

Máster en NUEVOS ALIMENTOS

El rol de los solventes eutécticos para obtener compuestos bioactivos de fuentes naturales

**MONICA VANESSA
TORRES CORNEJO**



FACULTAD DE
CIENCIAS



Director: José A. Mendiola y Gerardo Álvarez Rivera

Tutor: Laura Jaime

Lugar de realización: Centro: CIAL /Departamento de
Bioactividad y análisis de alimentos

ÍNDICE

Contenido

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. METODOLOGÍA DE TRABAJO	11
3. OBJETIVOS	12
4. DISOLVENTES DES, NADES, IL	13
5. FUENTES NATURALES QUE HAYAN SIDO EXTRAÍDAS CON DES/ NADES	17
6. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	19
a. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO.....	19
b. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	19
c. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (UAE) / EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDO CON CALOR (UEH).....	19
d. EXTRACCIÓN POR MICROONDAS (MAE).....	20
e. EXTRACCIÓN POR HOMOGENEIZACIÓN (HAE).....	20
f. HOMOGENIZACIÓN DE ALTA VELOCIDAD (HSH) y EXTRACCIÓN POR CAVITACIÓN-EXPLOSIÓN (CBE).....	20
g. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA (HHPE).....	21
h. DESCARGAS ELÉCTRICAS DE ALTO VOLTAJE.....	21
i. EMPLEO DE DISOLVENTES PRESURIZADOS.....	21
7. ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD PARA EXTRACTOS OBTENIDOS CON DES Y NADES	23
8. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EXTRAÍDOS	29
9. APLICACIONES REPORTADAS	33
a. NADES/DES CON MEJOR DESEMPEÑO EN LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS 46	
b. NADES/DES FRENTE A SOLVENTES CONVENCIONALES.....	46
c. BIOACTIVIDAD DE NADES/ DES.....	47
d. TOXICIDAD.....	48
e. BIODEGRADABILIDAD.....	50
10. CONCLUSIONES	51
11. BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Principales características de DES/ NADES (Elaboración propia).....	15
Ilustración 2. Visualización de los nades y sus componentes por separado. 1: Sacarosa; 2: Fructosa; 3: glucosa; 4: ácido málico; 5: sacarosa:fructora:glucosa (1:1:1,mol/mol/mol), 6: sacarosa: ácido málico (1:1, mol/mol) (Choi, et al., 2019)	16
Ilustración 3Componentes más comunes de IL, DES y NADES. (A) Cationes y aniones más comúnmente utilizado para la preparación de IL. Los aceptores de enlaces de hidrógeno y los donantes de enlaces de hidrógeno más comúnmente utilizados para la preparación de DES (B) y NADES (C). Fuente: (Chemat, et al, 2019)	16
Ilustración 4Tratamiento con el extracto rico en isoflavonas para evitar una mayor degradación de los islotes pancreáticos después de la inducción de diabetes. (Kingsley, et al, 2020).....	25
Ilustración 5 Diagrama de flujo de los principales procesos de síntesis DES (Laís Benvenuti, 2019)	30
Ilustración 6Técnicas generales analíticas en la determinación de compuestos bioactivos (Elaboración propia)	30
Ilustración 7 Determinación de compuestos fenólicos de hojas de olivo por el método MAE-DES-HPLC-DAD-ESI-TOF-MS. La línea interrumpida representaba posibles errores experimentales (incertidumbres) del procedimiento analítico propuesto. (Alañón, 2017) ..	31
Ilustración 8Rendimiento de DES frente a Etanol (Barbieria, et al, 2020)	47
Ilustración 9 Efecto inhibitorio de diferentes DES en la Echerichia coli: (A) Cloruro de colina: Úrea con la E. coli. (B) Cloruro de colina: Ácido cítrico con la E. coli. (Zhao, et al.,2015).....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de fuentes naturales para extraer compuestos bioactivos.....	18
Tabla 2 Aplicaciones reportadas.....	33

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

DES: SOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS
GRAS: GENERALMENTE RECONOCIDOS COMO SEGUROS
IL: LÍQUIDOS IÓNICOS
FDA: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION
FAO/OMS: CODEX ALIMENTARIUS
HBA: ACEPTOR DE ENLACES DE HIDRÓGENO
NADES: SOLVENTES EUTÉCTICOS NATURALES PROFUNDOS
PLE: EXTRACCIÓN CON LÍQUIDOS PRESURIZADOS
ECA: ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA
ALT: ALANINA TRANSAMINASA
AST: ASPARTATO AMINOTRANSFERASA
ALP: FOSFATASA ALCALINA
MIC: INHIBIDOR MÍNIMO CONCENTRACIÓN
AXT: ASTAXANTINA
PA: PERILO
CA: CAMPHOR
EU: EUCALIPTOL
ME: DL-MENTOL
MA: ÁCIDO MIRÍSTICO
TPC: CONTENIDO FENÓLICO TOTAL
CHCL: CLORURO DE COLINA
GLY: GLICEROL
EG: ETILENGLICOL
PDO: PROPANODIOL
BDO: BUTANODIOL
DPPH: MÉTODO DE ELIMINACIÓN DE RADICALES LIBRES
SEM: MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO
CGH: INDEPENDIENTEMENTE COGLICEROL
CALH: ÁCIDO LÁCTICO,
CPH: 1,2-PROPANODIOL
CAOH: ÁCIDO OXÁLICO
HBD: HYDROGEN BOND DONOR

UAE: EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDO

UEH: EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDO CON CALOR

MAE: EXTRACCIÓN POR MICROONDAS

HSH: HOMOGENEIZACIÓN DE ALTA VELOCIDAD

CBE: CAVITACIÓN DE EXTRACCIÓN DE ALTA VELOCIDAD

HHPAE: EXTRACCIÓN ASISTIDA POR PRESIÓN HIDROSTÁTICA

HAE: EXTRACCIÓN POR HOMOGENIZACIÓN

SFE: EXTRACCIÓN DE FLUIDO SUPERCRÍTICO

HPLC: CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO

UPLC: CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA RENDIMIENTO

RESUMEN

En este trabajo se ha llevado a cabo una revisión sobre la aplicabilidad de los solventes eutécticos, principalmente los solventes eutécticos profundos (DES) y los solventes eutécticos profundos naturales (NADES), en la extracción de compuestos bioactivos de productos naturales. Estos disolventes alternativos, no sólo han demostrado ofrecer altos rendimientos de extracción, sino que también han demostrado ser respetuosos con el medio ambiente, ofreciendo baja o casi nula toxicidad, comparado con muchos disolventes orgánicos convencionales. Se han revisado los principales métodos de extracción en los estudios en los que se hace uso de DES y NADES, así como las diversas fuentes naturales utilizadas para la extracción de componentes bioactivos, incluyendo subproductos de la industria agroalimentaria. Asimismo, se han incluido distintos ensayos de bioactividad reportados, en los cuales se han testado extractos obtenidos con estos solventes ecológicos; desde análisis de actividad antioxidante hasta estudios *in vivo* con ratas Wistar, pasando por pruebas de citotoxicidad *in vitro*. Finalmente, se han seleccionado algunos estudios reportados en bibliografía con la finalidad de identificar las mejores mezclas extractivas de DES y NADES en cuanto a rendimiento, baja toxicidad, biodegradabilidad y su influencia en la bioactividad del compuesto extraído.

PALABRAS CLAVE: Química Verde, NADES, DES, GRASS, Solventes Emergentes, Compuestos bioactivos, Solventes verdes, Solventes alimentarios

ABSTRACT

In this work, a review about the applicability of eutectic solvents, mainly deep eutectic solvents (DES) and natural deep eutectic solvents (NADES), for the extraction of bioactive compounds from natural products has been carried out. These alternative solvents, have not only shown to have high extraction yields, but also have shown to be environmentally friendly, exhibiting very low or almost no toxicity, compared to conventional organic solvents. The main extraction methods that have been most widely used in studies using these emerging solvents have been reviewed, as well as the various natural sources in which they have been used, including agro-food by-products. Likewise, different examples of reported bioactivity tests in which the tested extracts have been obtained with the studied DES or NADES have also been included; from antioxidant activity assays to studies *in vivo* with Wistar rats, through *in vitro* cytotoxicity tests. Finally, reported studies have been selected in order to identify the best DES /NADES extractive mixtures in terms of extraction yield, low toxicity, biodegradability and their influence on the bioactivity of the extracted compounds.

KEY WORDS: Green Chemistry, NADES, DES, GRASS, Emerging Solvents, Bioactive Compounds, Green Solvents, Food Solvents

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años los compuestos bioactivos se han estudiado con intensidad, debido a sus propiedades biológicas, capaces de proporcionar múltiples beneficios para la salud. Para la obtención de estos componentes, no sólo se limita a la extracción en plantas, algas o microalgas, sino que también de subproductos de industrias agrícolas, alimentarias y pesqueras, como por ejemplo del caparazón de los crustáceos, lo cual perfectamente puede contribuir a una economía circular basada en cero residuos. La industria agroalimentaria genera cantidades significativas de subproductos que se descartan y pueden ser un problema ambiental grave. Sin embargo, estos subproductos son una fuente extraordinaria de compuestos bioactivos, incluidos fenólicos, proteínas, alcaloides, carotenoides, azúcares o lípidos entre otros. Muchos de esos compuestos bioactivos presentan propiedades que brindan múltiples beneficios para la salud, como antihipertensivos, anticancerígenos, antiinflamatorios, hipoglucemiantes, antimicrobianos, antivirales, antitumorales, antitrombóticos, hipocolesterolémicos, etc.

Para aplicaciones, principalmente en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica, estos compuestos son generalmente extraídos mediante el uso de solventes orgánicos o también conocidos como solventes convencionales (metanol, acetona, benceno, cloroformo, éter de petróleo y hexano), los cuales muchas veces son rechazados por ser inflamables, explosivos, pobremente biodegradables y por la toxicidad que puedan producir al consumidor final.

Por estas razones, se ha propuesto el uso de solventes GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros). Los pocos disolventes convencionales reconocidos como GRAS son polares, no son capaces de solubilizar moléculas apolares, haciendo que las extracciones se vean muy limitadas. Además, debido a la deriva climática observada en los últimos años, hoy en día existe una gran preocupación por el medio ambiente. Por lo tanto, existe un deseo de reducir el consumo de energía, de agua, de solventes y las emisiones de carbono, lo cual cada vez aumenta más la demanda por procesos de extracción ecológicos. Para responder a la demanda, se están probando tecnologías verdes teniendo en cuenta la necesidad de ser eficaces y eficientes, lo que significa aumentar el rendimiento, mejorar la selectividad del proceso y disminuir el consumo de energía. Una solución ante este problema son los solventes alternativos: solventes de líquidos iónicos (IL), solventes eutécticos profundos (DES) y solventes eutécticos naturales (NADES), en general reportados como solventes

verdes. En esta revisión se explicará el rol de los solventes eutécticos, principalmente de DES y NADES para la extracción de compuestos bioactivos de productos naturales, los cuales han demostrado no sólo tener altos rendimientos, sino que también son eco amigables y de baja o casi nula toxicidad. (Benvenuti, et al., 2019)

2. METODOLOGÍA DE TRABAJO

Como ya se ha dicho, la presente investigación constituye una revisión sistemática de la literatura sobre los principales métodos de extracción de compuestos bioactivos utilizando DES y NADES.

Este trabajo tiene como objetivo fundamental explicar el rol de los solventes eutécticos en la extracción de componentes bioactivos a partir recursos naturales y subproductos agroalimentarios.

Para la búsqueda de información se empleó la base de datos Scimedirect. La Universidad de las Palmas de Gran Canaria (2019) plantea que Scimedirect es una de las mayores fuentes de información para la investigación científica de las revistas científicas que publica Elsevier.

Adicionalmente, se utilizó la base de datos Scopus, que cubre un mayor número de publicaciones que Scimedirect. La Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECyT) plantea que Scopus es una base de datos de referencia bibliográficas y citas.

La literatura analizada comprende principalmente artículos de investigación de revistas científicas en idioma inglés. La selección de las fuentes bibliográficas se realizó mediante el filtrado selectivo de la información. En un primer momento se buscó palabras claves con un rango de antigüedad de 5 años, es decir entre los años 2015-2020, para ver qué artículos aparecían. Se seleccionaron aquellas fuentes con título y resumen vinculado al tema de investigación. Al final de este proceso se obtuvieron 34 fuentes bibliográficas, de las cuales todas son artículos de revistas científicas.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Explicar el rol de los solventes eutécticos en la extracción de componentes bioactivos a partir recursos naturales y subproductos agroalimentarios.

OBJETIVO ESPECÍFICO:

- Explicar el por qué los solventes eutécticos profundos y los solventes eutécticos profundos naturales son eco-amigables.
- Explicar el por qué los solventes eutécticos profundos y los solventes eutécticos profundos naturales son ideales para la industria alimentaria y farmacéutica.
- Explicar por qué los solventes eutécticos profundos y los solventes eutécticos profundos naturales son altamente adaptables a las necesidades concretas de cada extracción.
- Analizar, según la bibliografía, la toxicidad de los solventes eutécticos profundos y los solventes eutécticos profundos naturales.
- Estudiar qué fuentes y qué compuestos diana se están investigando para su uso con DES y NADES.

4. DISOLVENTES DES, NADES, IL

Los líquidos iónicos (IL) son sales fundidas que permanecen líquidas a temperatura ambiente. Generalmente, son el resultado de la combinación de cationes orgánicos con aniones orgánicos o inorgánicos. Se estima que hay más de 10^8 combinaciones posibles de cationes y aniones que den lugar a líquidos iónicos. Éstos se caracterizan por tener puntos de fusión más bajos que sus componentes por separado. Estas sustancias tienen propiedades fisicoquímicas que pueden modificarse fácilmente mediante la combinación adecuada de cationes/aniones, lo que proporciona propiedades ideales como estabilidad térmica, variabilidad polar, altos puntos de ebullición, buena capacidad de disolución y extracción. Además, los líquidos iónicos tienen baja volatilidad e inflamabilidad lo que los hacen más seguros frente a los disolventes orgánicos. A pesar de ello, los ILs tienen dificultad para ser regulados por Administración de medicamentos y alimentos (FDA), El Codex Alimentarius, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura (FAO), Organización Mundial de la Salud (OMS) o la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), debido a que se ha observado toxicidad en algunos aniones y cationes utilizados, demostrado recientemente ser tóxicos y poco biodegradables, además de defectos asignables como la difícil purificación y un costo alto (Benvenuti, et al., 2019)

Afortunadamente, han surgido solventes emergentes, análogos de IL, llamados solventes eutécticos profundos (DES), los cuales no solo tienen las características interesantes de IL, sino que también muestran ventajas únicas. En este caso no se trata siempre de interacciones iónicas sino por puentes de hidrógeno. Los DES contienen no solo sales, sino también carbohidratos, aminoácidos, polioles, etc. Se sintetizan fácilmente, son menos tóxicos y más ecológicos. Los DES suelen estar formados por un aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA), como el amonio cuaternario, con un donador de enlaces de hidrógeno (HBD), como urea, ácidos carboxílicos o amina.

Los DES generalmente se agrupan en los siguientes cuatro grupos:

- **Grupo I:** sal de amonio cuaternario y sal metálica.
- **Grupo II:** sal de amonio cuaternario y sal de hidrato de metal.
- **Grupo III:** sal de amonio cuaternario y un donador de enlaces de hidrógeno. (los más frecuentes)
- **Grupo IV:** sal metálica y un donador de enlaces de hidrógeno.

Los DES del grupo I están compuestos de haluros metálicos (SnCl_2 , ZnCl_2 o FeCl_3) combinado con una sal orgánica, la más frecuente con una sal de amonio cuaternario. Los hidratos de sales metálicas en los DES del grupo II no tienen problemas relacionados a la sensibilidad a la humedad, lo cual que les permite aplicarse a gran escala aplicaciones industriales. Los DES del grupo III son los más frecuentes, ya que están conformados por una sal orgánica y un HBD, el cual puede ser un ácido poli carboxílico, una poliamida o polialcohol. Lo ventajoso del grupo III es que tiene una preparación muy simple y no reaccionan con el agua, así como también que son de muy bajo costo y bastante biodegradables. Los DES del grupo IV están compuestos por una sal metálica en lugar de sal orgánica. En general, las propiedades de una mezcla eutéctica dependen de la fuerza de HBD y de las dimensiones de la molécula. La clasificación depende de la naturaleza del agente formador de componentes utilizado. Los disolventes eutécticos se presentan como una alternativa ventajosa a líquidos iónicos ya que sus ventajas están claramente probadas y está documentado que un solvente eutéctico puede ser fácilmente eliminado. Esto es posible solo por el hecho de que, al formar un disolvente eutéctico, no se produce reacción química. Los DES generalmente están compuestos de componentes asimétricos, lo cual contribuye a reducir la energía, caracterizando la estabilidad de la estructura iónica dando como resultado una menor temperatura de fusión. Los DES se caracterizan por ser ser más viscosos que el agua y que los clásicos solventes orgánicos. (Jablonskya, et al., 2018)

Cuando los disolventes eutécticos profundos (DES) están formados por dos o más compuestos naturales eutécticos que provienen de metabolitos de las plantas o sus derivados, se les nombra como solventes eutécticos profundos naturales (NADES). Los más comunes son: cloruro de colina, ácido cítrico, ácido málico, ácido maleico, ácido acético, glucosa, fructosa, sacarosa, trehalosa y agua. Esta última categoría de compuestos es fácilmente biodegradable y tienen menor toxicidad, por no decir casi nula. Una de las principales ventajas de los NADES es que pueden actuar como disolventes naturales para los metabolitos primarios y secundarios de las plantas (solvatación natural como en las propias matrices naturales), que son insolubles en agua. (Benvenuti, et al., 2019)

Los NADES se puede clasificar en cinco categorías cuando se mezclan los compuestos:

- i) tipo de líquido iónico, que contiene un ácido y una base

- ii) tipo neutro, formado por azúcares o por azúcar y polialcohol
- iii) tipo ácido neutro, sintetizado con azúcar o polialcohol y un ácido orgánico
- iv) tipo neutro-básico, con azúcar o polialcohol y una base orgánica
- v) tipo de aminoácidos, con aminoácidos y azúcar o ácido orgánico

(Benvenuti, et al., 2019)

En una vista global, los NADES/DES se preparan calentando los solventes de donador de enlace de hidrógeno (HBD) y receptor de enlace de hidrógeno (HBA) con una relación molar presentada en cada estudio que en la mayoría se basan en datos previamente publicados. Los dos componentes de cada mezcla se colocan en un matraz hermético a temperaturas que varían de 50 °C - 85 °C aproximadamente, con agitación continua hasta que se obtiene un líquido homogéneo. Después de la formación de DES, generalmente se le añade agua para reducir la viscosidad del solvente y ayudar al proceso de extracción de polifenoles, pues el agua facilita la transferencia de masa. Seguido a esto se pasa a hacer un pretratamiento a la muestra o acondicionamiento como secar y moler o incluso se puede utilizar descargas eléctricas de alto voltaje como pretratamiento.

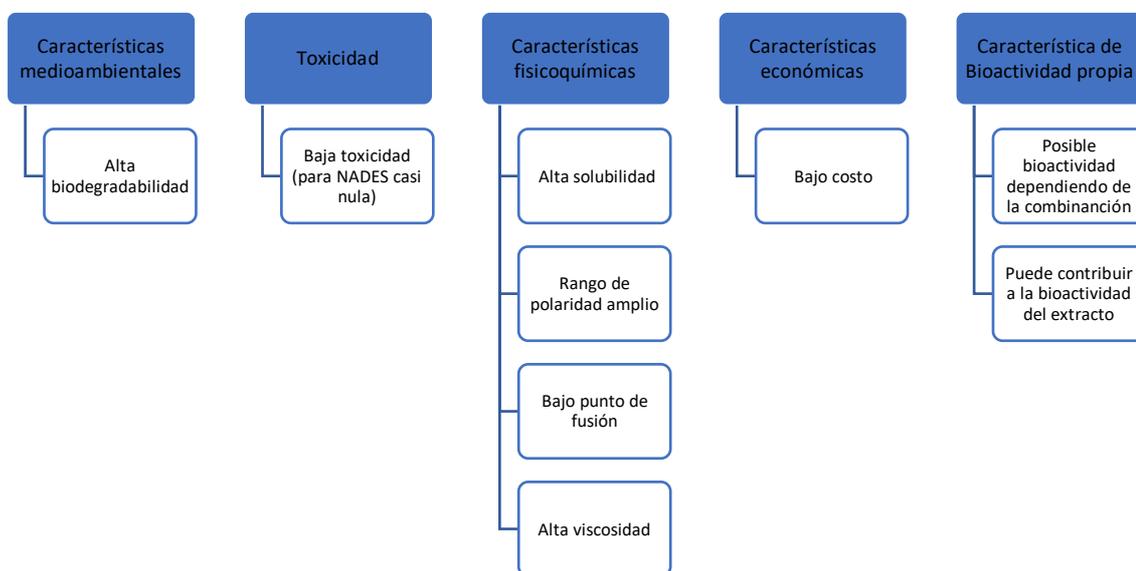


Ilustración 1 Principales características de DES/NADES (Elaboración propia)



Ilustración 2. Visualización de los nades y sus componentes por separado. 1: Sacarosa; 2: Fructosa; 3: glucosa; 4: ácido málico; 5: sacarosa:fructosa:glucosa (1:1:1,mol/mol/mol), 6: sacarosa: ácido málico (1:1, mol/mol) (Choi, et al., 2019)

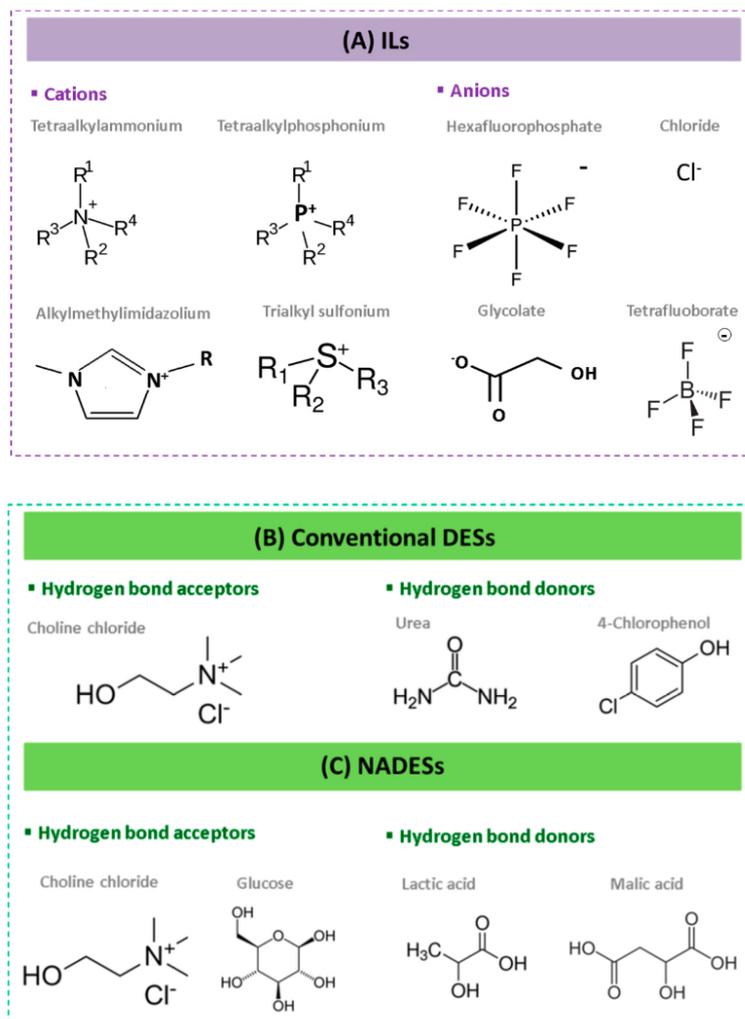


Ilustración 3 Componentes más comunes de IL, DES y NADES. (A) Cationes y aniones más comúnmente utilizados para la preparación de IL. Los aceptores de enlaces de hidrógeno y los donantes de enlaces de hidrógeno más comúnmente utilizados para la preparación de DES (B) y NADES (C). Fuente: (Chemat, et al, 2019)

5. FUENTES NATURALES QUE HAYAN SIDO EXTRAÍDAS CON DES/ NADES

El espectro de aplicaciones DES / NADES es muy amplio. Podemos obtener diferentes tipos de extractos como flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides, pigmentos naturales, azúcares, péptidos y compuestos volátiles, todos ellos pueden extraerse con éxito de matrices naturales utilizando estos solventes verdes (Chemat, et al., 2019). La mayoría de los estudios DES / NADES se centran principalmente en plantas, microalgas y fuentes de algas. Sin embargo, no se trata solo de este tipo de fuente, sino que también hay investigaciones basadas en fuentes animales y subproductos agroalimentarios y pesqueros. Hoy en día, esto es especialmente importante ya que se tiende a un escenario de “cero residuos”. Por ejemplo, los productos pueden ser cáscaras de frutas y verduras, semillas, las tortas de la producción de aceite de oliva, conchas de crustáceos, etc.

Para ilustrar mejor, en la tabla 1 podemos apreciar diferentes tipos de fuentes naturales que se han usado para extraer compuestos bioactivos con DES / NADES.

Tabla 1. Ejemplos de fuentes naturales para extraer compuestos bioactivos

<i>Tipo</i>	<i>Materia Prima</i>	<i>Compuestos bioactivos</i>	<i>Actividad observada y referencia</i>
Microalga	<i>Chlorella vulgaris</i>	Compuestos polifenólicos : ácido gálico, ácido cafeico, ácido p-cúmarico y ácido ferúlico	Propiedades inflamatorias, antimicrobianas y antitumorales, que son muy demandadas por las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética. (Mahmood, et al., 2019)
Subproducto	<i>Lías de vino</i>	Compuestos fenólicos	prevención de reacciones oxidativas y los beneficios observados contra enfermedades cardiovasculares, procesos inflamatorios y estados fisiopatológicos degenerativos que pueden desarrollarse en adultos. (Bosiljkov, et al., 2016)
Subproducto animal	<i>Conchas de cangrejo y camarones marrones</i>	Astaxantina	antioxidante, anticancerígeno, peroxidante antilipídico, antiinflamatorio, antidiabético, inmunomodulador y propiedades de fotoprotección de la piel. (Rodrigues et al., 2020)
Planta	<i>Rosmarinus officinalis L</i>	Ácido rosmarínico, ácido cafeico, 7-metilrosmanol, rutina, naringina, ácido ferúlico	Los efectos inhibitorios contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el carnosol han demostrado ser un prometedor agente antiinflamatorio y anticancerígeno. (Barbieria, et al., 2020)
Producto secundario	<i>Aceite de palma</i>	Tocoferoles y tocotrienoles (comúnmente conocidos como vitamina E)	propiedades antioxidantes que pueden reducir el riesgo de cáncer y tumores relacionados. (Abdul Hadi, et al., 2015)
Subproducto vegetal	<i>Cáscara de granada</i>	Proteínas y compuestos fenólicos	antioxidantes y propiedades hipocolesterolemias. (Hernández-Corroto, et al., 2020)

6. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

En este apartado se describen las principales técnicas de extracción que se emplean para la obtención de compuestos bioactivos empleando IL, DES y NADES.

a. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO

En este proceso, la materia prima, generalmente pulverizado, es colocado en un recipiente, sumergido en el disolvente en un tiempo que puede durar un tiempo prolongado, varias horas o incluso días. Durante este procedimiento, el material soluble del material pulverizado se transfiere hacia el disolvente. Para aumentar la transferencia de masa, se proporciona algún tipo de agitación. Comúnmente, esto se realiza a temperatura ambiente, pero se puede aplicar calor para mejorar la eficiencia de extracción. (Palma, et al., 2014)

b. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

Se trata de un método similar al anterior pero que se usa cuando la materia prima es un líquido. La extracción líquido-líquido se realiza con dos líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles. En el proceso de separación, un soluto de una fase líquida se transfiere a otra. Comúnmente, se trata de una fase polar y la otra apolar. Durante este proceso, las dos fases se mezclan para obtener una constante de reparto entre ellas, seguido de un paso de separación de fases (Palma, et al., 2014).

c. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (UAE) / EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDO CON CALOR (UEH)

La aplicación de ultrasonidos puede dividir con facilidad los tejidos de celulosa, rompiendo así las paredes de la estructura celular y liberando las sustancias intracelulares, en otras palabras, esto permite la liberación de compuestos bioactivos. Todo esto es causado por la cavitación acústica generada por las burbujas durante el período de presión negativa. Estas burbujas están tan comprimidas que en un momento son conducidas a su colapso, lo cual lleva a que se quiebren las paredes celulares. Este método es fácil y económico, además tiene muchas ventajas que ofrecer, como la mejora de la eficiencia, la reducción del tiempo de extracción, el bajo consumo de solventes, la baja temperatura

del proceso y el alto nivel de automatización en comparación con los métodos de extracción convencionales (Chemat et al., 2017).

d. EXTRACCIÓN POR MICROONDAS (MAE)

La extracción asistida por microondas se basa en la aplicación radiación electromagnética en el intervalo de las microondas, generalmente 2450 Mhz, energía que calienta los solventes que están en contacto con las muestras o la propia humedad de la materia prima. El agua que se encuentra en el interior es evaporada generando al mismo tiempo una enorme presión sobre las paredes celulares, ocasionando una ruptura, así liberando los compuestos bioactivos de interés. Las razones por las que MAE es un método de extracción efectivo se demuestran en los rendimientos de extracción en un tiempo más corto que la extracción sólida/líquidos convencionales, la manipulación simple, el consumo reducido de solventes y el menor aporte de energía. (Flórez et al., 2015).

e. EXTRACCIÓN POR HOMOGENEIZACIÓN (HAE)

El HAE es una alternativa al método de extracción convencional: los compuestos bioactivos se pueden extraer de la muestra en disolvente mediante cizallamiento mecánico de alta velocidad, mezcla, acción de corte de fluido y aplastamiento sin presión, ofreciendo beneficios tales como una temperatura de extracción más baja, una mayor eficiencia, menos tiempo y consumo de energía (Guo, et al., 2017)

f. HOMOGENIZACIÓN DE ALTA VELOCIDAD (HSH) y EXTRACCIÓN POR CAVITACIÓN-EXPLOSIÓN (CBE)

Este método es la integración de dos técnicas, la homogeneización de alta velocidad (HSH, high-speed homogenization) y la extracción por cavitación-explosión (CBE, cavitation-burst extraction), su combinación se suele abreviar como HSH-CBE. La muestra homogeneizada y molida gracias a fuerzas de cizalla y aplaste de alta velocidad se extruye a la cámara de cavitación en condiciones de vacío súbito, lo que provoca explosiones. En el proceso CBE, la temperatura se establece en 45 °C y la presión negativa utilizada ha sido -0.08 MPa. Hay un flujo de nitrógeno en el fondo de la cámara de cavitación para generar la extracción de cavitación. (Guo, et al., 2019)

g. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA (HHPE)

El método HHPAE funciona bajo presiones muy altas, lo que significa que a mayor sea la presión hidrostática, más solvente puede entrar en las células, por ende, se puede liberar más compuestos bioactivos. Las presiones son de entre 100 y 1000 MPa. (Briones-Labarca, et al., 2015)

h. DESCARGAS ELÉCTRICAS DE ALTO VOLTAJE

Este método consiste en un pretratamiento donde se aplican descargas eléctricas, los cuales generan una avalancha de electrones llamada “streamer”. Una vez que este campo eléctrico es lo suficientemente intenso, se propaga del electrodo positivo al negativo, dando lugar a una falla eléctrica en el agua. Estos campos eléctricos se aplican en forma de pulsos intermitentes. La ocasión de ruptura eléctrica genera burbujas, cavitación y turbulencia en el líquido causando el daño celular y facilitando así la extracción de compuestos. (El Kantar, et al., 2020)

i. EMPLEO DE DISOLVENTES PRESURIZADOS

El método de extracción de líquido a presión (PLE) es considerada como un método de extracción avanzada, así como el método de Extracción de Fluido Supercrítico (SFE). El primero, presenta ventajas sobre los procesos de extracción tradicionales. Durante el proceso de extracción por PLE, el solvente se mantiene en estado líquido durante todo el procedimiento de extracción, ya que emplea altas temperaturas y presiones, siempre por debajo de sus puntos críticos respectivos. Se genera un cambio en las propiedades fisicoquímicas del solvente. Por ejemplo, la transferencia de masa aumenta, la tensión superficial del disolvente y la viscosidad disminuye, mientras que la solubilidad de los analitos aumenta. Esto permite que el solvente pueda penetrar de manera más fácil y profunda en la matriz sólida que se extrae. Como resultado, se obtienen rendimientos de extracción significativamente mayores en comparación con las extracciones. PLE no sólo resulta proporcionar procesos de extracción más rápidos, sino que también un menor consumo de solvente para la preparación de muestras de sólidos. Además, la mayoría de los instrumentos utilizados para PLE están automatizados, lo que permite el desarrollo de métodos menos intensivos en mano de obra y mejora la reproducibilidad. (Alvarez-Rivera, et al., 2020) Con respecto al segundo método, se trata de un proceso en donde se separa un componente (el extractor) de otro (la matriz) utilizando fluidos supercríticos

como disolvente de extracción. El fluido supercrítico más utilizado es el CO₂, aunque a veces se modifica con co-solventes como metanol, etanol. El sistema debe contener una bomba para el CO₂, una celda de presión para contener la muestra, un medio para mantener la presión en el sistema y un recipiente colector. El recipiente de extracción se presuriza con el fluido mediante una bomba. El material disuelto es barrido desde la celda de extracción a un separador a menor presión, y el material extraído se deposita. El CO₂ puede enfriarse, descomprimirse, reciclarse o descargarse en la atmósfera. El motivo por el que CO₂ se ha convertido en el disolvente SFE más utilizado es su naturaleza no tóxica e inflamable. Sus propiedades de extracción pueden ser ampliamente modificables con cambios de presión y temperatura (Kaur, 2016)

7. ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD PARA EXTRACTOS OBTENIDOS CON DES Y NADES

Como se ha mencionado anteriormente, los solventes eutécticos tanto como los DES y NADES se les considera fáciles de sintetizar, biodegradables, no volátiles, no tóxicos, altamente estables y de bajo costo. Por estas razones, se prestan perfectamente para la extracción de compuestos bioactivos para la elaboración de productos de consumo alimentario, farmacéutico y cosmético. Entre los ensayos de bioactividad que empleen DES/NADES, principalmente se comparan con disolventes convencionales midiendo la eficiencia de las extracciones con análisis para cuantificar la capacidad antioxidante de los compuestos bioactivos, en los que se han obtenido resultados muy favorables para estos disolventes verdes frente a los disolventes convencionales. Asimismo, entre otras bioactividades lo más habitual es medir la capacidad antioxidante, pero también podemos encontrar referencias donde se ha medido la capacidad hipocolesterolemia, evaluación de antihipertensivos, experimentos en ratas Wistar para medir el efecto antidiabético, actividad antiproliferativa, ensayos bacterianos, susceptibilidad antimicrobiana, entre otros.

Un gran ejemplo se da en el estudio de Hernández- Corroto, et al. (2020), en el cual se realizó una extracción sostenible de proteínas y polifenoles con actividad bioactivas de la cáscara de granada (*Punica granatum L.*). Los extractos se hidrolizaron con diferentes enzimas proteolíticas y se evaluaron diferentes funcionalidades (antioxidante, hipocolesterolemia y capacidades antihipertensivas). Se extrajeron los compuestos bioactivos utilizando líquidos presurizados (PLE) y solventes eutécticos (DES) para ser comparados frente a solventes convencionales. Los disolventes usados en PLE fueron mezclas etanol: agua y en extracción convencional se empleó acetonitrilo. En la extracción con DES se emplearon las combinaciones de cloruro de colina con úrea, etilenglicol, glicerol, ácido acético, glucosa, sorbitol, y ácido cítrico, además de la mezcla acetato sódico:úrea.

Además, todos los DES arriba mencionados contenían agua como el tercer componente para controlar la viscosidad del solvente. Los tres componentes se mezclaron en una

relación 1:1:10. Se evaluó la capacidad antioxidante de hidrolizados y extracto (sin hidrolizar). Todos los hidrolizados y extractos presentaron una alta capacidad antioxidante. Los extractos proteicos fueron sometidos a hidrolisis con alcalasa y termolisina, presentando los primero mayor capacidad antioxidante. En general la se obtuvieron mayores capacidades antioxidantes con PLE (etanol:agua), que con DES, pero en ambos casos mayores que con disolventes orgánicos clásicos. El método PLE probablemente co-extrajo compuestos fenólicos que contribuyen en gran medida a la capacidad antioxidante observada. Para poner a prueba la capacidad bioactiva, se midió también la actividad hipocolesterolemiantes, obtenido por PLE mostró la mayor inhibición del colesterol esterasa. Este hecho podría atribuirse a las proteínas intactas o a los polifenoles coextraídos con proteínas por PLE. La capacidad para reducir el colesterol esterasa del extracto de DES y sus hidrolizados fue significativamente menor que la observada para el extracto de PLE e hidrolizados. También se evaluó la capacidad antihipertensiva, los hidrolizados obtenidos de proteínas extraídas con el DES presentaron un mayor porcentaje de inhibición de la ECA (enzima convertidora de angiotensina) que el extracto precursor. Se pudo observar que los péptidos liberados empleando DES son mucho más antihipertensivos que los que fueron obtenidos con disolventes orgánicos. Por otro lado, los hidrolizados del extracto utilizando PLE mostraron un porcentaje de inhibición mucho menor de la ECA, lo que se puede relaciona con la menor concentración de péptidos de hidrolizados. En general podemos decir que PLE y DES son una opción con mucho potencial frente a solventes convencionales.

Por otro lado, En el estudio de Kingsley, et al. (2020) se midió el efecto antidiabético del extracto de Kudzu (*Pueraria lobata*), el cual es rico en isoflavonas. Se utilizaron NADES de cloruro de colina y ácido cítrico con 20% de agua. Los compuestos diana de la extracción fueron, Puerarin, Daidzen, Genistein, que posteriormente serían suministrados a ratas Wistar diabéticas tratadas a dosis de 100 mg / kg o 200 mg / kg durante 28 días. El efecto del tratamiento se basó en el peso, la tolerancia a la glucosa, la glucosa en ayunas y el nivel de hemoglobina glucosilada, los parámetros bioquímicos hepáticos, la expresión de anticuerpos antiinsulina y Ki67 (factor de proliferación celular), y la evaluación histopatológica del páncreas y los tejidos renales. Se obtuvo una mejora general en el peso en ratas diabéticas tratadas con el extracto a una dosis de 200 mg / kg, pero no a una dosis de 100 mg / kg. El nivel plasmático de alanina transaminasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), pero no fosfatasa alcalina (ALP), fueron

significativamente diferentes entre las ratas diabéticas no tratadas y las tratadas con el extracto ($p = 0.05$). Se descubrió que el extracto rico en isoflavonas estimulaba la regeneración de las células β del páncreas en un efecto dependiente de la dosis y no mostraba un impacto tóxico observable ni en el riñón ni en el páncreas. Por lo tanto, este extracto obtenido mediante NADES puede ser una opción de tratamiento prometedora para la condición diabética. Además, la extracción con NaDES presentó la ventaja de poderse administrar directamente sin necesidad de evaporar disolvente residual.

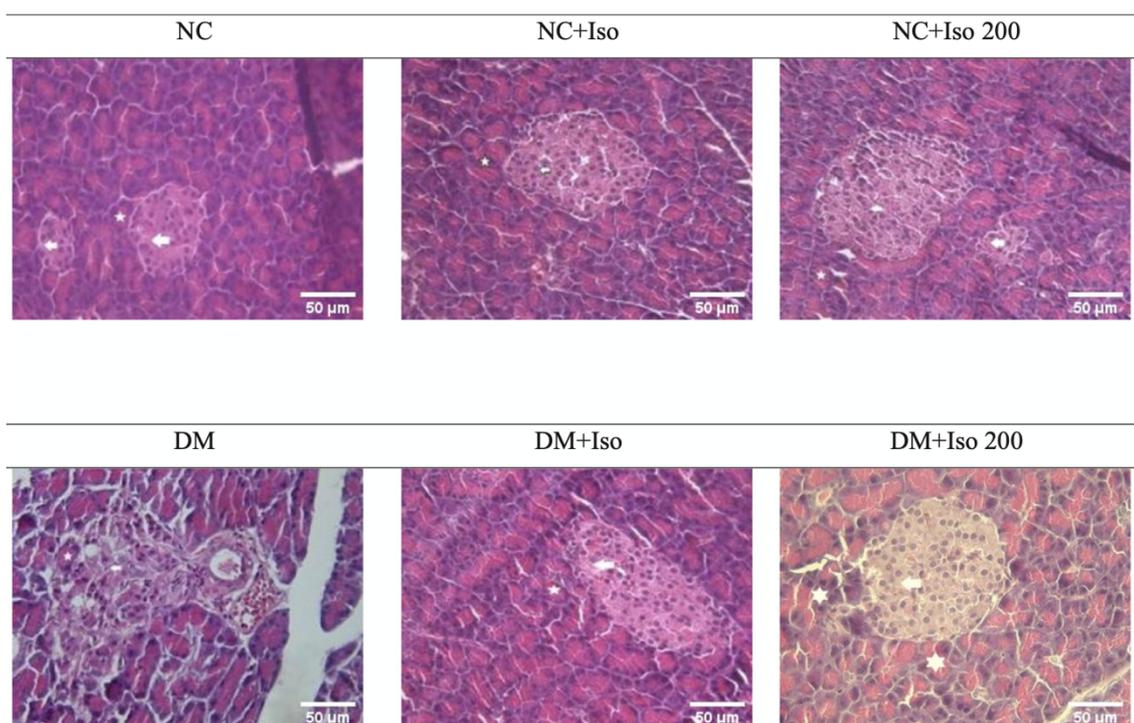


Ilustración 4 Tratamiento con el extracto rico en isoflavonas para evitar una mayor degradación de los isletos pancreáticos después de la inducción de diabetes. (Kingsley, et al, 2020). Las siglas empleadas corresponden a Ratas control + vehículo (NC), Control diabético+ vehículo (DM), Diabético + Extracto rico en isoflavona de raíz de Kudzu (100 mg/kg) (DM + Iso) Diabético + Extracto rico en isoflavona de raíz de Kudzu (200 mg/kg) (DM + Iso 200)

En esta imagen (ilustración 4) se puede ver la distribución normal de isletos pancreáticos ovales o redondeados no encapsulados con límites bien definidos se observó en el grupo NC + Iso y NC + Iso 200. Isletos pancreáticos de forma irregular con reducción pronunciada en el grupo DM, estas alteraciones estructurales se mejoraron en ratas diabéticas tratadas con extracto rico en isoflavona (grupo DM + Iso y DM + Iso 200). (Kingsley, et al., 2020)

Más ejemplos de medida de actividad biológica los podemos ver en el estudio de Rodrigues, et al. (2020), se analizó el potencial de los NADES para extraer la astaxantina

(AXT) contenida en desechos del caparazón de cangrejos, conchas de camarones, mejillones y de *Haematococcus pluvialis*. En este caso los NADES evaluados fueron de base terpénica para darle carácter apolar al medio de extracción, estando compuestos por perillyl alcohol, canfor, eucaliptol, mentol, ácido mirístico. Se evaluó la citotoxicidad, los efectos antiproliferativos en las células de cáncer colorrectal humano y el potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los extractos ricos en AXT obtenidos con NADES mostraron un gran potencial antiproliferativo y antimicrobiano. Todos los extractos obtenidos con NADES a base de terpeno presentaron citotoxicidad en células Caco-2. Sin embargo, ni el estándar AXT ni los extractos de Soxhlet presentaron citotoxicidad en células Caco-2. Es importante resaltar que los extractos ricos en AXT obtenidos con NADES no fueron separados de los extractos en toda la experimentación, por lo que fue crucial evaluar los perfiles citotóxicos y antiproliferativos de NADES terpénicos, considerando que la bioactividad del solvente podría influir fuertemente en la bioactividad de los extractos, lo cual parece que así fue. Las curvas de dosis-respuesta obtenidas para cada NADES mostraron que todos los sistemas presentaban cierta toxicidad en las células Caco-2 pero también podían inhibir la proliferación de las células HT-29. En cuanto al efecto antiproliferativo, todos los NADES demostraron una gran capacidad para inhibir la proliferación celular HT-29. Todos los NADES pudieron inhibir el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*. AXT es conocido por sus actividades antimicrobianas y conservantes, al ser así, el estándar AXT fue capaz de mejorar la actividad antimicrobiana de los solventes. Por otro lado, las muestras resultantes de la extracción de Soxhlet, todos los extractos presentaron MICs iguales o superiores a 500 $\mu\text{L} / \text{mL}$, que fue la concentración máxima probada. Finalmente pudo concluirse que la actividad antimicrobiana medida para los extractos de NADES no se debe exclusivamente al contenido de AXT, ya que algunos extractos con una menor cantidad de AXT pueden presentar la misma o incluso mayor actividad antimicrobiana, lo cual se debería a la combinación de los NADES y la misma AXT o con otros componentes extraídos.

Otro ejemplo de obtención de compuestos bioactivos de plantas empleando DES podemos verlo en el trabajo de Barbieria, et al. (2020) en el cual se extraen componentes bioactivos del romero, se midió la eficiencia de la extracción y la actividad antioxidante que posee. Con diferentes combinaciones de solventes DES, Cloruro de colina como aceptor de enlace de hidrógeno combinado independientemente con glicerol (CGH), ácido láctico (CALH), 1,2-propanodiol (CPH) y ácido oxálico (CAOH) como donador de

enlace de hidrógeno. Se identificó la presencia de diferentes compuestos fenólicos con actividad antioxidante. Se realizaron los ensayos de contenido fenólico total (TPC) siguiendo el método Folin-Ciocalteu. Todos los extractos de DES ensayados, excepto con cloruro de colina: glicerol, presentaron un alto rendimiento de de extracción en comparación con el etanol. El valor más alto en el ensayo de fenoles totales (Folin) se obtuvo con cloruro de colina: 1,2-propanodiol en comparación con el etanol (18% más alto). Con respecto a la actividad antioxidante evaluada por el método FRAP (Capacidad de reducción férrica del plasma), el etanol fue el solvente que presentó el valor más bajo entre los solventes evaluados. El extracto obtenido con etanol mostró capacidad antioxidante alrededor de tres veces menos que los extractos obtenidos con DES, lo que demuestra que estos solventes pueden contribuir a la transferencia de electrones. La capacidad del DES para estabilizar los compuestos fenólicos puede explicarse por sus interacciones intermoleculares, principalmente debido a los enlaces de hidrógeno entre los ácidos fenólicos encontrados en los extractos de romero y el solvente. Esta interacción reduce la degradación oxidativa porque disminuye el movimiento de las moléculas de soluto y, en consecuencia, reduce el contacto con el oxígeno en la interfaz de DES y aire. Con respecto a la captación de radicales DPPH, tres de los solventes estudiados, Cloruro de colina: glicerol, Cloruro de colina: 1,2-propanodiol, Cloruro de colina: ácido oxálico tenían una capacidad antioxidante que era 4-18% mayor que el etanol.

En el ámbito de subproductos encontramos un buen ejemplo en el estudio de Bosiljkova, et al.(2017), se utilizaron NADES combinados con UAE para extraer antocianinas de lías de vino, pues los metabolitos secundarios más representativos de la uva son los compuestos fenólicos, debido a sus valiosas actividades en términos de prevención de reacciones oxidativas y los beneficios observados contra enfermedades cardiovasculares, procesos inflamatorios y fisiopatológicos degenerativos. Se probaron siete NADES diferentes a base de colina para la extracción de antocianinas: cloruro de colina: ácido cítrico, cloruro de colina: ácido oxálico, cloruro de colina: ácido málico, cloruro de colina: glucosa, cloruro de colina: fructosa, cloruro de colina: xilosa, cloruro de colina: glicerol. El mejor rendimiento de extracción se obtuvo con cloruro de colina: ácido málico. Para el análisis de las antocianinas totales extraídas de las lías de vino se determinaron mediante el procedimiento clásico de blanqueamiento con bisulfito, ya que las antocianinas forman compuestos incoloros con el ion bisulfito, transfiriéndose así del catión flavylum de color rojo a una forma no coloreada. Los resultados indicaron al

NADES cloruro de colina: ácido málico como el solvente más prometedor, ya que, en el análisis de antocianinas totales extraídas, éste fue con mayor resultado. Asimismo, ha demostrado ser efectivo en la extracción de antocianinas de lías de vino, comparado con los solventes convencionales.

8. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EXTRAÍDOS

En general, las técnicas analíticas llevadas a cabo con DES/ NADES para la determinación de compuestos bioactivos se basa en los siguientes pasos:

Como ya hemos comentado, para la preparación de DES/NADES, se empieza calentando los componentes, el donador de enlace de hidrógeno y receptor de enlace de hidrógeno, con una relación molar presentada en cada estudio. Los dos componentes sólidos de cada mezcla se calientan a temperaturas que varían de 50 - 85° C (aproximadamente) con agitación continua hasta que se obtiene un líquido homogéneo.. Se mezcla los solventes con la muestra, en el cual se puede utilizar diversas opciones como extracción asistida por ultrasonido (EAU)/ extracción asistida por ultra sonido con calefacción (EAU), remoción/ extracción Sólido-líquido, extracción asistida por microondas (MAE), extracción de explosión, homogenización y cavitación de alta velocidad (HSH-CBE), extracción asistida por presión hidrostática (HHPAE), extracción asistida por homogenato (HAE) , extracción líquido-líquido o extracción mediante descargas eléctricas de alto voltaje como pretratamiento con agitación. La temperatura varía entre estudios pues debe de ser lo suficientemente alta como para disminuir la viscosidad, pero no para degradar los compuestos de alto valor biológico. Los extractos finales se centrifugan y se filtran para pasar a los análisis de bioactividad como TPC, DPPH, FRAP. Existen casos en los cuales después de centrifugar, se pasa a rotavapor para eliminar agua y también para separar los compuestos del NADES o DES, utilizado otros solvente (etanol o metanol en su mayoría), con el fin de posteriormente ser inyectados para la caracterización de los compuestos bioactivos con HPLC (Cromatografía líquida de alto rendimiento), MS (Espectrometría de masas), UPLC (Cromatografía líquida de ultra rendimiento). Para ilustrar ese último caso se puede ver que en el estudio de (Kingsley, et al, 2020), la extracción de las isoflavonas de la raíz de kudzu seca se llevó a cabo utilizando NADES a una relación de volumen de disolvente (ml) a material (g) de 20: 1. La extracción se realizó en un baño ultrasónico a 50 ° C durante 3 h. El extracto se separó de las fracciones insolubles por centrifugación (6000 rpm durante 30 minutos), luego se concentró hasta sequedad usando un evaporador rotatorio y se disolvió en metanol antes del análisis por HPLC.

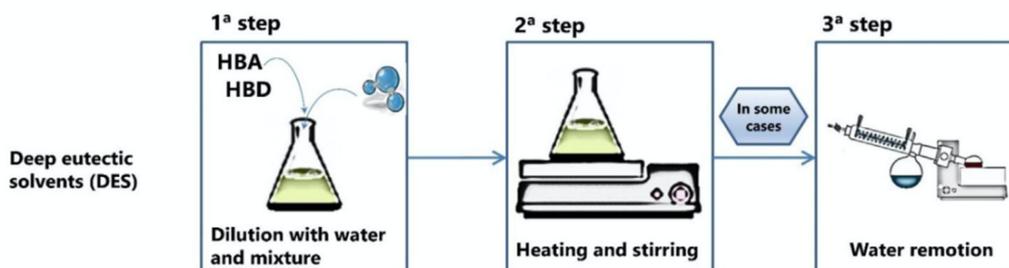


Ilustración 5 Diagrama de flujo de los principales procesos de síntesis DES (Benvenuti, 2019)

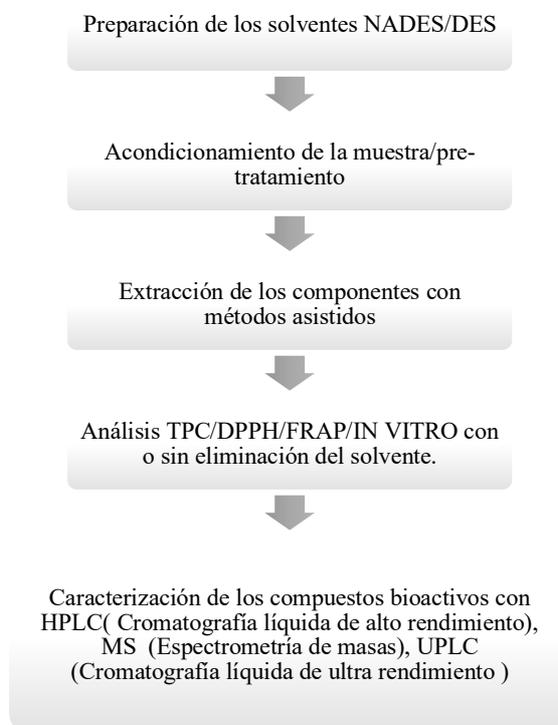


Ilustración 6 Técnicas generales analíticas en la determinación de compuestos bioactivos (Elaboración propia)

Como se puede ver en la figura 7, En el estudio presentado por Alañón, 2017, se propuso una nueva metodología basada en el uso de solventes eutécticos profundos (DES) y extracción asistida por microondas (MAE) y el análisis posterior por HPLC-DAD-ESI-TOF-MS para la extracción de compuestos fenólicos de oliva hoja. A veces el extracto DES se diluye con agua desionizada para facilitar la medición de absorbancia en

espectrofotómetro, como también la inyección cromatográfica, por factores de formación de picos y viscosidad.

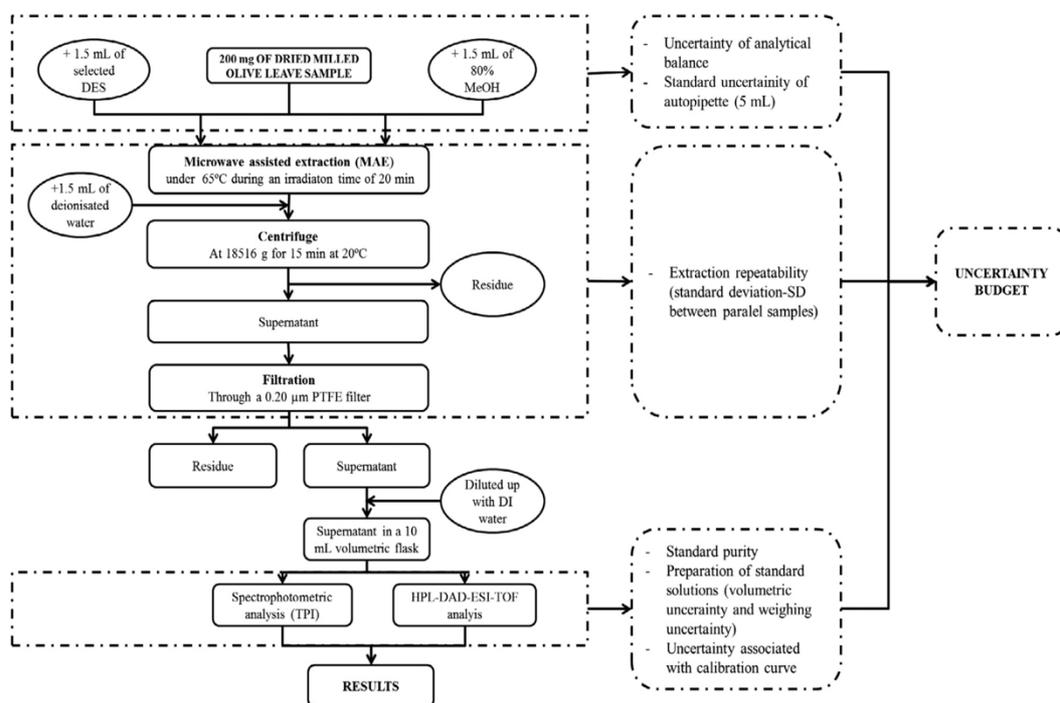


Ilustración 7 Determinación de compuestos fenólicos de hojas de olivo por el método MAE-DES-HPLC-DAD-ESI-TOF-MS. La línea interrumpida representaba posibles errores experimentales (incertidumbres) del procedimiento analítico propuesto. (Alañón, 2017)

En muchos estudios no se menciona el cómo se elimina el solvente o dan a entender que se pasa a hacer análisis y caracterización de los componentes extraídos en conjunto con los NADES/DES pues se considera que la toxicidad que tienen es casi nula o se han comprobado que la interferencia es despreciable, por lo que no requiere gastar energía en eliminarlos (Chanioti & Tzia, 2018). Un ejemplo claro para ver la recuperación de los compuestos bioactivos de los solventes se da en el estudio de (García Rodríguez et al, 2015). En este estudio se demuestra con éxito la capacidad de DES para a la extracción de compuestos fenólicos del aceite de oliva, así como se muestra un procedimiento para poder recuperar los compuestos extraídos los solventes DES, pues por la alta viscosidad no se puede evaporarlos. Casi todos los tipos de DES estudiados tuvieron un rendimiento mejorado para la extracción de estos componentes en comparación con el método clásico (metanol / agua). Con 11 DES y muestras de aceite de oliva se pudo obtener extractos bioactivos. Los extractos polares combinados (fase inferior) se lavaron con 60 ml de hexano para eliminar el aceite residual y se agitaron vigorosamente hasta que las dos fases

se observaron por decantación. El extracto polar se lavó cuatro veces con hexano y se burbujeó nitrógeno en el extracto DES para eliminar el hexano residual. Para la recuperación de compuestos a partir de extractos de DES, los extractos obtenidos se pasaron a través de una columna hidratado pretratado. Después de la adsorción, la columna cargada se lavó primero con suficiente agua desionizada hasta que se lavó todo el DES, luego los compuestos fenólicos se eluyeron con MeOH. La muestra metanólica se evaporó al vacío a 35 °C y se redisolvió con 2 ml de MeOH para análisis por HPLC-DAD. Los experimentos anteriores se realizaron por duplicado para cada extracto. Los compuestos fenólicos se cuantificaron usando un sistema de cromatografía líquida. El sistema estaba equipado con un detector de haz de diodos (DAD; las longitudes de onda utilizadas para la cuantificación eran 280 y 340 nm). Se utilizaron dos fases móviles diferentes para realizar la separación. La primera fue con Metanol / agua. En la segunda fase se llevó a cabo a un caudal de 1 ml / min usando una mezcla de agua (H₂O) acidificada con ácido tricloroacético al 0,01% (disolvente A) y acetonitrilo (CH₃CN) (disolvente B) como fase móvil. Por otro lado, en el análisis de HPLC-ESI-MS la separación cromatográfica se realizó utilizando agua / metanol como la fase móvil. El volumen de inyección fue de 20 µL y el caudal de fase móvil fue de 1 ml / min.

9. APLICACIONES REPORTADAS

Tabla 2 Aplicaciones reportadas

Título del artículo	Fuente Natural	Compuestos Extraídos	Beneficios	Solvente Eutéctico Profundo	Extracción	Análisis	Autor y año
Extracción sostenible de proteínas y sustancias bioactivas de la cáscara de granada (<i>Punica granatum L.</i>) usando líquidos presurizados y solventes eutécticos profundos.	Cáscara de granada (<i>Punica granatum L.</i>)	Compuestos fenólicos y proteicos	Antioxidantes y propiedades hipocolesterolémicas	DES: Cloruro de colina: Urea, Cloruro de colina:Úrea, Cloruro de colina:Etilenglicol, Cloruro de colina:Glicerol, Cloruro de colina: ácido acético, Cloruro de colina:glucose, Cloruro de colina:sorbitol, Acetato de sodio: ácido cítrico, Acetato de sodio: Úrea	PLE, DES con hidrólisis enzimática por ultrasonido.	HPLC-ESI-Q-TOF, Evaluación de capacidad antioxidante, Evaluación de la capacidad hipocolesterolémica, Evaluación de la capacidad antihipertensiva,	Hernández-Corroto, et al., 2020
Efecto antidiabético del extracto de raíz de kudzu rico en isoflavona en ratas diabéticas inducidas experimentalmente.	Raíz de kudzu	Puerarin, Daidzein, Genistein, Vitexina, 4-hidroxiflavona	Bioactividad contra diarrea, diabetes y enfermedades cardiovasculares	NADES:Cloruro de colina:ácido cítrico	NADES,Ultrasonido	HPLC, en ratas Wistar (glucosa en sangre en ayunas, hemoglobina glucosilada (HbA1c) y prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT), evaluación de parámetros hepáticos y renales, determinación de parámetros hematológicos, estudio histológico e inmunohistoquímico, análisis morfométrico)	Kingsley, et al., 2020

Título del artículo	Fuente Natural	Compuestos Extraídos	Beneficios	Solvente Eutéctico Profundo	Extracción	Análisis	Autor y año
Sistemas eutécticos profundos naturales a base de terpeno como solventes eficientes para recuperar astaxantina de los residuos de cáscara de cangrejo marrón.	Cangrejo pardo y conchas de camarones y <i>H. pluvialis</i> .	Astaxantina	Citotoxicidad, antiproliferación de cáncer y potencial antimicrobiano contra <i>Staphylococcus aureus</i>	NADES:Alcohol de perililo: Camphor DL-mentol:Alcohol de perililo DL-mentol: Camphor DL-mentol: Eucalyptol DL-mentol: Ácido mirístico	NADES,Sólido-líquido	UV-vis HPLC, evaluación de bioactividad Invitro, ensayo antiproliferativo, ensayos bacterianos, preparación de muestras, susceptibilidad antimicrobiana.	Rodrigues, et al., 2019
Extracción verde de alcaloides y polifenoles de hojas de <i>Peumus boldus</i> con solventes eutécticos profundos naturales y perfilado por HPLC-PDA-IT-MS / MS y HPLC-QTOF-MS / MS.	Hojas de <i>Peumus boldus</i>	Alcaloides y compuestos fenólicos: boldina, isoboldina, coclaurina, N-metilcoclaurina, pronuciferina, reticulina, laurotetanina, N-metil-laurotetanina, sinoacutina, isocorydina, N-óxido de isocorydina, nor-isocorydina y laurolitsina.	Actividad renoprotectora, propiedades anticancerígenas	NADES:Cloruro de colina:1,2-propanodiol, Cloruro de colina:Glicerol, Cloruro de colina: Ácido láctico, Cloruro de colina: Ácido levulínico, L- Prolina: Ácido cítrico, L- Prolina: Ácido oxálico, L- Prolina: Ácido levulínico	NADES,Extracción asistida por ultrasonido	Análisis HPHLCP-LQCT-ODAF-DM-SIT / M-MS.S / MS y HPLC-QTOF-MS / MS	Torres, et al., 2020

Título del artículo	Fuente Natural	Compuestos Extraídos	Beneficios	Solvente Eutéctico Profundo	Extracción	Análisis	Autor y año
---------------------	----------------	----------------------	------------	-----------------------------	------------	----------	-------------

Líquidos eutécticos profundos a base de derivados de cloruro de colina como nuevos disolventes alternativos verdes para la extracción de compuestos fenólicos de la hoja de olivo	Hojas de olivo de Hojiblanca (subproductos)	48 compuestos fenólicos	Antipertensiv, anticancerígeno, antiinflamatorio, Hipoglucemiante, antimicrobiano, antiviral, antitumoral, antitrombótico, efecto hipocolesterolémico.	NADES:Cloruro de colina:ácido láctico; Cloruro de colina:ácido oxálico; Cloruro de colina:ácido tartárico; Cloruro de colina:1,4-butanodiol; Cloruro de colina:etilenglicol; Cloruro de colina: xilitol; Cloruro de colina:1,2-propanodiol; Cloruro de colina: maltosa; Clorina de colina: urea	NADES,Extracción sólido-líquido con Microondas	Análisis espectrofotométrico, análisis HPLC-DAD-EDI-TOF, índice de fenol total por el método Folin Ciocalteu	Alañon; et al., 2018
Síntesis asistida por ultrasonidos de solventes eutécticos profundos a base de alcohol para la extracción en T de compuestos activos del jengibre	Jengibre en polvo	Gingerol, 8- gingerol, 10- gingerol	Antioxidantes-antiinflamatorios, anticancerígenos, analgésicos, antimicrobianos	DES:Cloruro de colina: Trietilenglicol, Cloruro de colina: etilenglicol, Cloruro de colina:1,3-propanodiol, Cloruro de colina:glicerol, Cloruro de colina: 1,3- butanodiol, Betaína: trelicilenglicol, Betaína: etilenglicol, Betaína: 1,3-Propanediol, Butaína:Glicerol, Betaína:1,3-butanodiol Lcarnitina:Trietilenglico, Lcarnitina:Etilenglicol, Lcarnitina:1,3propanediol, L-carnitina: Glicerol, L-carnitina: 1,3 butanodiol.	DES,Extracción sólido-líquido con baño ultrasónico	HPLC- DAD	Hsieh, et al., 2020

Título del artículo	Fuente Natural	Compuestos Extraídos	Beneficios	Solvente Eutéctico Profundo	Extracción	Análisis	Autor y año
Disolvente eutéctico profundo combinado con extracción asistida por ultrasonido como medio extractor de alta eficiencia para la extracción y evaluación de calidad de <i>Herba Epimedii</i>	<i>Herba Epimedii</i>	Flavonoides: Icarrin, IcarisdII, Epidimedin A, Epimedin B y Epimedin C	Tonifica el riñón y vigoriza el Yang. Actividades de anti-osteoporosis, antioxidación y antitumoral. Mejora la función cardiovascular y cerebrovascular. Modula las funciones inmunológicas.	DES: Cloruro de colina y L-prolina como componente 1 y glicerol; etilenglicol; 1,2-propilenglicol; 1,4-butanodiol, ácido láctico; ácido málico; glucosa, urea, ácido cítrico como componentes 2	DES, Extracción líquida-sólida	HPLC	Huiwen, et al. 2020
Disolventes eutécticos profundos a base de poliol para la extracción de antioxidantes polifenólicos naturales de <i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	Compuestos polifenólicos principales: ácido gálico, ácido cafeico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico	Propiedades inflamatorias, antimicrobianas.	DES: Cloruro de colina como donador de hidrógeno y al glicerol, etilenglicol; 1,3-propanodiol; 1,4 butanodiol	Extracción sólido-líquido DES.	TPC a través de Folin-Ciocalteu, análisis por HPLC, actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos (DPPH).	Wan, et al., 2019
Optimización del disolvente eutéctico profundo natural a base de cloruro de colina y glicerol para la extracción de sustancias bioactivas de corteza de <i>Cinnamomum burmannii</i> y <i>duramen de Caesalpinia sappan</i>	<i>Cinnamomum burmannii ladra</i> y <i>duramen de Caesalpinia sappan</i>	Trans-cinamaldehído, cumarina, protosappanina, sappan chalcona y hematoxilina	Contra la diabetes mellitus tipo 2 (madera de sappan tiene actividad inhibitoria contra la α -glucosidasa y la dipeptidil peptidasa-4)	NADES: mezcla de cloruro de colina (ChCl), que actúa como un aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA), con glicerol, que sirve como donador de enlaces de hidrógeno (HBD)	NADES-ultrasonidos	HPLC	Sindu, et al., 2019

Título del artículo	Fuente Natural	Compuestos Extraídos	Beneficios	Solvente Eutéctico Profundo	Extracción	Análisis	Autor y año
Disolventes eutécticos profundos aplicados en la extracción y estabilización del Romero (<i>Rosmarinus officinalis L</i>)	<i>Rosmarinus officinalis L</i>	Ácido rosmarínico, ácido cafeico, 7-metilrosmanol, rutina, naringina, ácido ferúlico	Antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno, antiviral.	DES: cloruro de colina como aceptor de enlace de hidrógeno y glicerol, ácido láctico, 1,2-propanodiol y ácido oxálico como donante de enlace de hidrógeno	DES Extracción sólido-líquido en baño ultrasónico	Contenido total de fenol con Folin-Ciocalteu, Actividad de radicales libres con DPPH Propiedad antioxidante reductora férrica (ensayo FRAP), HPLC-DAD.	Barbieri, et al.,2020
Disolventes eutécticos profundos naturales como un nuevo medio de extracción para metabolitos fenólicos en <i>Carthamus tinctorius L</i>	<i>Carthamus tinctorius L</i>	Hydroxysafflor amarillo, cartormin, carthamin, tripcoumaroylspermidines	Antioxidante, antidepresivo, antiviral	NADES ácido láctico: glucosa, prolina- ácido málico, cloruro de colina:sacarosa, cloruro de colina:glucosa, cloruro de colina: sorbitol, cloruro de colina: 1,2-propanodiol y fructosa-glucosa-sacarosa	NADES, Extracción sólido-líquido con calentamiento y agitación.	HPLC, NMR, and MS Analisis.	Dai, et al., 2013
Extracción mejorada de compuestos fenólicos de hojas de <i>Morus alba L.</i> mediante solventes eutécticos profundos combinados con extracción asistida por ultrasonidos	Mulberry (<i>Morus alba L.</i>)	ácido gálico, ácido gentísico, ácido clorogénico, ácido catequínico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido siríngico, epicatequina, rutina, 1 hiperina, ácido benzoico, astragalina, quercetina.	Inhibición de la hiperglucemia y funciones antimicrobianas y antiinflamatorias.	DES:Cloruro de colina: urea, Cloruro de colina: Etilenglicol Glicerol, Cloruro de colina: Glicerol, Cloruro de colina: ácido cítrico, Cloruro de colina: ácido DL-málico, betaína: ácido levulínico, betaína: ácido DL-láctico, betaína: glicerol, L-prolina: ácido DL-málico, L-prolina: Glicerol, L-prolina: ácido levulínico, L-prolina: ácido láctico	DES, extracción asistida por ultrasonidos	Análisis cuantitativo por HPLC-UV	Zhou, et al., 2018

Título del artículo	Fuente Natural	Compuestos Extraídos	Beneficios	Solvente Eutéctico Profundo	Extracción	Análisis	Autor y año
Disolventes eutécticos profundos naturales y extracción asistida por ultrasonido: enfoques ecológicos para la extracción de antocianinas de lías de vino	Lías de vino	Compuestos fenólicos	Prevención de reacciones oxidativas y los beneficios contra enfermedades cardiovasculares, procesos inflamatorios y estados fisiopatológicos degenerativos.	NADES: cloruro de colina: ácido cítrico, cloruro de colina: ácido oxálico , cloruro de colina: ácido málico, cloruro de colina: glucosa , cloruro de colina: fructose , cloruro de colina: xilosa , cloruro de colina: glycerol	NADES, Extracción asistida por ultrasonido	Determinación del contenido total de antocianinas, análisis por HPLC de antocianinas,	Bosiljkova, et al., 2017
Los solventes eutécticos profundos naturales se combinan con la técnica de extracción integrativa como un enfoque efectivo para la extracción de antocianinas de morera	Morera fresca	Vitaminas, minerales, ácidos fenólicos, flavanoles y antocianinas: la cianidina-3-O-glucósido y la cianidina-3-O-rutinósido se encuentran en la gran mayoría de las antocianinas, y la cianidina-3-O- y cianidin-3-O-son componentes menores.	Antioxidantes y propiedades hipocolesterolémicas	NADES: Cloruro de colina:Ácido láctico , Cloruro de colina : Ácido tartárico , Cloruro de colina:Ácido cítrico , Cloruro de colina:Xilitol, Cloruro de colina:Manitol, Cloruro de colina:Glicerol, Cloruro de colina:Fructosa , Cloruro de colina:Glucosa , Betaína:Glucosa, Ácido tartárico:Glucosa, Ácido cítrico:Glucosa, Ácido láctico:Glucosa y Cloruro de colina:Ácido cítrico:Glucosa.	NADES, Sólido-líquido , Técnica integradora de homogeneización de alta velocidad y extracción por cavitación-explosión (HSH-CBE)	Sistema de HPLC equipado con un detector UV de matriz de fotodiodos.	Guo, et al., 2019

Título del artículo	Fuente Natural	Compuestos Extraídos	Beneficios	Solvente Eutéctico Profundo	Extracción	Análisis	Autor y año
Extracción de compuestos fenólicos del orujo de oliva utilizando solventes eutécticos profundos naturales y técnicas innovadoras de extracción.	Orujo de oliva	compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y alcoholes, derivados secoiridoides, lignanos y flavonas)	actividades antivirales, antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas	NADES: Cloruro de colina:glicerol, Cloruro de colina:maltosa, Cloruro de colina:ácido cítrico y Cloruro de colina: ácido láctico	Extracción asistida por homogeneizado (HAE), Extracción asistida por microondas (MAE), Extracción asistida por ultrasonido (UAE), Extracción asistida por alta presión hidrostática (HHPAE),	Ensayo DPPH de actividad antioxidante, análisis HPLC-DAD	Chanioti, et al., 2018
Extracción con eutéctica profunda de solvente eutéctico de equinacósido y oleuropeína de <i>Syringa pubescens Turcz.</i>	<i>Syringa pubescens Turcz</i>	El equinacósido (ECH) y la oleuropeína (OLE) son los glucósidos principales	tratamiento de hepatitis y cirrosis, propiedad neuroprotectora	DES: Cloruro de colina: ácido láctico, Cloruro de colina: propanodiol, Cloruro de colina: D-glucosa, Cloruro de colina: ácido fórmico, Cloruro de colina: ácido oxálico Cloruro de colina: glicerol	Sólido-líquidoBaño ultrasónico	Detector de fotodiodos HPLC	Wang, et al., 2020
Rendimiento de los disolventes eutécticos profundos a base de colina en la extracción de tocoles del aceite de palma crudo	Aceite de Palma	Tocoferoles y tocotrienoles (comúnmente conocidos como vitamina E)	propiedades antioxidantes que pueden reducir el riesgo de cáncer y tumores relacionados	DES: Cloruro de colina: ácido acético Cloruro de colina: ácido malónico Cloruro de colina: ácido cítrico	Extracción líquido-líquido	Detector de fotodiodos HPLC	Abdul, et al., 2015

Título del artículo	Fuente Natural	Compuestos Extraídos	Beneficios	Solvente Eutéctico Profundo	Extracción	Análisis	Autor y año
Disolventes eutécticos profundos como medios verdes para la extracción de glucósidos flavonoides y aglicones de <i>Platycladi Cacumen</i>	<i>Platycladi Cacumen</i>	Glucósidos flavonoides (micricitrina y quercitrina) y Agliconas de biflavonas (amentoflavona e hinokiflavona).	Eficacia terapéutica: propiedades espasmolíticas, antiflogísticas, antioxidantes, antialérgicas y diuréticas	DES:Cloruro de colina: Ácido levulínico, Cloruro de colina: Etilenglicol, Cloruro de colina: N-Dimetilurea, Cloruro de colina: d-Glucosa, Betaína:Ácido levulínico, Betaína:Etilenglicol, Betaína:1-Metilurea Betaína:D-glucosa, L-prolina-Ácido levulínico, L-prolina:Glicerol, L-prolina:Acetamida, L-Prolina-D-Glucosa "	Baño ultrasónico	HPLC-UV	Zhuang, et al. 2016
Aplicación de solventes eutécticos profundos naturales para la extracción de antocianinas de <i>Catharanthus roseus</i> con alta capacidad de extracción y estabilidad que reemplaza a los solventes orgánicos convencionales.	<i>Catharanthus roseus</i>	Antocianinas	agentes antioxidantes y antiinflamatorios, prevención de ciertas enfermedades cardiovasculares y cáncer.	NADES:Cloruro de colina:1,2-propanodiol, ácido láctico:glucosa, prolina:ácido málico, ácido málico:cloruro de colina, cloruro de colina: glucosa y glucosa:fructosa:sacarosa	NADES y: EAU, UEH, sólido,líquido.	HPLC-DAD, análisis de LC-M	Dai, et al., 2016)
Enfoques novedosos mediados por solventes verdes a medida para la extracción de compuestos fenólicos de subproductos industriales agroalimentarios	Subproductos industriales agroalimentarios: torta de oliva, de cebolla, de tomate y de pera	Compuestos fenólicos	Actividad antimicrobiana y antioxidante, relacionada con la prevención del cáncer, trastornos inflamatorios y enfermedades cardiovasculares	NADES:Ácido láctico: glucosa, Ácido cítrico: Glucosa, Fructosa: Ácido cítrico	Extracción de EAU-NADES	Análisis HPLC-DAD	Fernández,et al.,2017

Título del artículo	Fuente Natural	Compuestos Extraídos	Beneficios	Solvente Eutéctico Profundo	Extracción	Análisis	Autor y año
Extracción ecológica de polifenoles de las cáscaras de pomelo utilizando descargas eléctricas de alto voltaje, solventes eutécticos profundos y glicerol acuoso.	Cáscaras de pomelo	polifenoles: Naringin	Antioxidante, anticancerígeno	DES: Cloruro de colina y Ácido láctico	Pretratamiento de descargas eléctricas de alto voltaje, extracción sólido-líquido	Índice de extracción de polifenoles Zp, contenido total de polifenoles, HPLC-DAD	El Kantar, et al., 2019
Aplicación de solventes eutécticos profundos naturales para la extracción y determinación de fenólicos en hojas de Cajanus cajan por cromatografía líquida de ultra desempeño	Hojas de C. cajan	Compuestos Fenólicos polares, polares- débiles	Efectos terapéuticos sobre la anemia falciforme, la plasmodiosis y la diabetes	NADES: Cloruro de colina:Glycerol, Cloruro de colina:1,4-butanodiol, Cloruro de colina:Etilenglicol, Cloruro de colina:Glucosa, Cloruro de colina:Gacarosa, Cloruro de colina:Maltosa, Cloruro de colina:Sorbitol, Cloruro de colina:Ácido cítrico, Cloruro de colina:Ácido málico, Cloruro de colina:Ácido láctico, Ácido cítrico:Glucosa, Ácido cítrico: Sacarosa, Ácido láctico:Glucosa, Ácido láctico: Sacarosa	MAE- NADES	Análisis UPLC	Wei,et al. , 2015

Título del artículo	Fuente Natural	Compuestos Extraídos	Beneficios	Solvente Eutéctico Profundo	Extracción	Análisis	Autor y año
Extracción de compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen por solventes eutécticos profundos (DES)	Aceite de oliva	Hidroxitirosol, Tyrosol, Hy-Ac, Oleacein, Oleocanthal, 1Acetoxypinoresinol, Hy-EA, Apigenina	Menor incidencia de enfermedad coronaria y ciertos tipos de cáncer	DES: Cloruro de colina : Glicerol, Cloruro de colina:Ácido láctico, Cloruro de colina :Úrea, Cloruro de colina: Sacarosa, Cloruro de colina: 1,4-butanodiol, Cloruro de colina:Xilitol, Cloruro de colina:1,2-propanodiol,Cloruro de colina: Ácido malónico, Cloruro de colina:Úrea:Glicerol, D - (+) - glucosa : Sacarosa	DES- sólido- líquido con agitación	Análisis HPLC-MS, análisis HPLC-DAD	Garcia, et al., 2015
Nuevos solventes eutécticos profundos naturales a base de ácido láctico: Eficiencia en la extracción asistida por ultrasonido de polifenoles antioxidantes de plantas medicinales griegas nativas comunes	<i>Origanum dictamnus</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> , <i>Origanum majorana</i> , <i>Salvia officinalis</i> , <i>Mentha spicata</i>	antioxidantes	actividad antioxidante	NADES: Cloruro de colina: Ácido láctico: , Ácido láctico: acetato de sodio Ácido láctico: acetato de amonio Ácido láctico: glicina: agua Ácido láctico: glicina	NADES- extracción asistida por ultrasonido	Rendimiento total de flavonoides, Determinación del rendimiento total de polifenoles, Determinación del poder reductor (PR), Determinación de la actividad antirradical (AAR), Evaluación de la eficiencia de extracción	Bakirtzi, et al., 2016
Extracción eficiente de flavonoides bioactivos de hojas de <i>Ginkgo biloba</i> utilizando solvente eutéctico profundo / mezcla de agua como medio verde	Hojas de <i>ginkgo biloba</i>	Quercetina, Kaempferol e isorhamnetin	Inhibir la aparición de la demencia, ralentizar el deterioro cognitive, reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares	50 DES	Sólido- líquido extracción UAE	Análisis por HPLC	Yang, et al., 2018

Título del artículo	Fuente Natural	Compuestos Extraídos	Beneficios	Solvente Eutéctico Profundo	Extracción	Análisis	Autor y año
Disolventes eutécticos profundos biocompatibles basados en cloruro de colina: caracterización y aplicación a la extracción de rutina de <i>Sophora japonica</i>	Flavonoide S. <i>japonica</i>	Rutina	Para tratar la hemorragia cerebral por hipertensión	DES: Cloruro de colina: Úrea, Cloruro de colina: a Acetamida, Cloruro de colina: Etilenglicol, Cloruro de colina: Glicerol, Cloruro de colina: 1,4-butanodiol, Cloruro de colina: Trietilenglicol, Cloruro de colina: Xilitol, Cloruro de colina: D-Sorbitol, Cloruro de colina: Ácido p-toluenosulfónico, oxalic acid, Cloruro de colina: Ácido levulínico, Cloruro de colina: Ácido malónico, Cloruro de colina: Ácido málico, Cloruro de colina: Ácido cítrico, Cloruro de colina: ácido tartárico, Cloruro de colina: xilosa : agua, Cloruro de colina: sacarosa :agua, Cloruro de colina: fructose :agua, Cloruro de colina: glucosa : agua, Cloruro de colina: maltosa :agua	Sólido- líquido con agitación	HPLC, toxicidad, biodegradación	Zhao, et al., 2015

Título del artículo	Fuente Natural	Compuestos Extraídos	Beneficios	Solvente Eutéctico Profundo	Extracción	Análisis	Autor y año
Extracción efectiva de flavonoides de frutas de <i>Lycium barbarum</i> L. mediante extracción asistida por ultrasonidos basada en solventes eutécticos profundos	<i>Lycium barbarum</i> L.	ácido clorogénico, morina, luteolina, ácido cumárico, ácido ferúlico, hiperósido, rutina, miricetina, quercitrina, apigenina.	propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antivirales, antitumorales y neuroprotectoras, y también mejora el metabolismo de los lípidos para limitar las complicaciones de la obesidad	DES: Cloruro de colina: 1,2-propanodiol glycerol, Cloruro de colina: Etilenglicol, Cloruro de colina: Ácido málico, Cloruro de colina: Ácido malónico, Cloruro de colina: ácido p-toluenosulfónico, Cloruro de colina: ácido levulínico, Cloruro de colina: Ácido oxálico, Cloruro de colina: resorcinol, Cloruro de colina: xilitol, Cloruro de colina: urea	Extracción sólido-líquido Ultrasonidos	HPLC	Chand, et al., 2019
Extracción mejorada de productos naturales bio-activos utilizando solventes eutécticos profundos a medida: aplicación a la extracción de flavonoides a partir de Flos sophorae	Flos sophorae, las flores secas de <i>Sophora japonica</i> L.	quercetina, kaempferol e glucósido de isorhamnetin	vasodilatación, antitumoral, antiplaquetario	DES: Cloruro de colina: glicerol, Cloruro de colina: Xilitol, Cloruro de colina: D - (+) - glucosa, L-prolina: D - (+) - glucosa, ácido cítrico: D - (+) - glucosa, Ácido cítrico: adonitol, Betaína: ácido DL-málico	Extracción sólido- líquido, ultrasonidos	Análisis LC-UV acoplado al tiempo cuadrupolo de espectrometría de masas de vuelo (UHPLC-Q-TOF-MS), ensayo DPPH	Nam, et al., 2015
Extracción verde y eficiente de la rutina del casco de trigo sarraceno tartario utilizando solventes eutécticos profundos naturales	<i>Fagopyrum tataricum</i>	Rutina	Actividades farmacológicas	NADES: Cloruro de colina: 1,2-propanodiol, Cloruro de colina: glicerol, Cloruro de colina: glucosa, Cloruro de colina: sacarosa, Cloruro de colina: xilitol, Cloruro de colina: Sorbitol, Glicerol: L-Prolina, Glicerol: L-Alanina Glicina, Glicerol: L -Histidina, Glicerol: L-Treonina, Glicerol:: L-Arginina, Glicerol: L-Lisina.	Extracción sólido-líquido ,ultrasonido	RP-HPLC, Toxicidades de NADES, Biodegradabilidad de NADES	Zhao, et al., 2015

Título del artículo	Fuente Natural	Compuestos Extraídos	Beneficios	Solvente Eutéctico Profundo	Extracción	Análisis	Autor y año
Disolventes eutécticos profundos naturales como extractores beneficiosos para mejorar la bioactividad de los extractos de plantas.	Extractos de piel de uva. <i>Vitis vinifera cv</i>	Catequina, delphinidin-3-O-monoglucósido, cianidin-3-O-mono-glucósido, petunidin-3-O-monoglucósido, peonidin-3-O-monoglucósido, malvidina-3-O-monoglucósido, malvidina-3-O-acetilmonoglucósidos, peonidin-3-monoglucósidos, malvidin-3-monoglucósidos, quercetina-3-O-glucósido	Antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio y anticancerígeno	NADES: Cloruro de colina: glucosa (2: 1), Cloruro de colina: fructosa (1.9: 1) Cloruro de colina: xilosa (2: 1), Cloruro de colina: glicerol (1: 2), Cloruro de colina: ácido málico (1: 1)	Extracción sólido- líquido y ultrasonidos	Cromatograma HPLC, Determinación del contenido fenólico total, Determinación del contenido total de antocianinas, Ensayo de capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC), Determinación de la actividad biológica in vitro por ensayo de citotoxicidad, Evaluación morfológica por microscopía óptica, Citotoxicidad de NADES	Huan, et al.,2017

Nota: Elaboración propia

a. NADES/DES CON MEJOR DESEMPEÑO EN LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

En los estudios presentados en la tabla anterior, se puede evidenciar la versatilidad de los sistemas basados en DES y NADES para la obtención de compuestos bioactivos, en su mayoría para compuestos fenólicos. Sin embargo, estos solventes también han sido aplicados en la extracción de carotenoides y proteínas como en el estudio de Herández-Corroto et al. (2020) que se pudo extraer proteínas y sustancias bioactivas de la cáscara de granada (*Punica granatum* L.) usando solventes eutécticos profundos. Para recuperar proteínas de cáscara de granada la mejor combinación de DES fue Cloruro de colina: Ácido acético: Agua a un ratio de (1:1:10, mol/mol/mol), con el cual se pudo extraer mayor cantidad de proteínas bioactivas. En el caso de carotenoides como la astaxantina de subproductos de cáscara de cangrejo, la mejor de opción NADES fue ácido mirístico: mentol (8:1, mol/mol) (Rodrigues, et al., 2019). Por otro lado, en el caso de compuestos fenólicos se tiene una serie de combinaciones que dependen en gran medida de la materia prima y de los compuestos diana como se puede ver en los siguientes ejemplos:

- En el estudio de Dai et al. (2016), el solvente eutéctico con mayor rendimiento fue el ácido láctico:glucosa para la extracción de antocianinas.
- El Ácido láctico:glucosa (5: 1, mol/mol) tuvo mayor rendimiento para compuestos fenólicos. (Fernández, et al., 2017)
- En el estudio de dónde se extrajo gingerol, los DES con mayor rendimiento frente a solventes convencionales fueron Betaína:1,3-butanodiol (1:04, mol/mol/), Lcarnitina:Trietilenglico (1:04, mol/mol), L-carnitina: 1,3 butanodiol (1:04, mol/mol) Hsieh et al.(2020)
- Para la extracción de flavonoides en el estudio Huiwen et al. (2020), el mejor DES fue L-proline: Etilenglicol (1:4, mol/mol)(DES: agua = 7: 3, v / v)

b. NADES/DES FRENTE A SOLVENTES CONVENCIONALES

En estos estudios se ha podido ver la facilidad con la que se puede conseguir estos tipos de solventes verdes, pues pueden ser encontrados en las células con facilidad como metabolitos primarios. Desde un punto de vista medioambiental y económico, también presentan grandes ventajas con respecto a su biodegradabilidad, sostenibilidad, bajo costo, preparación sencilla y baja o casi nula toxicidad. Todas estas propiedades sugieren

su gran potencial como medio de extracción para productos naturales y sus posibles aplicaciones para alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos.

En general, en estos estudios realizados con NADES/DES, los resultados mostraron que estos solventes presentaron igual y mayores capacidades de extracción para los compuestos bioactivos. Un claro ejemplo se da en el estudio de donde se extrajo mayores cantidades de cafeína, rutina, naringina y ácido ferúlico comparado con las extracciones realizadas con etanol. (Barbieria, et al, 2020)

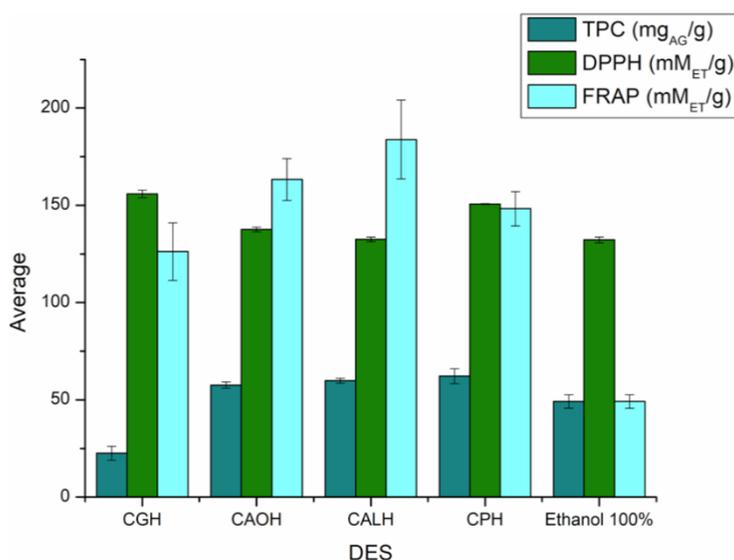


Ilustración 8 Rendimiento de DES frente a Etanol (Barbieria, y otros, 2020)

c. BIOACTIVIDAD DE NADES/ DES

Asimismo, estos solventes eutécticos han demostrado que no sólo pueden competir frente a solventes convencionales con rendimientos de extracción superiores ; sino que también tienen actividad propia como por ejemplo, protege a los compuestos extraídos, manteniendo así la actividad biológica inicial. En el estudio de Na Guo et al.(2019) se muestran cómo los extractos de mora con NADES pueden comportarse como un agente protector para las antocianinas extraídas de la mora. Estos solventes eutécticos se comportan como un antioxidante para los compuestos que son sensibles al medio ambiente (oxígeno, luz, temperatura y pH). La forma de protección se basa en la interacción del donador de enlace de hidrógeno (HBD) y el aceptor de enlace de hidrógeno (HBA) que los NADES forman, pues puede comportarse como un sustituto en el intercambio aniónico o catiónico cuando los compuesto se exponen a en condiciones extremas. Como resultado en este estudio, se observó una disminución en la tasa de

degradación de las sustancias inestables a comparación con los extractos realizados con solventes convencionales.

Es importante tener en cuenta las principales propiedades químicas y físicas de estos solventes emergentes como el punto de fusión, la densidad, la viscosidad, la conductividad, la polaridad y la solubilidad. Estas propiedades en los disolventes eutécticos tienen la ventaja que se pueden modificar enormemente mediante cambios en la temperatura y la cantidad de agua agregada. En los estudios realizados con solventes eutécticos se tiene muy presente la viscosidad, la cual es muy alta a comparación con los solventes convencionales, algo muy característicos de los NADES/ DES, lo cual dificulta la extracción, debido a que afecta la transferencia de materia. La viscosidad de los DES/NADES también cambia significativamente según su composición, a pesar de ello en todos los casos se puede reducir mediante la adición de agua. Por ejemplo, en el estudio donde se evaluó la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos en hojas de *C. cajan*. (Wei, et al., 2015) Se prepararon catorce NADES con una proporción de componente (1: 2, mol/mol) y para aumentar la transferencia de masa se usó 20% (v / v) de agua en las soluciones NADES. En el experimento se encontró que contenía 6.978 mg/g stilbenes cajaninstilbene y 4.370 mg/g de ácido y la longistilina C. Sin embargo, un exceso alto de adición de agua puede impactar negativamente entre las interacciones del solvente y los compuestos. Los solventes eutécticos pueden proporcionar ventajas de poder variar el contenido de agua, volviendolos más polares o menos polares si se desea. Asimismo, la viscosidad de estos solventes también puede ser influenciada por la temperatura. Aumentos de temperatura puede causar la disminución de la viscosidad y mejores rendimientos de extracción. Pero este aumento de temperatura no puede ser excesivo ya que una temperatura de extracción muy alta, puede llegar a dañar los compuestos que se quieren extraer.

d. TOXICIDAD

Una característica importante de los DES y, especialmente de los NADES, es su baja toxicidad. Esto hace que puedan ser aplicados directamente tanto en formulaciones alimenticias como farmacéutica, si son elaborados con metabolitos primarios de células, los cuales recientemente han sido llamado como NADES. (Bakirtzi, et al. 2016). De acuerdo con Paiva et al. (2014) no se detectó ningún efecto citotóxico en los componentes

de NADES. Prueba de su baja toxicidad es que incluso muchos de ellos carecen de actividad antimicrobiana como demostró el trabajo de Huang et al. (2017) donde se verificó la toxicidad de NADES contra dos bacterias gram positivas (*S. aureus* y *L. monocytogenes*) y dos gramnegativas (*E. coli* y *S. enteritidis*) y no se detectó inhibición del crecimiento microbiano. Sin embargo, esto depende en gran medida de los compuestos que den origen a los NADES. En el estudio de Rodrigues et al. (2020), los NADES empleados eran de base mono y diterpénica y mostraron que todas las combinaciones presentaban cierta toxicidad en las células Caco-2 pero también podían inhibir la proliferación de las células HT-29. Asimismo, todos los NADES terpénicos pudieron inhibir el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*. De la misma forma, en el estudio de Zhao et al. (2015) hubo ciertos DES, en especial los que contenían ácidos orgánicos, que demostraron un efecto antimicrobiano contra las bacterias gramnegativas y grampositivas debido a su bajo pH.

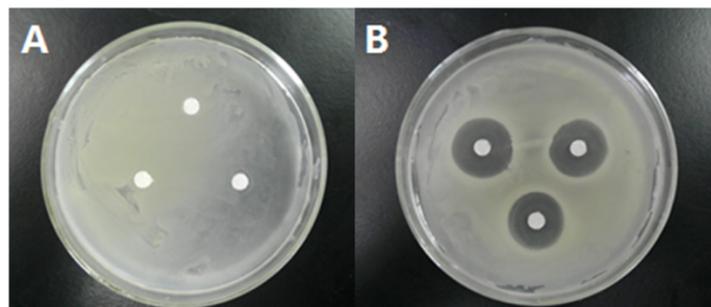


Ilustración 9 Efecto inhibitorio de diferentes DES en la *E. coli*: (A) Cloruro de colina: Úrea con la *E. coli*. (B) Cloruro de colina: Ácido cítrico con la *E. coli*. (Zhao, et al., 2015)

Finalmente, en el estudio de Benlebna et al. (2018), se investigó sobre la toxicidad de los NADES Betaina: glicerol en ratas. Se demostró ciertos efectos adversos de la administración oral de una dosis alta de Betaina: glicerol. La absorción de la mezcla indujo mortalidad en dos ratas de cada seis, restricción dietética, consumo excesivo de agua, pérdida de peso, pérdida de tejido adiposo, hepatomegalia, estrés oxidativo plasmático y aumento de los niveles de lípidos en sangre. Esto ocurrió a pesar de que el extracto era rico en ácidos clorogénicos, los cuales tienen efectos muy beneficiosos. Estos efectos perjudiciales se debieron a la gran cantidad de NADES que se proporcionó a las ratas, además se conoce el efecto perjudicial del exceso de consumo de glicerol. En conclusión, se puede decir que es necesario medir la toxicidad de estos solventes, tener

en cuenta la cantidad administrada y la combinación que se utilizará pues puede provocar efectos tanto beneficiosos como adversos.

e. BIODEGRADABILIDAD

Desde el punto de vista medioambiental, en general, los DES y NADES se consideran solventes verdes debido a la gran biodegradabilidad que poseen (> 68% en 28 días) y menor toxicidad bacteriana en comparación con los solventes tradicionales. El cloruro de colina (ChCl), el más utilizado en la investigación de los sistemas de solventes eutécticos como aceptor de enlaces de hidrógeno, tiene características muy biodegradables, no es tóxico y es de bajo costo, puesto que podemos encontrar esta sal de aminoácido naturalmente en la membrana lipídica de muchas células. En el estudio de Zhao et al. (2015) se analizó la biodegradabilidad de los DES, con una prueba de botella cerrada. Los DES se agregaron a un medio acuoso que contenía oxígeno. Se inoculó la mezcla con microorganismos presentes en el agua de lago, con el fin de poder medir el valor de biodegradación en un intervalo de tiempo establecido. Sobre la base de la prueba de botella cerrada, la biodegradabilidad del benzoato de sodio (sustancia de referencia) fue del 62,8% en el día 14, mientras que la de todos los DES probados fue > 69.3% después de 28 días. El orden de biodegradabilidad encontrado fue DES basados en aminos \approx DES basados en azúcares > DES basados en alcoholes > DES basados en ácidos. Por lo tanto, los DES considerados en este estudio se podían considerar solventes verdes o biodegradables.

10. CONCLUSIONES

El uso de solventes eutécticos para aplicaciones de extracciones a partir de materias primas naturales, especialmente para ser usados alimentos, une el interés actual que se tiene de practicar procesos cada vez más verdes para la recuperación de compuestos bioactivos de productos naturales y subproductos agroindustriales. La capacidad de extracción de los DES y NADES se basa en sus componentes individuales que principalmente son metabolitos primarios de las células, a sus concentraciones, y por su puesto también al método de extracción utilizado para su aplicación. Para ayudar a la selección de los DES/NADES, entre las características que se debe de tener en cuenta son la viscosidad, polaridad y bioactividad propia de estos solventes, pues este último puede influir en la bioactividad del componente bioactivo que se quiere estudiar. Estos disolventes han logrado extraer una amplia variedad de compuestos bioactivos como alcaloides, compuestos fenólicos, aceites esenciales, carotenoides y proteínas, lo que confirma su gran versatilidad y la fácil customización que tienen. En resumen, se puede concluir que los NADES/ DES destacan debido a que están formados por componentes de relativo bajo costo, fáciles de conseguir y atractivos principalmente para aplicaciones alimentarias y farmacéuticas. Considerando la variedad de estos solventes, posibles usos, capacidad de customización y extracción hacen que la selección del “mejor solvente” siga siendo un desafío a seguir estudiando.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Kaur, K. (2016). *Functional nutraceuticals: past, present, and future*. doi:10.1016/B978-0-12-804305-9.00002-6
- García, A., Rodríguez-Juan, E., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rios, J. J., & Fernández-Bolaños, J. (2015). *Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs)* (Vol. 197). Food Chemistry.
- Chanoti, S., & Tzia, C. (2018). Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep T eutectic solvents and innovative extraction techniques. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 48, 228-239.
- Guo, N., Ping-Kou, Jiang, Y.-W., Wang, L.-T., Niu, L.-J., Liu, Z.-M., & Fu, Y.-J. (2019). *Natural deep eutectic solvents couple with integrative extraction technique as an effective approach for mulberry anthocyanin extraction*. *Food Chemistry*, 296, 78–85. doi:10.1016/j.foodchem.2019.05.196
- Barbieria, J. B., Goltza, C., Cavalheiroa, F. B., Tocib, A. T., Igarashi-Mafraa, L., & Mafra, M. R. (2020). Deep eutectic solvents applied in the extraction and stabilization of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) phenolic compounds. *Industrial Crops & Products*, 144, 1-8 Doi: org/10.1016/j.indcrop.2019.112049.
- Benvenuti, L., Ferreira, A., & Sandra, S. (2019). Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES? *Trends in Food Science & Technology*. doi:10.1016/j.tifs.2019.06.003
- Abdul, N., Mei, N., Choo, Y., Hashim, M., & Natesan, J. (2015). Performance of Choline-Based Deep Eutectic Solvents in the Extraction of Tocols from Crude Palm Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92. doi:10.1007/s11746-015-2720-6
- Alañon, M. (2018). Choline chloride derivative-based deep eutectic liquids as novel green alternative solvents for extraction of phenolic compounds from olive leaf. *Arabian Journal of Chemistry*. doi:10.1016/j.arabjc.2018.01.00
- Bakirtzi, C., Triantafyllidou, K., & Makris, D. (2016). Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(3), 120-127. doi:10.1016/j.jarmap.2016.03.003
- Bosiljkova, T., Dujmic, F., Cvjetko, M., Hribar, J., Vidrihb, R., Brncic, M., . . . Jokic, S. (2017). Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food and Bioprocess Technology*, 102. doi:10.1016/j.fbp.2016.12.005
- Chemistry, F. (2017). Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products. *Food Chemistry*, 239. doi:10.1016/j.foodchem.2017.06.150
- Dai, Y., Geert, R., & Young, C. (2013). Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Analytical Chemistry*, 6272-6278. doi:doi.org/10.1021/ac400432p
- Dai, Y., Rozema, E., Verpoorte, R., & Choi, Y. (2016). Dai, Yuntao & Rozema, Evelien & Verpoorte, Rob & Choi, Young. (2016). Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *Journal of Chromatography A*. doi:10.1016/j.chroma.2016.01.037.
- El Kantar, S., Rajha, H., Boussetta, N., Vorobiev, E., Maroun, R., & Louka, N. (2019). Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage

- electrical discharges, deep eutectic solvents and aqueous glycerol. *Food Chemistry*, 295. doi:10.1016/j.foodchem.2019.05.111
- Hernández-Corroto, E., Plaza, M., Marina, M. L., & García, M. C. (2020). Sustainable extraction of proteins and bioactive substances from pomegranate peel (*Punica granatum L.*) using pressurized liquids and deep eutectic solvents. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 102314. doi:10.1016/j.ifset.2020.102314
- Guo, N., Kou, P., Wei, Y., Wang, L., Niu, L., Liu, Z., & Fu, Y. (2019). Natural deep eutectic solvents couple with integrative extraction technique as an effective approach for mulberry anthocyanin extraction. *Food Chemistry*, 296, 78-85. doi:10.1016/j.foodchem.2019.05.196
- Hsieh, Y., Li, Y., Zuchen, P., Zhengjian, C., Jiahai, L., Jumao, Y., . . . Jiaheng, Z. (2020). Ultrasonication-assisted Synthesis of Alcohol-Based Deep Eutectic Solvents for Extraction of Active Compounds From Ginger. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 63. doi:10.1016/j.ultsonch.2019.104915
- Huiwen, G., Shuo, L., Shengfeng, L., Qisheng, F., Chang, M., Jing, Z., & Zhili, X. (2020). Deep eutectic solvent combined with ultrasound-assisted extraction as high efficient extractive media for extraction and quality evaluation of Herba Epimedii. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 185. doi:doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113228
- Kingsley, D., Mukhlynina, E., Moroz, G., Gette, I., Danilova, I., & Kovaleva, E. (2020). Anti-diabetic effect of isoflavone rich kudzu root extract in experimentally induced diabetic rats. *Journal of Functional Foods*, 68. doi:10.1016/j.jff.2020.103922
- Rodrigues, L., Carolina, P., Leonardo, I., Fernández, N., Gaspar, F., Silva, J., . . . Matias, A. (2020). Terpene-Based Natural Deep Eutectic Systems as Efficient Solvents To Recover Astaxanthin from Brown Crab Shell Residues. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8. doi:10.1021/acssuschemeng.9b06283
- Sindu, A., Chany, F., & Abdul, M. (2019). Optimization of choline chloride-glycerol based natural deep eutectic solvent for extraction bioactive substances from *Cinnamomum burmannii* barks and *Caesalpinia sappan* heartwoods. *Heliyon*. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02915
- Torres, J., Gómez, S., Pérez, J., & Pastene, E. (2020). Green Extraction of Alkaloids and Polyphenols from *Peumus boldus* Leaves with Natural Deep Eutectic Solvents and Profiling by HPLC-PDA-IT-MS/MS and HPLC-QTOF-MS/MS. 9(242). doi:10.3390/plants9020242
- Wan, M., Lorwirachsutee, A., Theodoropoulos, C., & Gonzalez, M. (2019). Polyol-Based Deep Eutectic Solvents for Extraction of Natural Polyphenolic Antioxidants from *Chlorella vulgaris*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7. doi:10.1021/acssuschemeng.8b05642
- Wang, X., Wu, Y., Li, J., Wang, A., Li, G., Ren, X., & Yin, W. (2020). Ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of echinacoside and oleuropein from *Syringa pubescens* Turcz. *Industrial Crops & Products*, 151. doi:10.1016/j.indcrop.2020.112442
- Yang, M., Cao, J., Lu, C., & Su, E. (2018). Efficient Extraction of Bioactive Flavonoids from *Ginkgo biloba* Leaves Using Deep Eutectic Solvent/Water Mixture as Green Media. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 32(3), 315-324. doi:10.15255/CABEQ.2017.1146
- Zhao, B., Xu, P., Yang, F., Wu, H., Zong, M., & Lou, W. (2015). Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application

- to the Extraction of Rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 3(11). doi:10.1021/acssuschemeng.5b00619
- Zhou, P., Wang, X., Liub, P., Huang, J., Wanga, C., Pana, M., & Kuang, Z. (2018). Enhanced phenolic compounds extraction from *Morus alba* L. leaves by deep eutectic solvents combined with ultrasonic-assisted extraction. *Industrial Crops & Products*, 120. doi:10.1016/j.indcrop.2018.04.071.
- Zhuang, B., Dou, L., Li, P., & Liu, E.-H. (2016). Deep eutectic solvents as green media for extraction of flavonoid glycosides and aglycones from *Platycladi Cacumen*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 134. doi:10.1016/j.jpba.2016.11.049
- Palma, M., Barbero, M., Piñeiro, Z., Liazid, A., Barroso, C., Rostagno, M., . . . Meireles, M. (2014). Extraction of natural products principles and fundamental aspects. En *Natural Product Extraction*. doi:10.1039/9781849737579-00058
- Yao Huang, F. F.-G. (2017). Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 221(1400–1405). doi:10.1016/j.foodchem.2016.11.013
- Jablonskýa, M., Škulcováa, A., Malvisb, A., & Šimac, J. (2018). Extraction of value-added components from food industry based and agro- T forest biowastes by deep eutectic solvents. *Journal of Biotechnology*, 282, 46-66 DOI: /10.1016/j.jbiotec.2018.06.349.
- Chemat, F., Vian, M. A., Ravi, H. K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S., & Tixier, A.-S. F. (2019). Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects. *Molecules*, 1-27 doi:10.3390.
- Durua, K. C., Mukhlyninac, E. A., Moroza, G. A., Gettec, I. F., Danilovaa, I. G., & Kovalevaa, E. G. (2020). Anti-diabetic effect of isoflavone rich kudzu root extract in experimentally induced diabetic rats. *Journal of Functional Foods*, 68, 1-11 DOI: 10.1016/j.jff.2020.103922.
- Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2019). Green solvents for the extraction of bioactive compounds from natural products using ionic liquids and deep eutectic solvents. *Current Opinion in Food Science*, 26, 87-93. doi:10.1016/j.cofs.2019.04.003
- Universidad de las Palmas de Gran Canaria. (2019). *Biblioteca Universitaria*. Obtenido de <https://biblioguias.ulpgc.es/sciencedirect>
- Fundación Española Para la Ciencia y la Tecnología. (2019). *BASE DE DATOS DE SCOPUS*. Obtenido de <https://www.recursoscientificos.fecyt.es/licencias/productos-contratados/scopus>
- Chand Ali, M., Chen, J., Zhang, H., Li, Z., Zhao, L., & Qiu, H. (2019). *Effective extraction of flavonoids from Lycium barbarum L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction*. *Talanta*.doi:10.1016/j.talanta.2019.05.012
- Flores Mazzini, M. X., & Jurado Miranda, M. F. (2015). Análisis de la gestión comercial de medianas empresas dedicadas a la venta al por mayor de alimentos y bebidas en la ciudad de Guayaquil (2010-2013) y el uso del E-Commerce para mejorar su estrategia comercial. (*Tesis de Ingeniera en Gestión Empresarial Internacional*). Universidad Católica de Santiago de Guayaquil Facultad de Ciencias Económicas y Administrativas, Guayaquil, Ecuador. Recuperado el 1 de Mayo de 2020, de <http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/4112>
- Briones-Labarca, V., Plaza-Morales, M., Giovagnoli-Vicuña, C., & Jamett, F. (2015). *High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulforaphane and fatty acids from Chilean papaya (Vasconcellea*

- pubescens*) seeds: Effects of extraction conditions and methods. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 525–534. doi:10.1016/j.lwt.2014.07.057
- Alvarez-Rivera, G. B.-V. (2020). *Pressurized Liquid Extraction. Liquid-Phase Extraction*. doi:10.1016/b978-0-12-816911-7.00013
- Wei, Z., Qi, X., Li, T., Luo, M., Wang, W., Zu, Y., & Fu, Y. (2015). . Application of natural deep eutectic solvents for extraction and determination of phenolics in *Cajanus cajan* leaves by ultra performance liquid chromatography. *Separation and Purification Technology*, 149. doi:10.1016/j.seppur.2015.05.015