3.71 (s, 56H), 2.88 (s, 3H), 2.78 (s, 124H), 2.76 – 2.70 (m, 31H), 2.64 (d, $J = 2.6$ Hz, 3H), 2.54 (s, 124H), 1.86 – 1.84 (m, 1H)).

DES22. (^1H NMR; 400 MHz; dmso) δ 8.17 – 8.04 (m, 1H), 5.27 (s, 2287H), 4.88 – 4.57 (m, 251H), 3.47 – 3.38 (m, 898H), 3.22 (s, 4046H), 1.16 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H)).

ESPECTROS FT-IR.

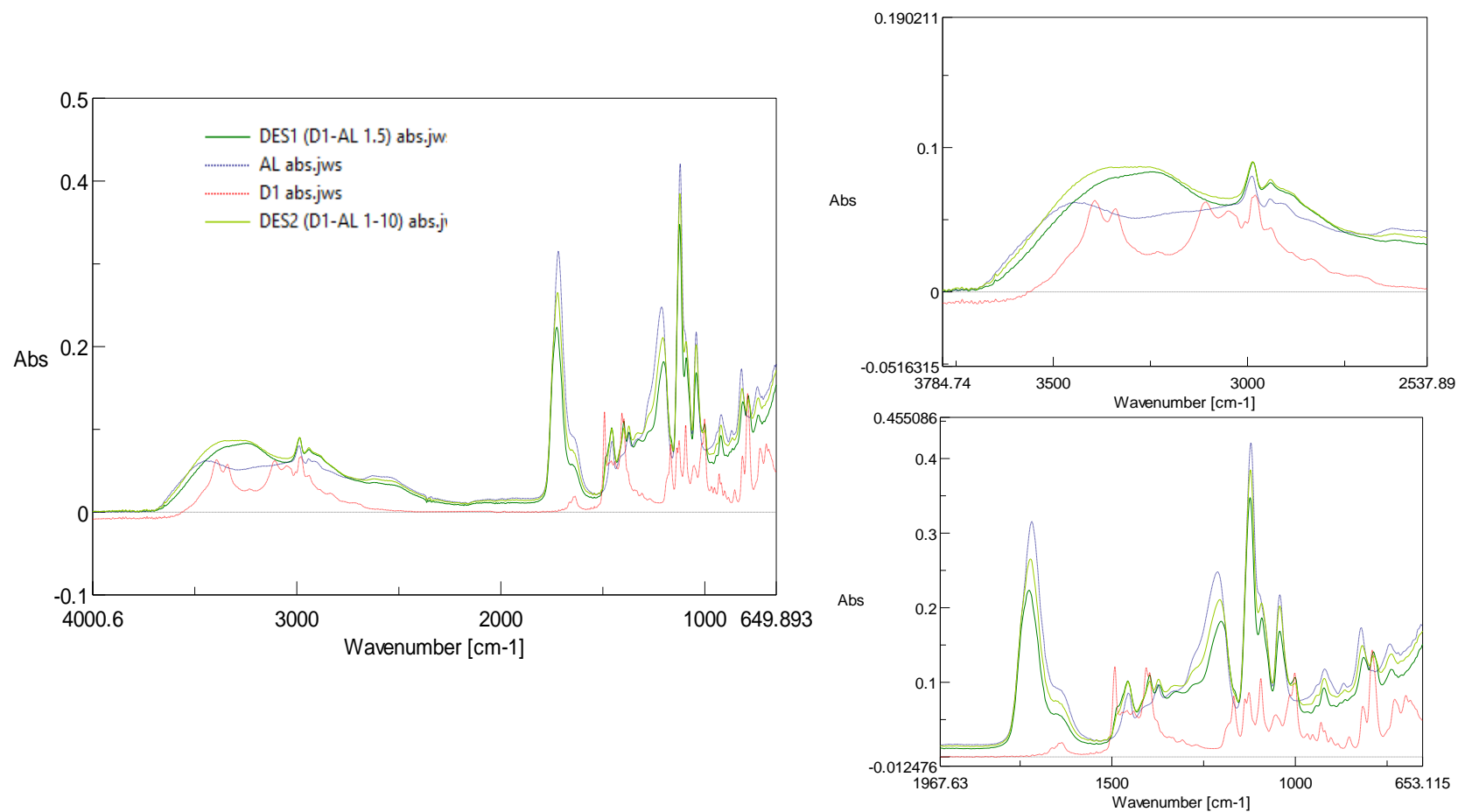


Figura A37. Comparación de los espectros FT-IR de los DES's conformados por la Disal 1 (D1) como HBA y ácido láctico (AL) como HBD. Línea verde oscuro y verde claro: DES 1 (D1:AL en relación molar (rm) 1:5) y DES 2 (D1:AL en rm 1:10) respectivamente. Línea punteada azul y roja: LA y D1 correspondientemente.

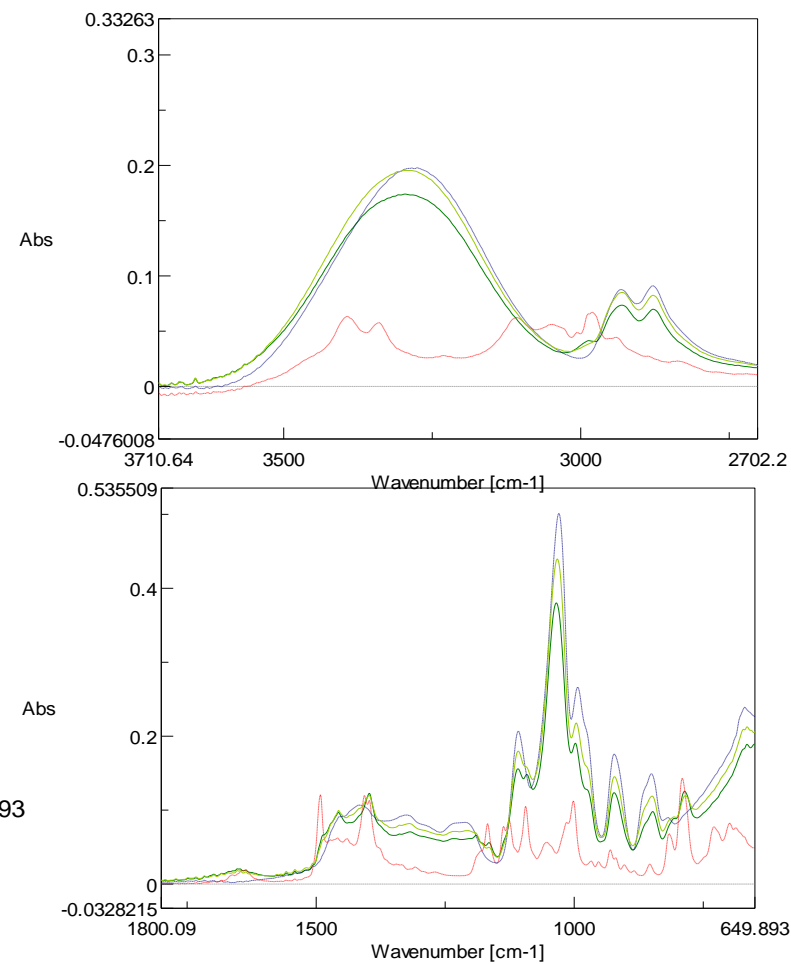
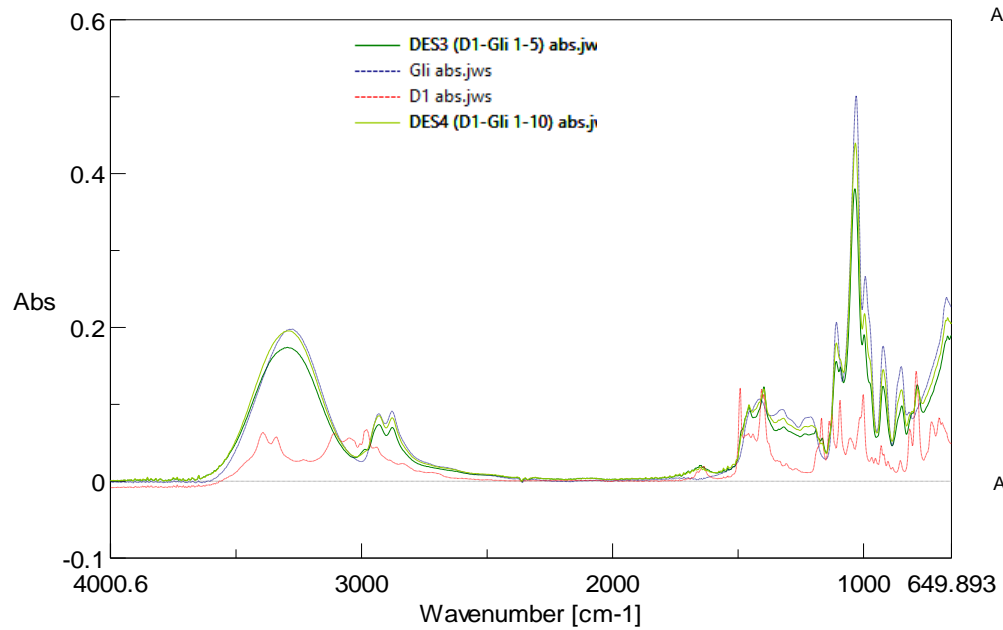


Figura A38. Comparación de los espectros FT-IR de los DES's conformados por la D1 como HBA y Glicerol (Gli) como HBD. Línea verde oscuro y verde claro: DES 3 (D1:Gli rm 1:5) y DES 4 (D1:Gli rm 1:10) respectivamente. Línea punteada azul y roja: Gli y D1 correspondientemente.

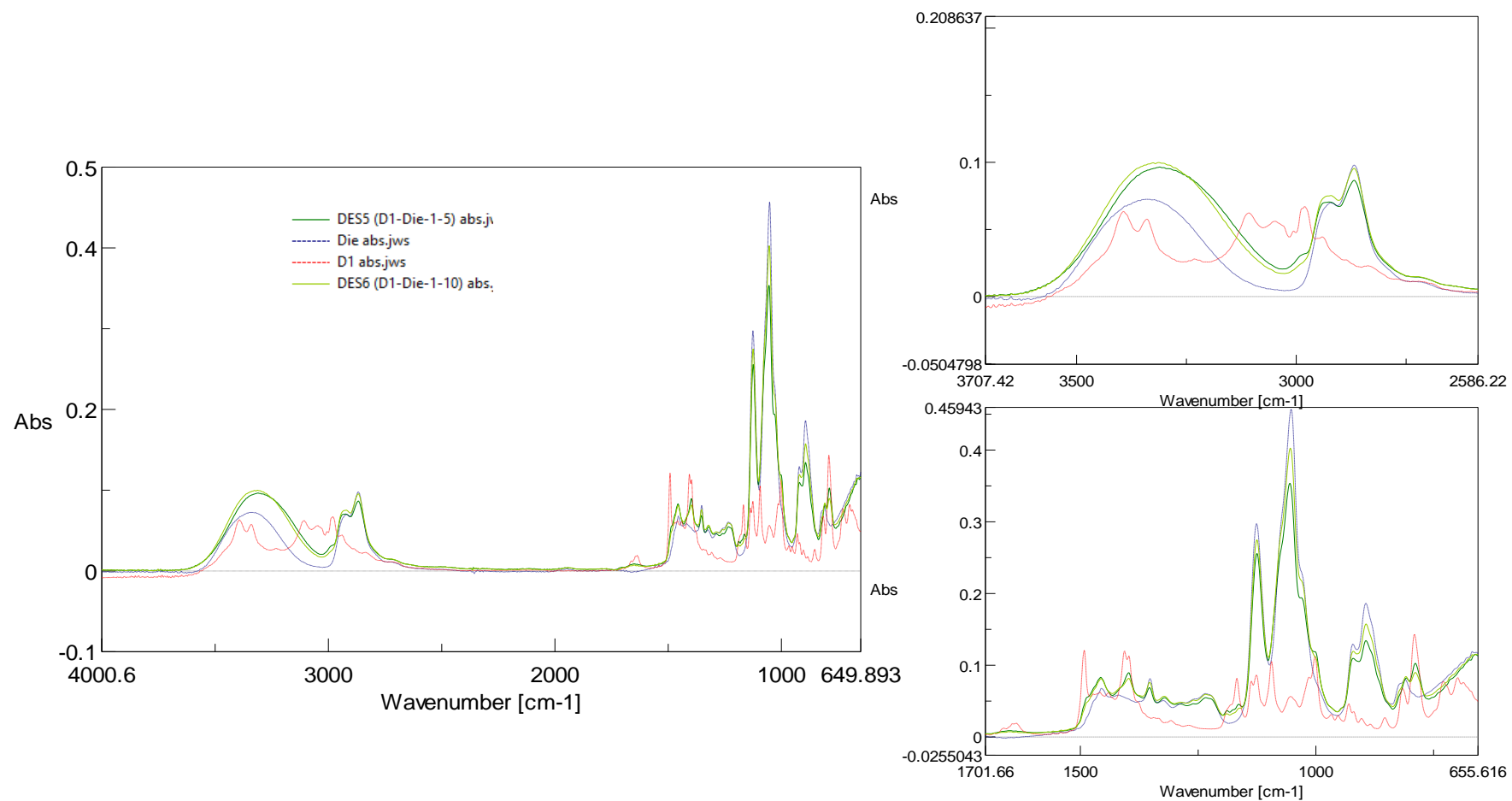


Figura A39. Comparación de los espectros FT-IR de los DES's conformados por la D1 como HBA y Dietilenglicol (Die) como HBD. Línea verde oscuro y verde claro: DES 5 (D1:Die rm 1:5) y DES 6 (D1:Die rm 1:10) respectivamente. Línea punteada azul y roja: Die y D1 correspondientemente.

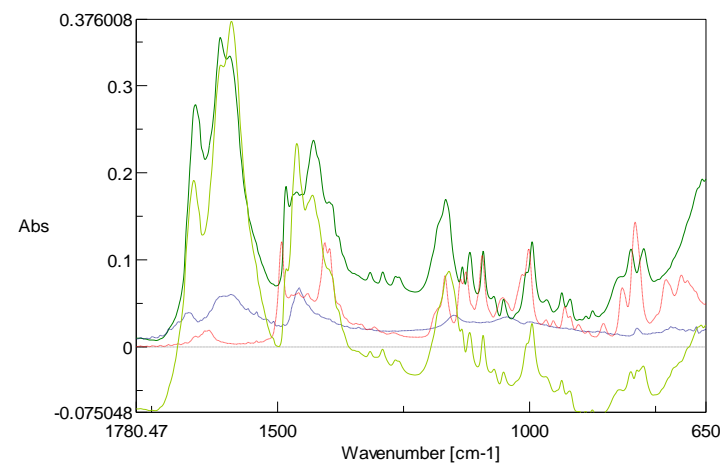
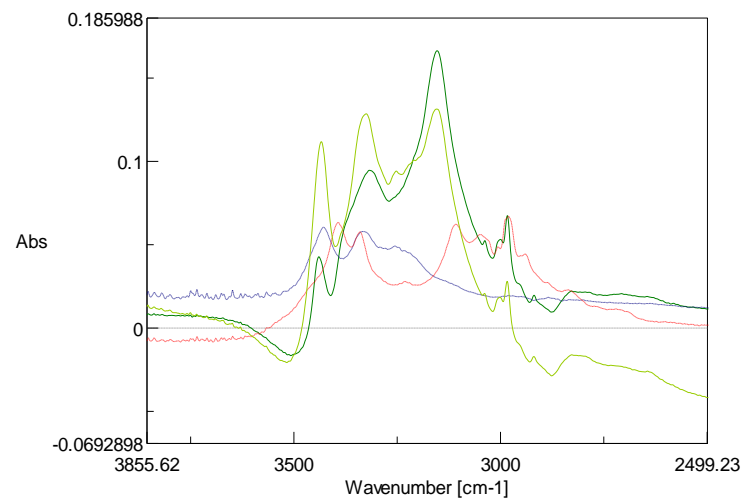
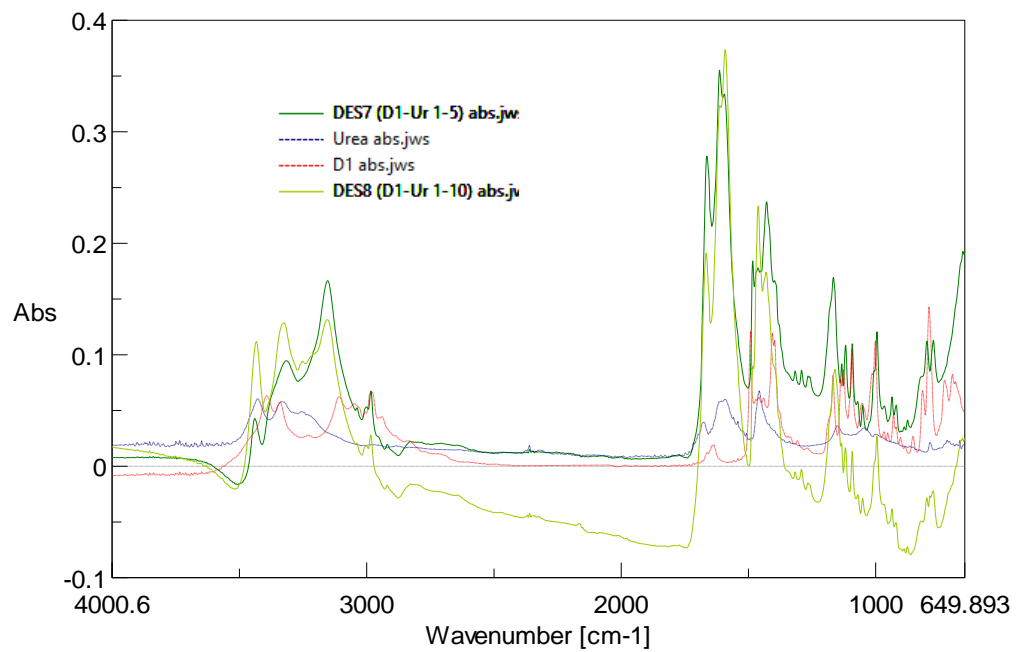


Figura A40. Comparación de los espectros FT-IR de los DES's conformados por la D1 como HBA y Urea (Ur) como HBD. Línea verde oscuro y verde claro: DES 7 (D1:Ur rm 1:5) y DES 8 (D1:Ur rm 1:10) respectivamente. Línea punteada azul y roja: Ur y D1 correspondientemente.

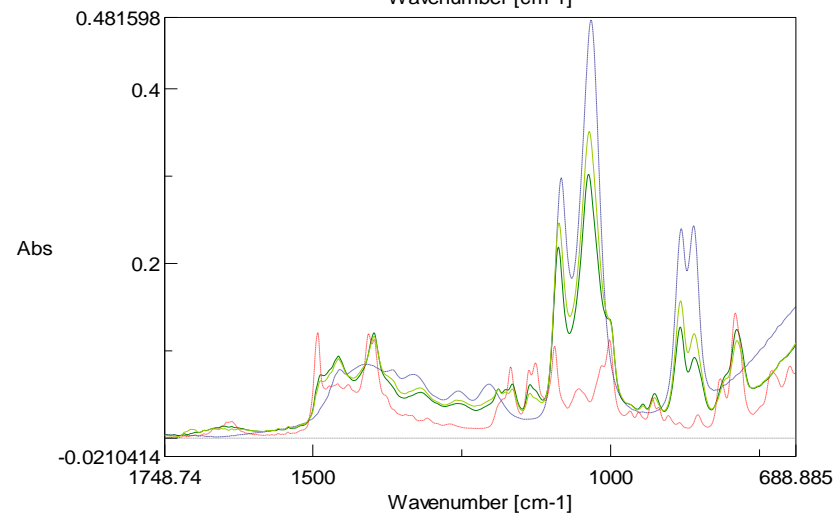
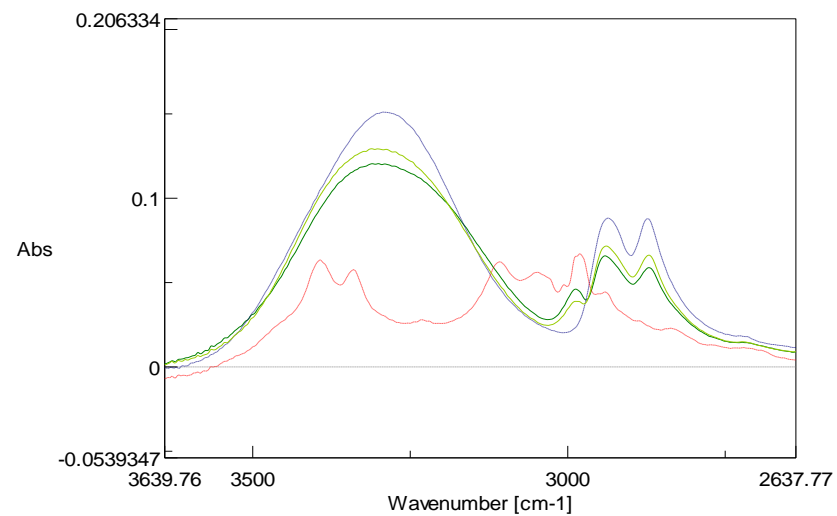
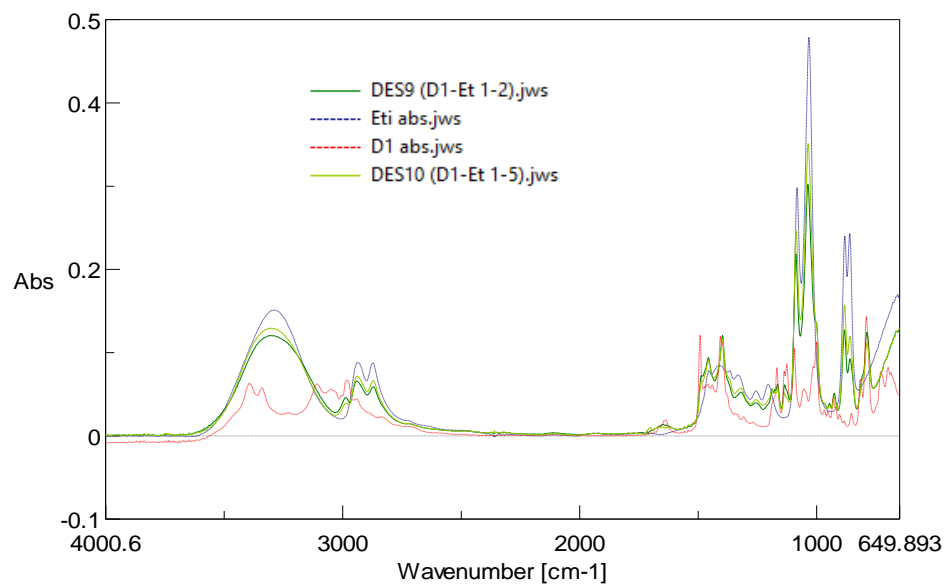


Figura A41. Comparación de los espectros FT-IR de los DES's conformados por la D1 como HBA y Etilenglicol (Eti) como HBD. Línea verde oscuro y verde claro: DES 9 (D1:Eti rm 1:2) y DES 10 (D1:Eti rm 1:5) respectivamente. Línea punteada azul y roja: Eti y D1 correspondientemente

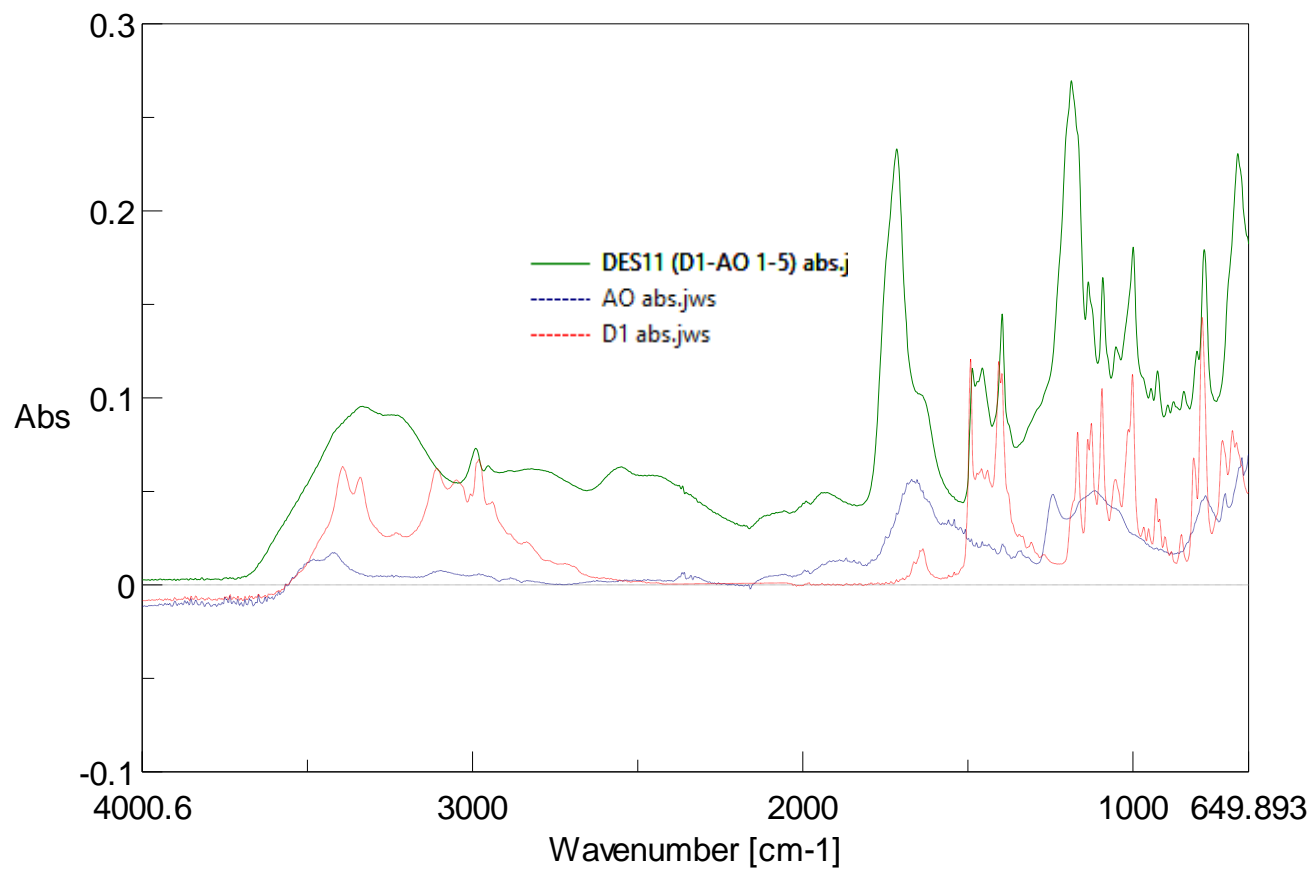


Figura A42. Comparación de los espectros FT-IR del DES conformados por la D1 como HBA y Ácido oxálico (AO) como HBD. Línea verde oscuro: DES 11 (D1:AO rm 1:5). Línea punteada azul y roja: D1y AO respectivamente.

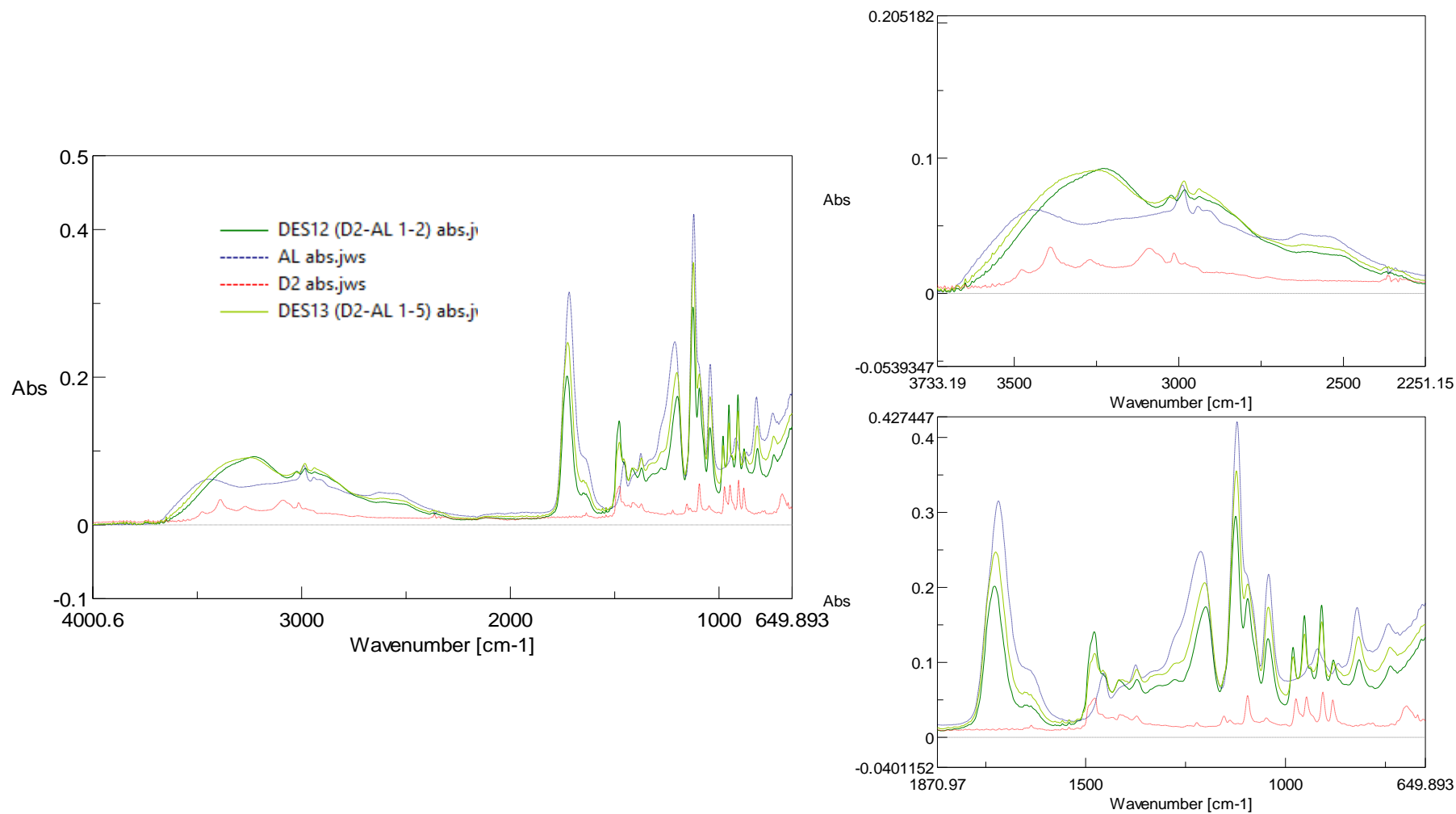


Figura A43. Comparación de los espectros FT-IR de los DES's conformados por la Disal 2 (D2) como HBA y AL como HBD. Línea verde oscuro y verde claro: DES 12 (D2:AL m/m 1:2) y DES 13 (D2:AL m/m 1:5) respectivamente. Línea punteada azul y roja: AL y D2 correspondientemente.

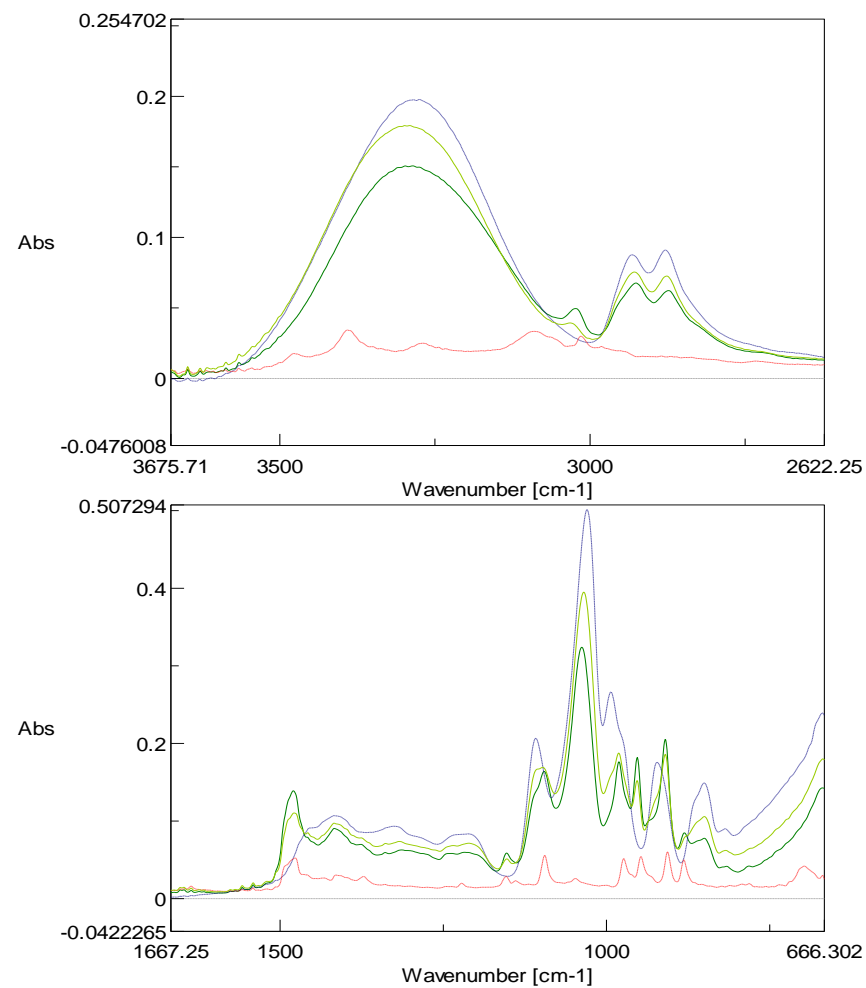
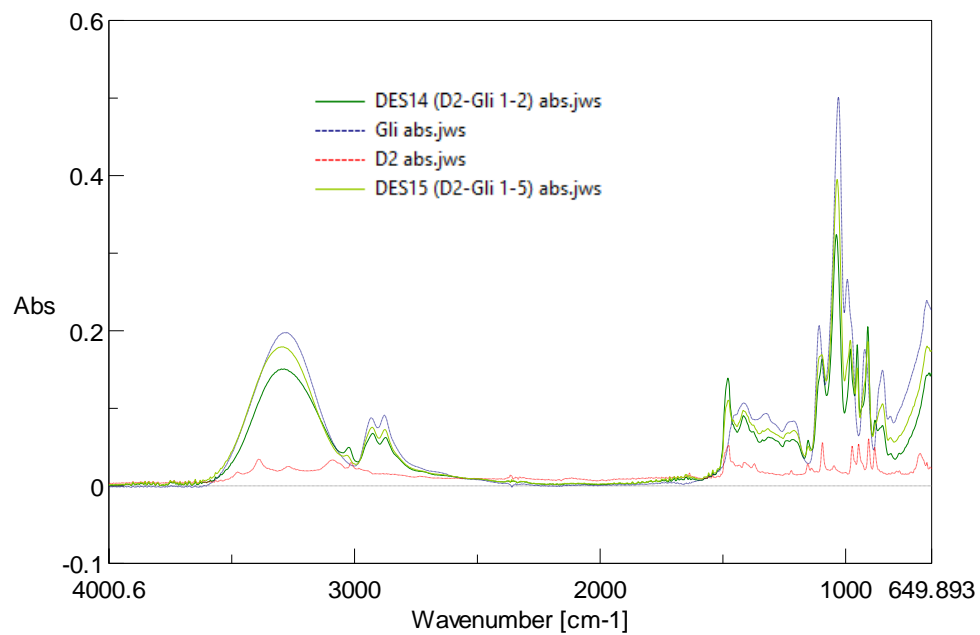


Figura A44. Comparación de los espectros FT-IR de los DES's conformados por la D2 como HBA y Gli como HBD. Línea verde oscuro y verde claro: DES 14 (D2:Gli m/m 1:2) y DES 15 (D2:Gli m/m 1:5) respectivamente. Línea punteada azul y roja: Gli y D2 correspondientemente.

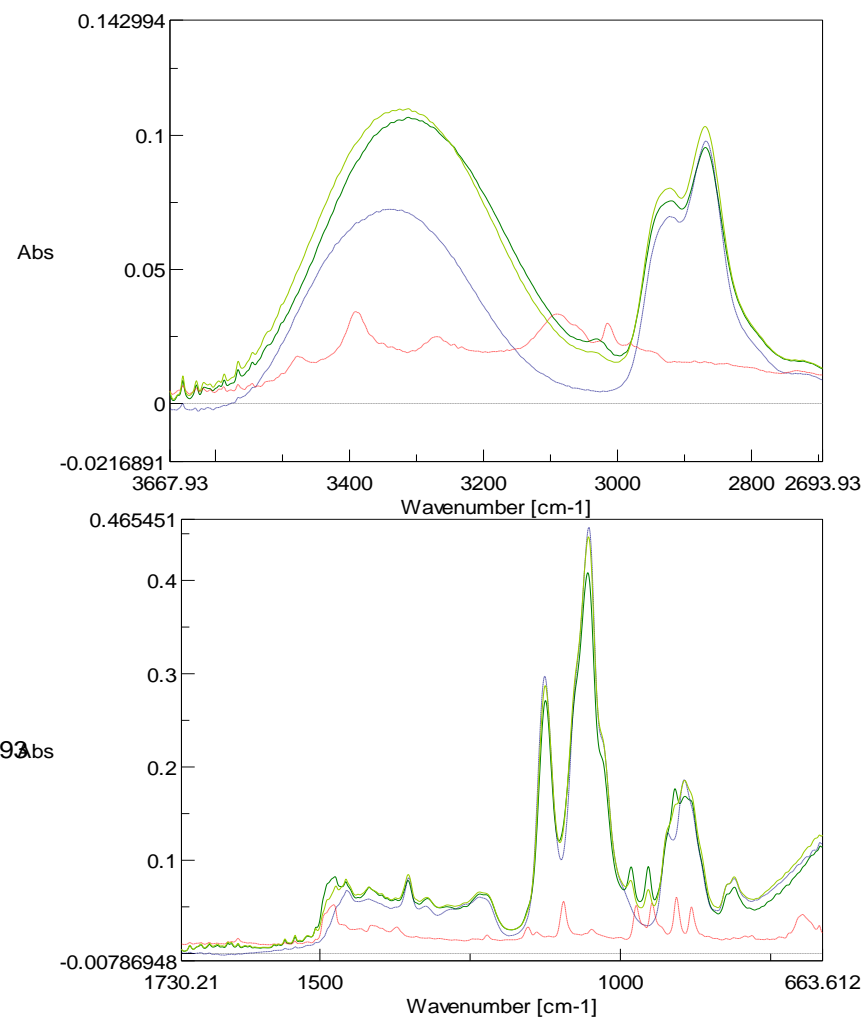
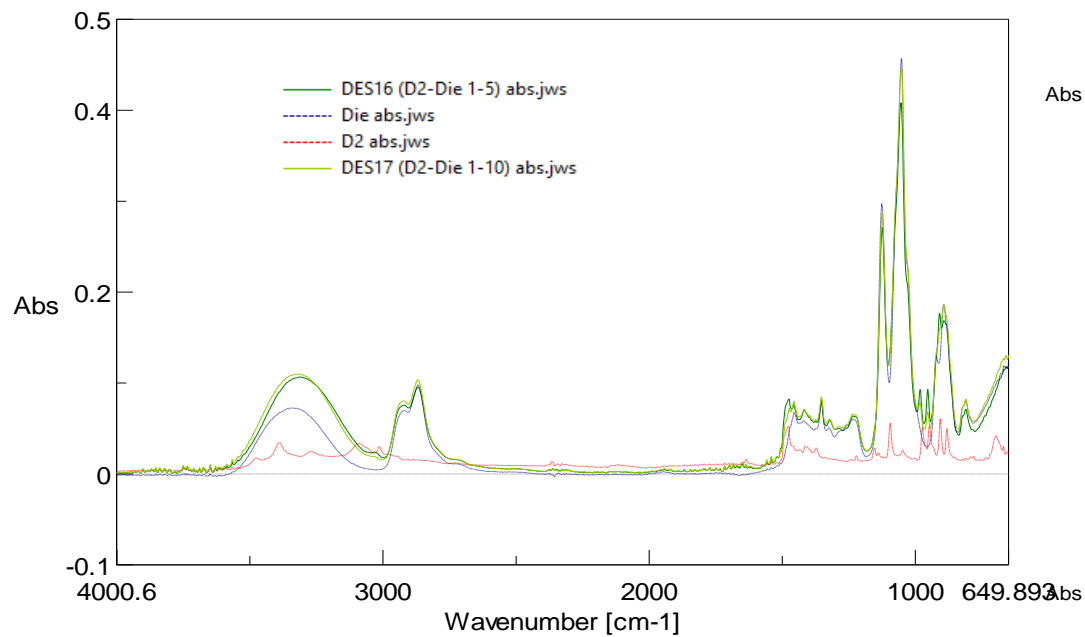


Figura A45. Comparación de los espectros FT-IR de los DES's conformados por la D2 como HBA y Die como HBD. Línea verde oscuro y verde claro: DES 16 (D2:Die m/m 1:5) y DES 17 (D2:Die m/m 1:10) respectivamente. Línea punteada azul y roja: Die y D2 correspondientemente.

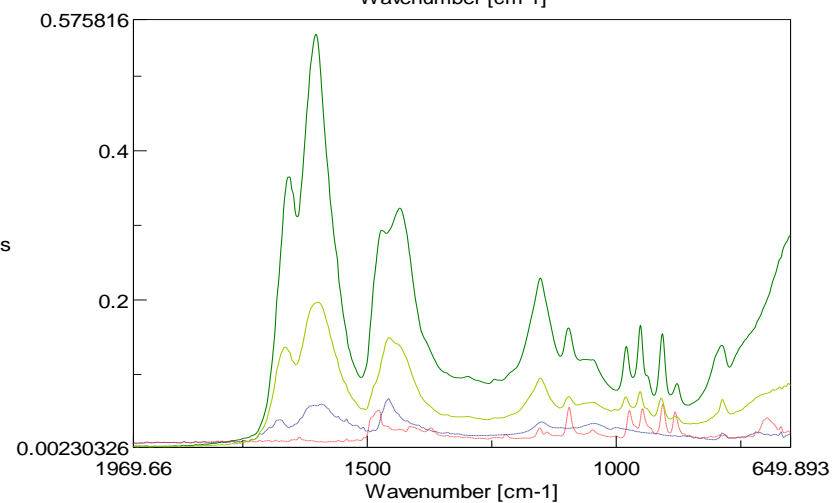
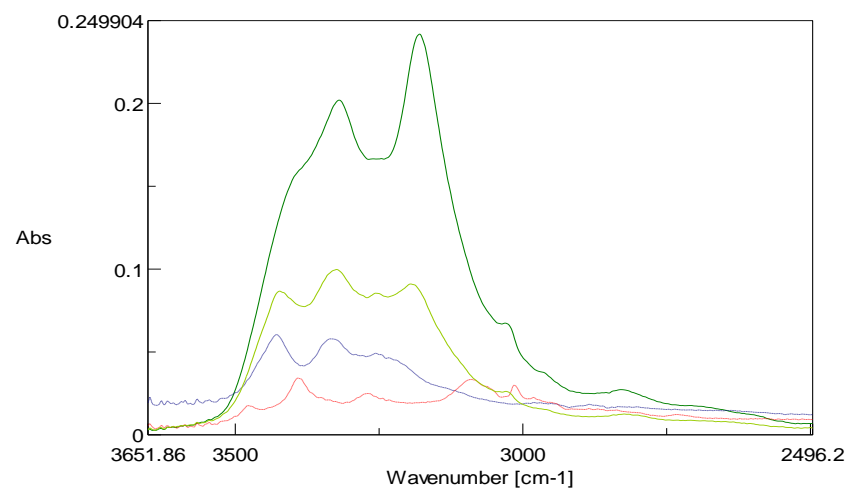
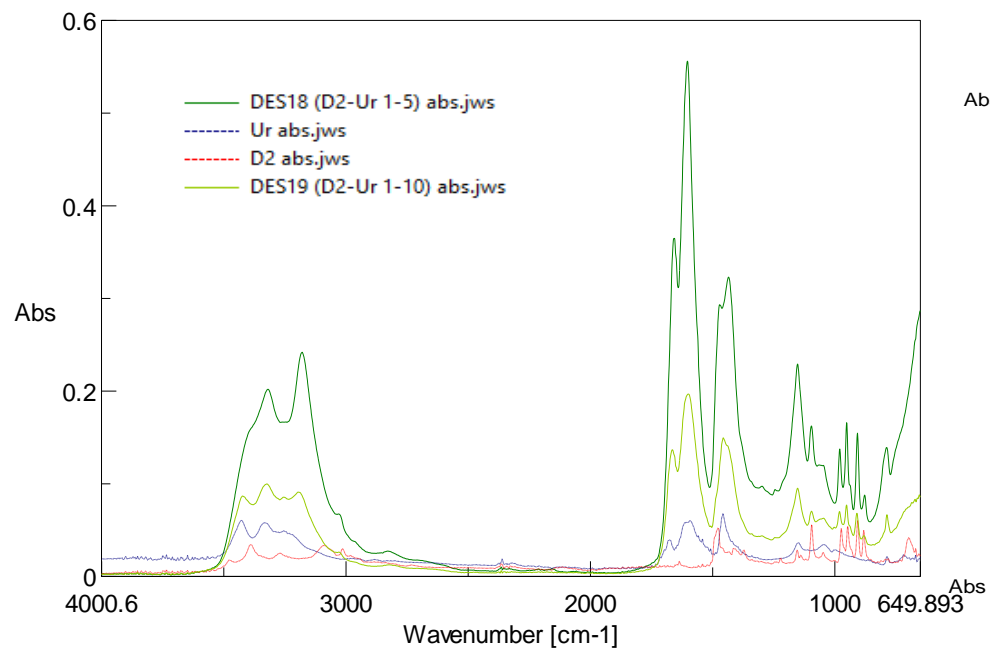


Figura A46. Comparación de los espectros FT-IR de los DES's conformados por la D2 como HBA y Ur como HBD. Línea verde oscuro y verde claro: DES 18 (D2:Ur m/m 1:5) y DES 19 (D2:Ur m/m 1:10) respectivamente. Línea punteada azul y roja: Ur y D2 correspondientemente.

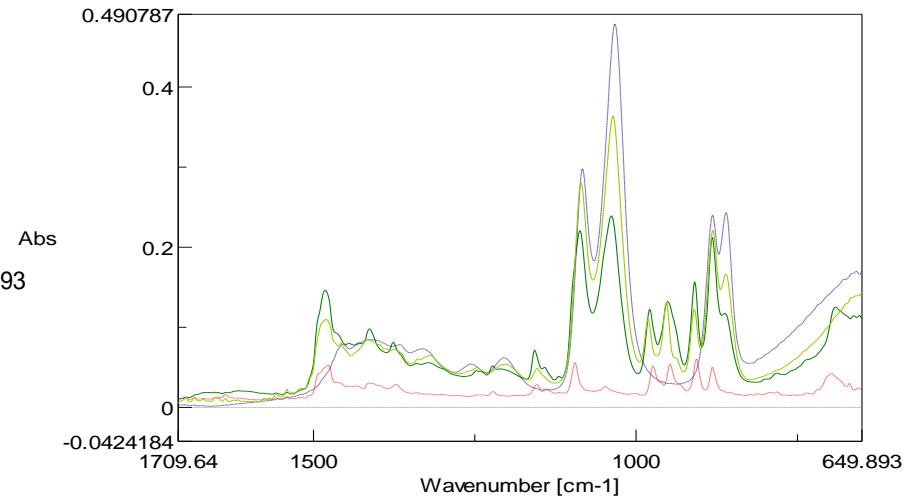
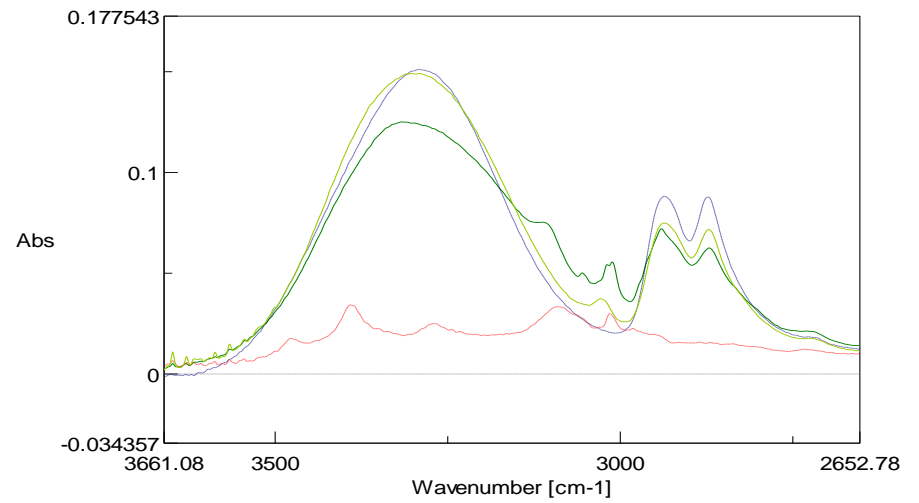
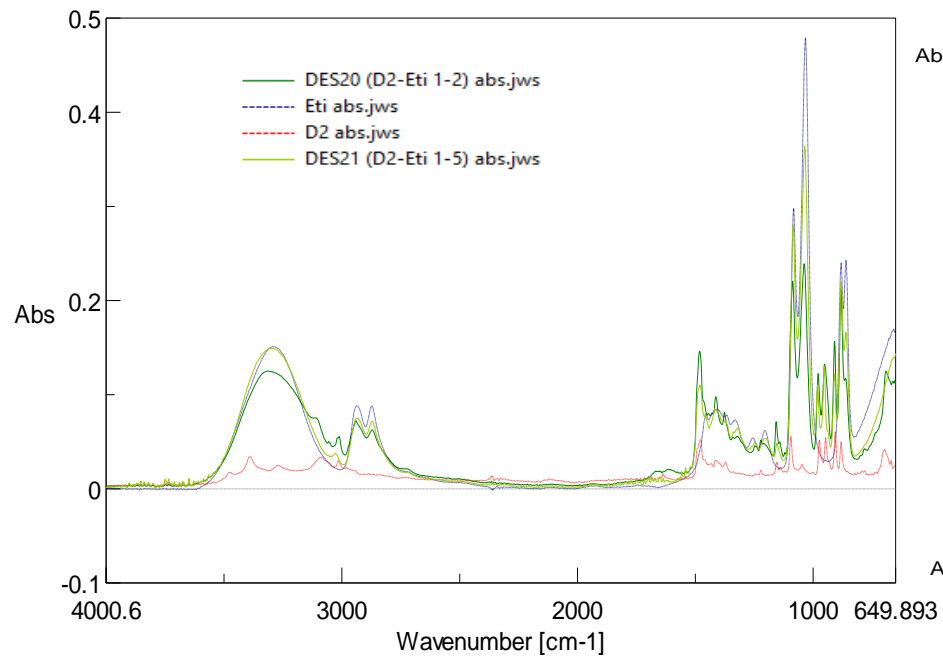


Figura A47. Comparación de los espectros FT-IR de los DES's conformados por la D2 como HBA y Eti como HBD. Línea verde oscuro y verde claro: DES 20 (D2:Eti m/m 1:2) y DES 21 (D2:Eti m/m 1:5) respectivamente. Línea punteada azul y roja: Eti y D2 correspondientemente.

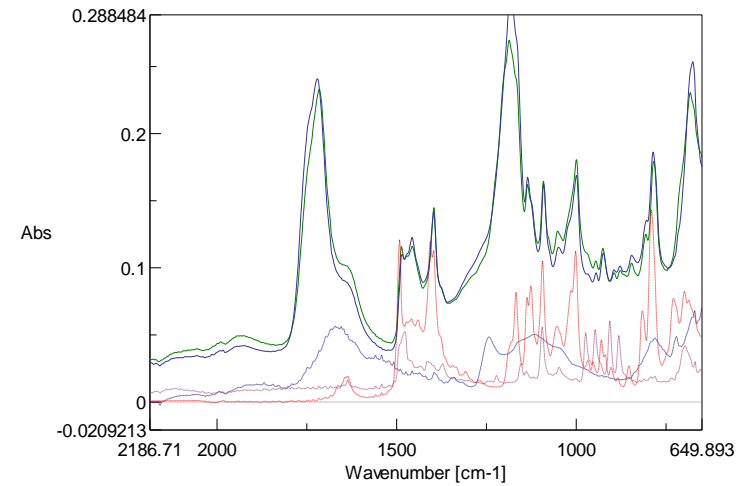
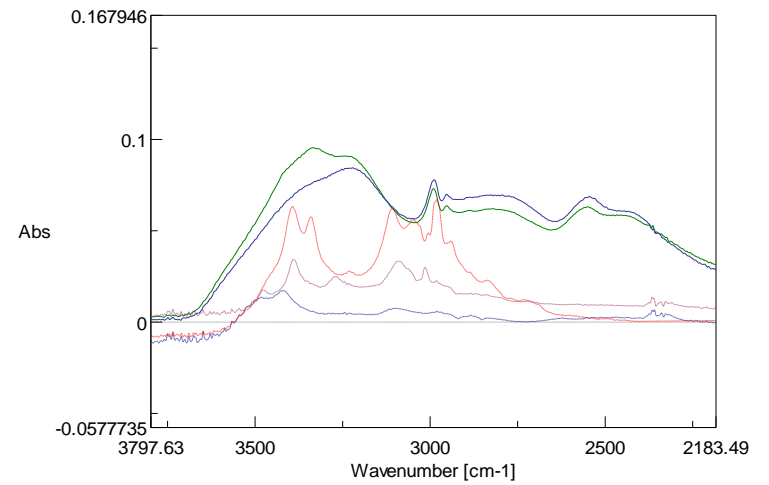
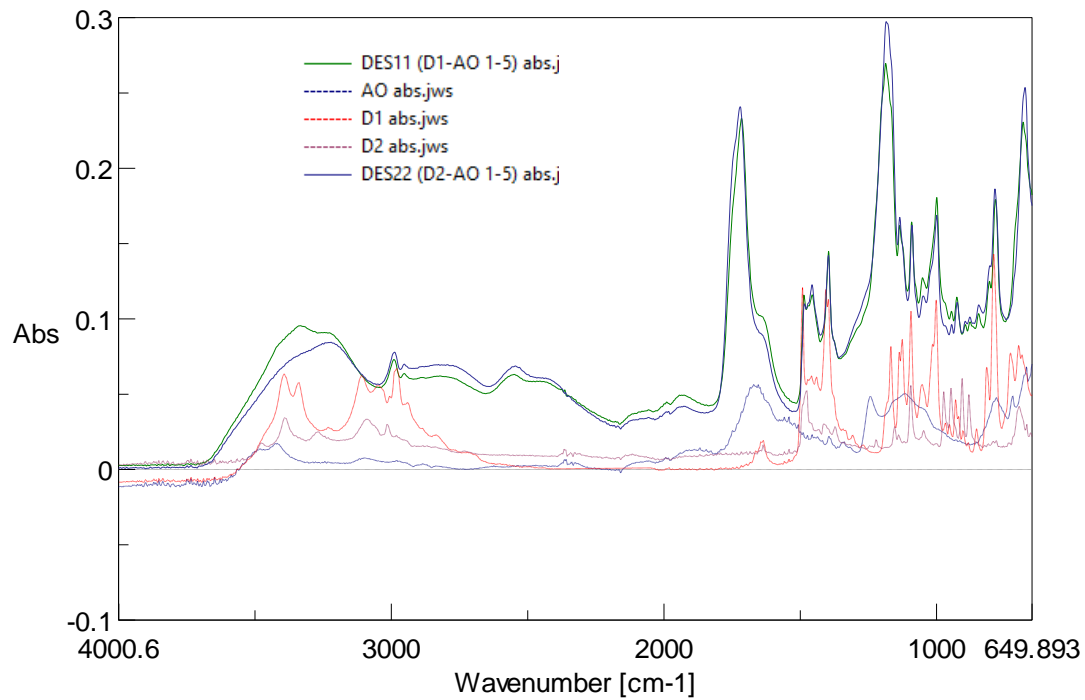


Figura A48. Comparación de los espectros FT-IR de los DES's conformados por las Disales D1 y D2 como HBA y AO como HBD. Líneas continuas verde: DES 11 (D1:AO m/m 1:5), azul: DES 22 (D2:AO m/m 1:5). Líneas punteadas: azul: AO, roja: D1 y morada: D2.

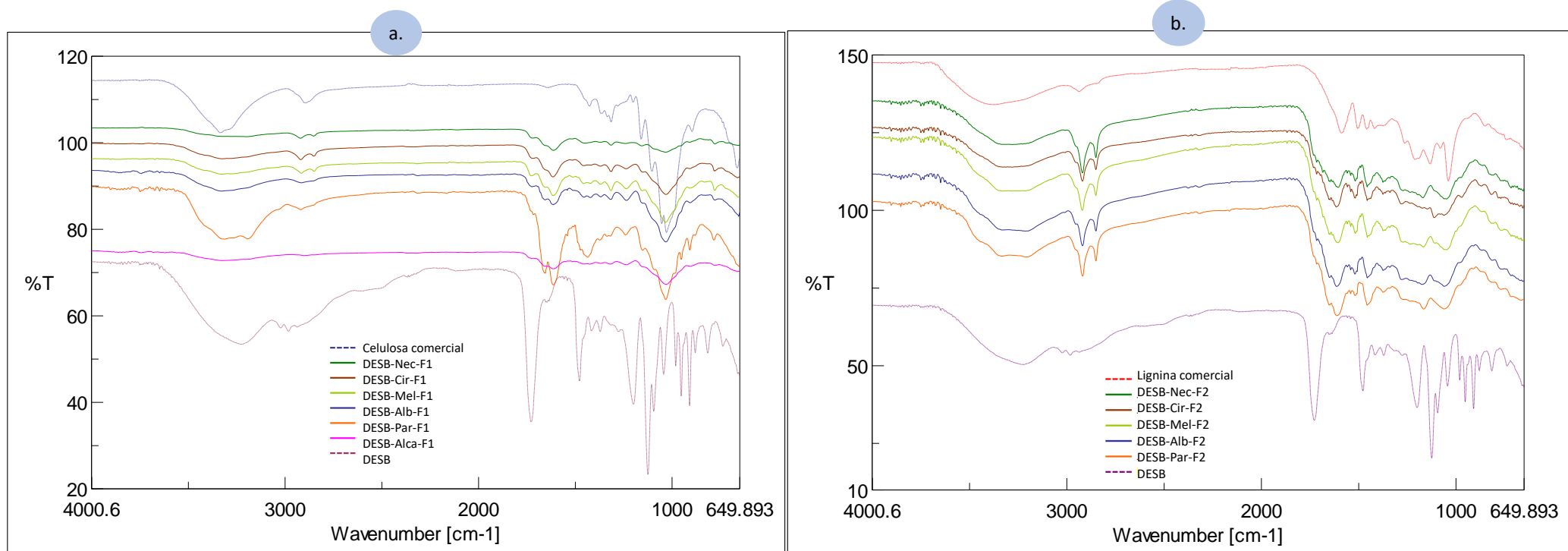


Figura A49. Comparación de los espectros FT-IR de los extractos obtenidos posterior al tratamiento con el DES B para los diferentes residuos de BML. Los espectros están organizados en el mismo orden para los residuos en ambos gráficos. Derecha (a). Extractos correspondientes a la F1: Celulosa, líneas punteadas azul: celulosa comercial, morada: DESB. Lado izquierdo (b). Extractos correspondientes a la F2: lignina, línea punteadas roja y morada DES B: lignina comercial. Las Líneas continuas para ambos gráficos corresponden a los diferentes residuos, verde: nectarina (Nec), café: ciruelo (Cir), azul: melocotón (Mel), verde claro: albaricoque (Alb), naranja: paraguay (Par) y rosa: alcachofa (Alca).

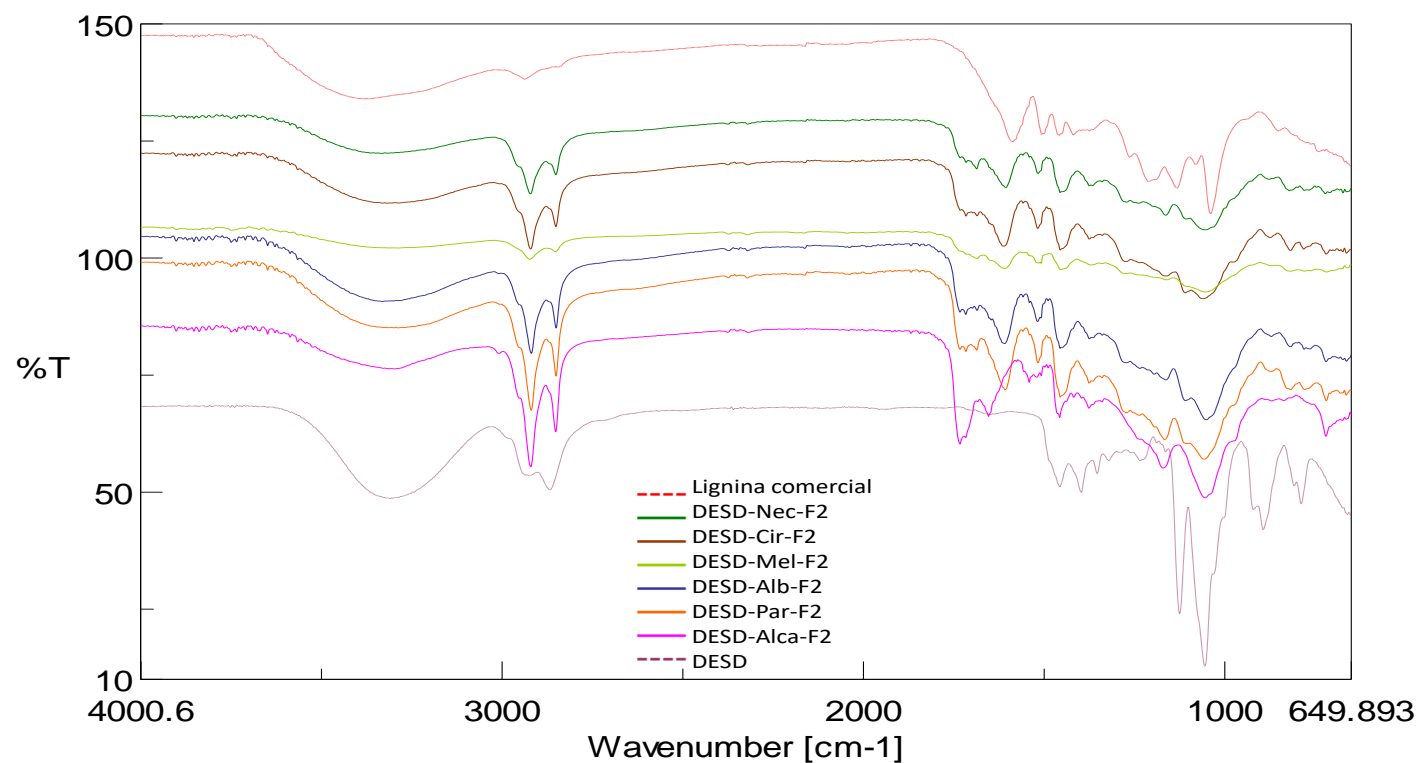


Figura A50. Comparación de los espectros FT-IR de los extractos de la F2: lignina obtenidos posterior al tratamiento con el DES D para los diferentes residuos de BML. Líneas punteadas: roja: lignina comercial, morada: DES D. Las Líneas continuas corresponden a los diferentes residuos, verde: nectarina (Nec), café: ciruelo (Cir), azul: melocotón (Mel), verde claro: albaricoque (Alb), naranja: paraguayo (Par) y rosa: alcachofa (Alca).

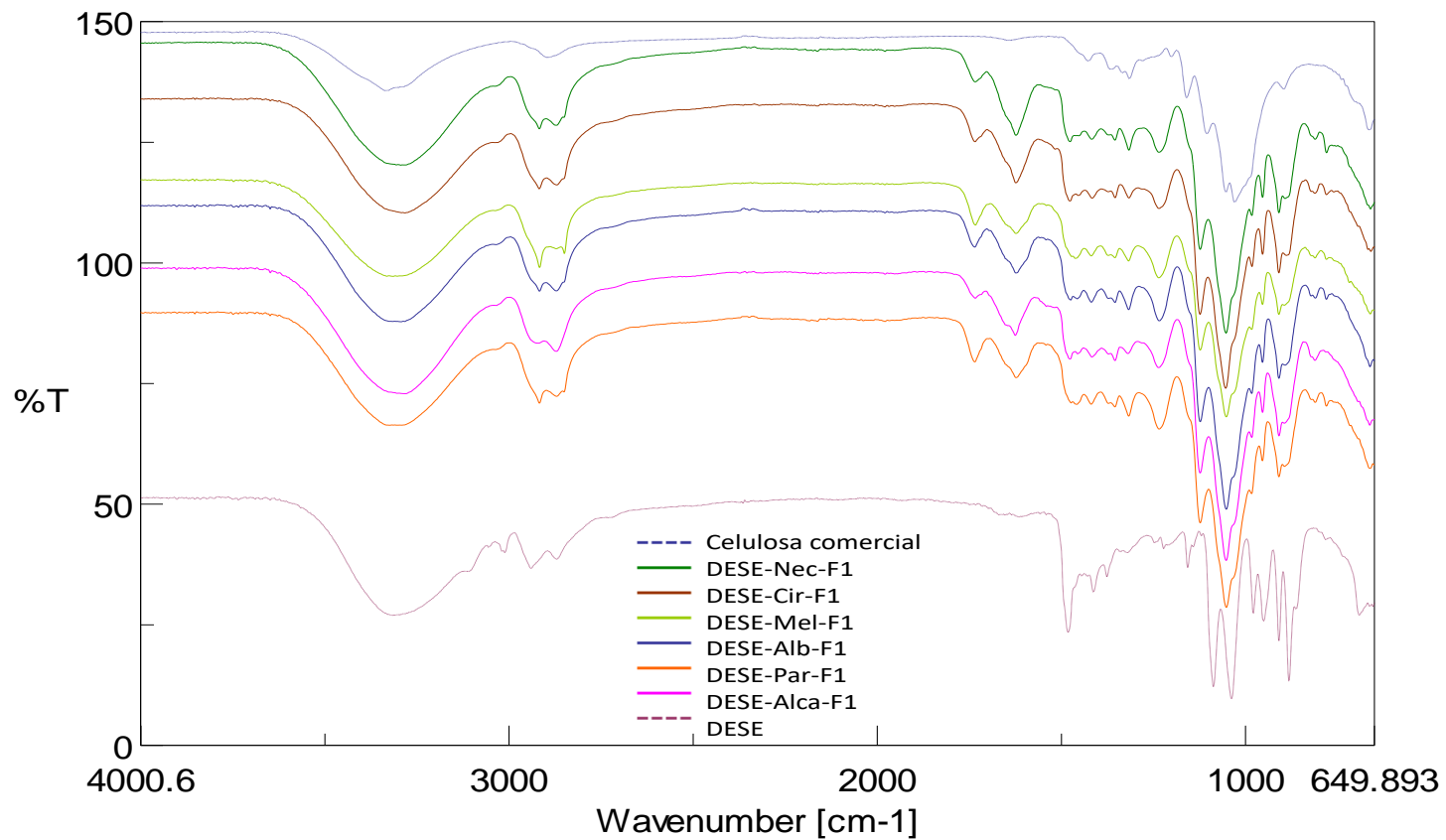


Figura A51. Comparación de los espectros FT-IR de los extractos de la F1: celulosa obtenidos posterior al tratamiento con el DES E para los diferentes residuos de BML. Líneas punteadas: azul: celulosa comercial, morada: DES E. Las Líneas continuas corresponden a los diferentes residuos, verde: nectarina (Nec), café: ciruelo (Cir), azul: melocotón (Mel), verde claro: albaricoque (Alb), naranja: paraguay (Par) y rosa: alcachofa (Alca).

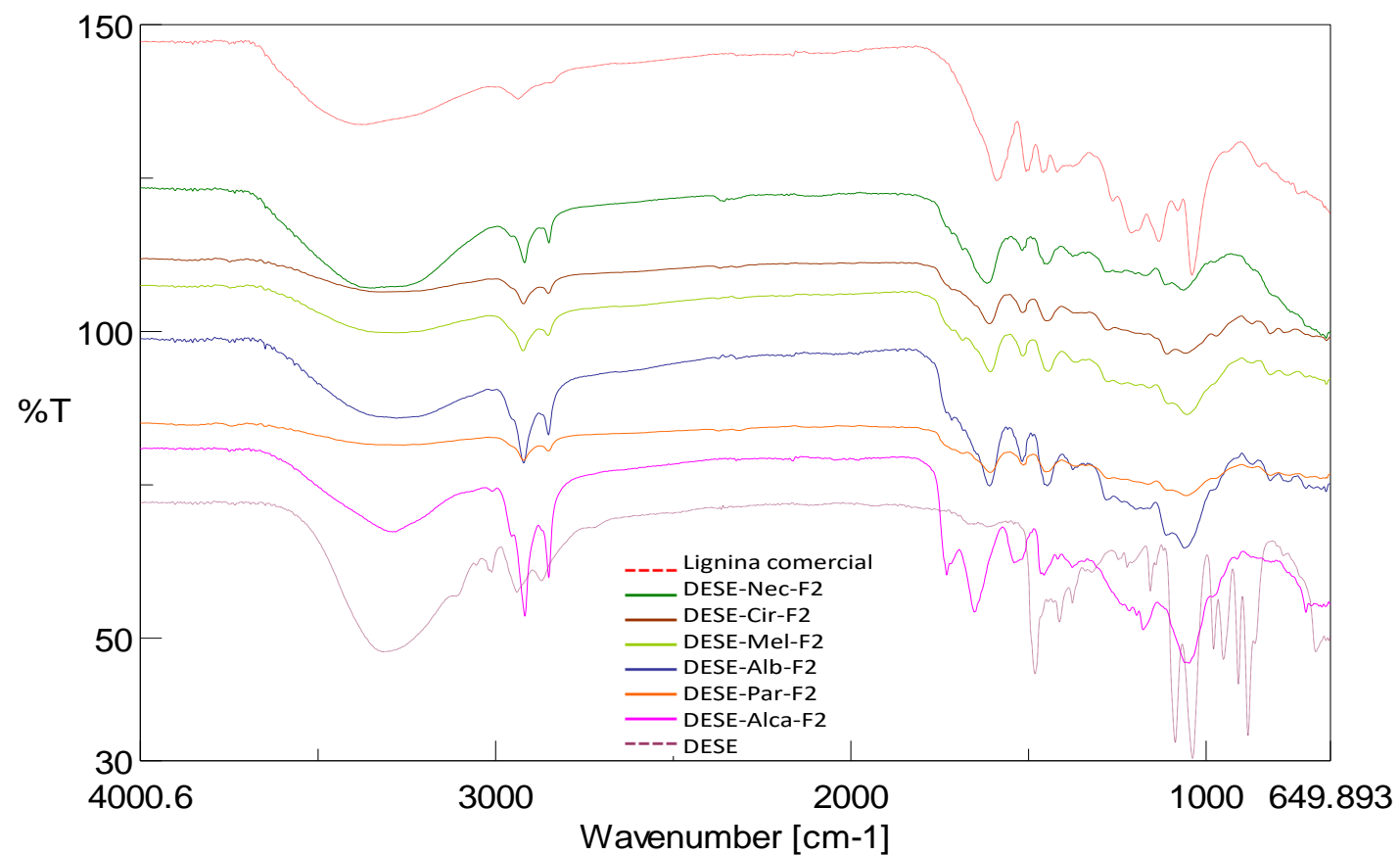


Figura A52. Comparación de los espectros FT-IR de los extractos de la F2: lignina obtenidos posterior al tratamiento con el DES E para los diferentes residuos de BML. Líneas punteadas: roja: lignina comercial, morada: DES E. Las Líneas continuas corresponden a los diferentes residuos, verde: nectarina (Nec), café: ciruelo (Cir), azul: melocotón (Mel), verde claro: albaricoque (Alb), naranja: paraguayo (Par) y rosa: alcachofa (Alca).