



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL USO DE LOS SOLVENTES EUTÉCTICOS
PROFUNDOS NATURALES (NaDES) EN LA EXTRACCIÓN DE
COMPUESTOS FENÓLICOS EN RESIDUOS DE CACAO**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: Lisbeth Leonor Encalada Quizhpi

TUTORA: Mgs. Enith Vanessa Yáñez

COTUTORA: PhD. Ery Odette Fukushima

COTUTOR: PhD. Pablo Andrés Cisneros

Napo-Ecuador

2024

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

De mi consideración:

Yo, Lisbeth Leonor Encalada Quizhpi con documento de identidad N° 0957378292, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniera en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

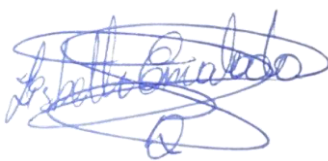
En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos de forma escrita en el presente documento son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Declaro que el trabajo escrito es el resultado del Convenio de Cooperación Interinstitucional No 035-IKIAM-2021, a través del cual la investigación se ejecutó en colaboración con la empresa Magic Nature S.A.S. B.I.C.

La información y los resultados obtenidos que tengan cualquier tipo de aplicación comercial o industrial, y el informe en el que se materializan respecto del estudio de los procesos de extracción de material vegetal y solventes verdes son de titularidad de Magic Nature S.A.S. B.I.C., de conformidad con la cláusula octava Convenio de Cooperación Interinstitucional No 035-IKIAM-2021.

Tena, 23 de febrero de 2024

Atentamente,



Lisbeth Leonor Encalada Quizhpi

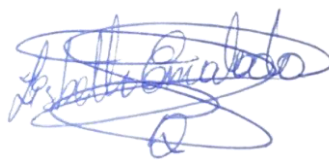
CI: 0957378292

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Lisbeth Leonor Encalada Quizhpi con documento de identidad N° 0957378292, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: “Evaluación del uso de solventes eutécticos profundos naturales en la extracción de compuestos fenólicos en residuos de cacao” de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Tena, 23 de febrero de 2024



Lisbeth Leonor Encalada Quizhpi

CI: 0957378292

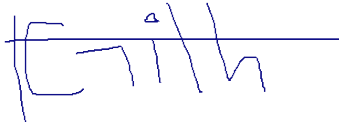
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de titulación: "Evaluación del uso de solventes eutécticos profundos naturales en la extracción de compuestos fenólicos en residuos de cacao" en la modalidad de: tesis fue realizado por Lisbeth Leonor Encalada Quizhpi, bajo mi dirección.

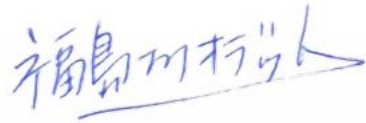
El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiám, para su entrega y defensa.

Tena, 23 de febrero de 2024

Firma



Enith Vanessa Yáñez Ramírez
C.I: 1713485033



Ery Odette Fukushima
C.I: 1759301714



Pablo Andrés Cisneros
C.I: 1003237177

AGRADECIMIENTOS

A la empresa Magic Nature & Flavor por el financiamiento de la tesis. A la profesora Ery Fukushima por acompañarme en todo el proceso de la elaboración en la investigación. A la técnica del Laboratorio de Química 2, Carolina Ñacato por el apoyo en los ensayos químicos cuantitativos y descripción de las propiedades físicas de los NaDES. Al profesor Pablo Cisneros por el acceso al equipo infrarrojo que me permitió identificar la formación de los enlaces de hidrógeno. A la técnica del Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica Nina Espinoza, por el apoyo en los ensayos de toxicidad de los NaDES. A mi tutora Vanessa Yáñez por estar pendiente en el proceso final de mi titulación.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis queridos padres, quienes han sido mi faro y apoyo constante a lo largo de mi travesía universitaria. Agradezco también a todos mis amigos y familiares por su inquebrantable respaldo, que ha sido la fuerza impulsora detrás de cada logro alcanzado.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	
CARÁTULA	
DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.....	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA.....	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema.....	3
1.3. Justificación de la investigación	4
1.4. Objetivos de la investigación.....	5
1.4.1. <i>Objetivo general</i>	5
1.4.2. <i>Objetivos específicos</i>	5
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	6
2.1. Preparación de los líquidos eutécticos profundos naturales (NADES).....	6
2.2. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y toxicidad de los NaDES.....	7
2.2.1. <i>Espectroscopia Infrarrojo</i>	7
2.2.2. <i>Densidad, viscosidad, pH y conductividad eléctrica</i>	7
2.2.3. <i>Hemólisis</i>	7
2.3. Preparación del material vegetal	8
2.4. Extracción de compuestos fenólicos de los residuos de cacao	8
2.5. Cuantificación de fenoles	9
2.6. Actividad antioxidante	9
2.6.1. <i>Ensayo DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)</i>	9

2.6.2. Ensayo FRAP (Poder Reductor Férrico)	10
2.7. Análisis estadístico.....	10
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS	12
3.1. Formación de los NaDES.....	12
3.2. Propiedades fisicoquímicas de los NaDES.....	12
3.2.1. Viscosidad.....	12
3.2.2. Densidad.....	13
3.2.3. pH.....	13
3.2.4. Conductividad eléctrica.....	13
3.3. Caracterización de los NaDES y sus componentes mediante FTIR	14
3.4. Hemólisis de las NaDES	19
3.5. Extracción de compuestos fenólicos	20
3.6. Actividad antioxidante	22
3.7. Correlación de Pearson.....	25
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.....	27
4.1. Formación de los NaDES.....	27
4.2. Propiedades fisicoquímicas de los NaDES.....	28
4.2.1. Densidad.....	28
4.2.2. Viscosidad.....	29
4.2.3. Conductividad eléctrica.....	30
4.2.4. pH.....	31
4.3. Caracterización de los NaDES mediante FTIR.....	32
4.4. Hemólisis de los NaDES	36
4.5. Extracción de compuestos fenólicos	38
4.6. Actividad antioxidante	40
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	43
5.1. Conclusiones	43
5.2. Recomendaciones	44
REFERENCIAS	
ANEXO	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de preparación de los NaDES.....	6
Tabla 2. Descripción de los NaDES elaborados.....	12
Tabla 3. Medida de las propiedades físicas de los NaDES por triplicado a temperatura ambiente.	13
Tabla 4. Parámetros para la validación del método de cuantificación de fenoles totales mediante espectrofotometría UV-Vis-NIR.	22
Tabla 5. Correlación de Pearson (r) para el contenido fenólico y actividad antioxidante (DPPH y FRAP) de los extractos de cacao con NaDES y etanol	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectro de los NaDES y sus componentes individuales. NaDELS#30 (betaína: propilenglicol).....	15
Figura 2. Espectro de los NaDES y sus componentes individuales. NaDELS#31 (betaína: glucosa)	16
Figura 3. Espectro de los NaDES y sus componentes individuales. NaDELS#33 (betaína: ácido láctico.....	17
Figura 4. Espectro de los NaDES y sus componentes individuales. NaDELS#34 (betaína: glicerol).....	18
Figura 5. Hemólisis de los NaDES y sus componentes individuales.	20
Figura 6. Extractos con NaDES y solvente convencional.....	21
Figura 7. Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH por parte de los extractos con NaDES y etanol en concentraciones [50-5000 µg/mL].....	23
Figura 8. Actividad antioxidante DPPH de los extractos con NaDES y etanol.....	24
Figura 9. Actividad antioxidante FRAP de los extractos con NaDES y etanol.	25
Figura 10. Puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo de la betaína y el grupo hidroxilo del propilenglicol – NaDELS# 30.	33
Figura 11. Puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo de la betaína y el grupo hidroxilo de la glucosa – NaDELS# 31.....	34
Figura 12. Puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo de la betaína y grupo hidroxilo del ácido láctico – NaDELS# 33.	35
Figura 13. Puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo de la betaína y el grupo hidroxilo del glicerol – NaDELS# 34.	35
Figura 14. Estructura de la colina (A) y betaína (B)	37
Figura 15. Estructura de la betaína (A) y ácido láctico (B)	38

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Apariencia visual de las muestras después de 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente.....	20
Anexo 2. Espectro infrarrojo de los cristales precipitados del NaDELS# 32	20
Anexo 3. Ensayo de hemólisis de los líquidos eutécticos profundos naturales. Componentes por separados y mezclas	21
Anexo 4 Consentimiento informado para la extracción de sangre humana.....	22
Anexo 5 Extractos de residuos de cacao con NaDES y solvente convencional	27
Anexo 6. Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación fenoles totales presentes en el extracto con residuos de cacao en concentraciones 60-100 [ug/mL]	28
Anexo 7. Contenido de fenoles totales de los extractos con NaDES y etanol.....	28
Anexo 8. Actividad antioxidante DPPH y FRAP de los extractos con NaDES y solvente convencional	29
Anexo 9. Actividad antioxidante DPPH del extracto NaDELS #30.....	29
Anexo 10. Actividad antioxidante FRAP de los extractos con NaDES y solvente convencional	30
Anexo 11. Número de onda (cm^{-1}) y modos vibracionales de los grupos funcionales de la betaína, propilenglicol y el NaDELS# 30.....	31
Anexo 12. Número de onda (cm^{-1}) y modos vibracionales de los grupos funcionales de la betaína, glucosa y el NaDELS# 31	32
Anexo 13. Número de onda (cm^{-1}) y modos vibracionales de los grupos funcionales de la betaína, ácido láctico y el NaDELS# 33	33
Anexo 14. Número de onda (cm^{-1}) y modos vibracionales de los grupos funcionales de la betaína, glicerol y el NaDELS#34.....	34

RESUMEN

En la actualidad, existe un interés en la búsqueda de alternativas sostenibles para la extracción de compuestos bioactivos. Una de las nuevas tendencias es el uso de los NaDES (solventes eutécticos profundos naturales), mezclas formadas a partir de azúcares, ácidos orgánicos, derivados de colina y polioles presentes en plantas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el uso de los NaDES en la extracción de compuestos fenólicos en los residuos de cacao, estos residuos pueden ser aprovechados por la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria. En el diseño experimental se preparó 5 combinaciones de NaDES basados en betaína como HBA (aceptor de enlace de hidrógeno) y glucosa, glicerol, ácido láctico, ácido oxálico y propilenglicol como HBD (donador de enlace de hidrógeno). Se describió las propiedades fisicoquímicas como densidad, viscosidad, conductividad eléctrica, pH y formación de enlaces de hidrógeno mediante el FT-IR. Se encontró que los NaDES basados en glucosa, propilenglicol y glicerol obtuvieron porcentajes de hemólisis mayores al 50%. Además, los extractos con NaDES basados en glicerol y propilenglicol obtuvieron un mayor contenido fenólico en comparación con el solvente convencional. Asimismo, los mismos extractos presentaron una mayor actividad antioxidante en DPPH, en contraste, se encontró que el pH de los solventes podría afectar en el ensayo de FRAP o en la extracción de metabolitos con alto poder reductor férrico. Los resultados obtenidos destacan la importancia de aprovechar los residuos de cacao y el potencial uso de los solventes no convencionales (NaDES) en procesos industriales.

Palabras clave: NaDES, residuos de cacao, antioxidante, extracción, química verde.

ABSTRACT

Nowadays, there is an increasing in the search for sustainable alternatives for the extraction of bioactive compounds. One of the new trends is the use the NaDES, mixture formed from sugars, organic acid, choline derivates and polyols, compounds present in plants. The objective of this work was to evaluate the use of NaDES in the extraction of phenolic compounds in cocoa residues, which can be used in the cosmetic, pharmaceutical and food industries. In the experiment design, 5 combinations of NaDES based on betaine as (Hydrogen bonding acceptor) HBA and glucose, glycerol, lactic acid, oxalic acid, and propylene glycol as HBD (Hydrogen bonding donor) were prepared. Through FT-IR, hydrogen bond formation was identified and physicochemical properties such as density, viscosity, electrical conductivity, and pH were described. It was found that NaDES based on glucose, propylene glycol and glycerol obtained hemolysis percentages higher than 50%. In addition, extracts with NaDES based on glycerol and propylene glycol obtained a higher phenolic content compared to the conventional solvent. Likewise, the same extracts presented higher antioxidant activity in DPPH, in contrast, it was found that the pH of the solvents could affect in the FRAP assay or in the extraction of metabolites with high ferric reducing power. The results obtained highlight the importance of taking advantage of cocoa waste and the potential use of non-conventional solvents (NaDES) in industrial processes.

Keywords: NaDES, cocoa residues, antioxidant, extraction, green chemistry

CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

Los compuestos fenólicos son considerados los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas y se derivan de la ruta pentosa fosfato, shikímico y fenilpropanoides. Están formados por uno o más anillos aromáticos enlazados a uno o más grupos hidroxilo [1]. Existen alrededor de 8000 estructuras conocidas que se clasifican en ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos y taninos [2]. Estos compuestos son considerados excelentes antioxidantes naturales, presentando aplicaciones en la industria textil, alimentaria y cosmética. El mercado de fenoles se ha valorado en unos 1370.8 millones de dólares en 2020 y se estima que se incrementará en un 2.9%, llegando a 1725.4 millones a finales del 2027 [3]. Dado este crecimiento y la importancia de los fenoles en diversas industrias, es crucial encontrar solventes eficientes para su extracción.

La obtención de los compuestos fenólicos se realiza mediante técnicas de extracción sólido-líquido y líquido-líquido [4]. Para ello, se emplean solventes orgánicos que incluyen alcoholes, acetonas, éter etílico, acetatos, hexano, propanol, agua, cloroformo o combinaciones de estos [3]. Boungo Teboukeu et al. (2018), encontró que el solvente tenía una influencia significativa en el contenido fenólico y la actividad antioxidante en la cáscara de mazorca de cacao [4].

Bochi et al. (2014), reportó que la combinación de acetona y agua (80:20) es óptima para la extracción de antocianina [5]. Así mismo, Campos-Vega et al. (2018), mencionan un mayor contenido fenólico con la mezcla acetona: agua y agua: etanol en comparación con la mezcla metanol: acetona [6]. Un estudio reciente llevado a cabo por Dewi et al. (2022), evaluó la capacidad de los solventes orgánicos para extraer compuestos fenólicos, concluyendo que la mezcla óptima etanol-agua al 50% presentó mayor rendimiento del contenido fenólico que el alcohol absoluto o agua desionizada [3]. Por lo tanto, la elección del solvente es importante en la extracción de los compuestos fenólicos, ya que determina la eficacia con la que estos compuestos se disuelven.

El uso de los solventes convencionales para la extracción de compuestos fenólicos no es eficiente, debido a que algunos se evaporan a temperatura ambiente, son inestables y en algunos casos, requieren medidas de seguridad personal durante su utilización [7]. Por lo tanto, la comunidad científica ha investigado alternativas que solucionen las desventajas de los solventes convencionales, y una de ellas son los líquidos iónicos (ILs) [8].

Los ILs son una combinación de cationes y aniones orgánicos o inorgánicos que fueron descubiertos en el año 1914 por Paul Walden, quien preparó una sal de nitrato de etilamonio. Sin embargo, debido a su alta toxicidad, baja biodegradabilidad y sostenibilidad, investigaciones recientes han identificado que estos líquidos no son ideales para la extracción de compuestos bioactivos [9].

Una subclase de los ILs son los solventes eutécticos profundos (DES), los cuales se definen como una mezcla de dos compuestos: un donador de enlace hidrógeno (HBD) y un aceptor de enlace de hidrógeno (HBA), los cuales se asocian para formar una mezcla eutéctica caracterizada por un punto de fusión menor a 100°C [10]. Abbott et al. (2003), reportaron que la mezcla de cloruro de colina y urea forman un líquido a temperatura ambiente [11]. Los DES presenta una alta biodegradabilidad, baja toxicidad y bajo costo [12]. Sin embargo, los componentes usados en la síntesis de los DES reducen la posibilidad en aplicaciones de la industria cosmética y alimentaria, debido a que algunos componentes que los conforman podrían ser tóxicos y costosos [13].

Una subclase de los DES son los disolventes eutécticos profundos naturales (NaDES) descritos por Choi et al. (2011) como la tercera clase de líquidos que se encuentran en las células vivas, junto con el agua y los lípidos, estos líquidos podrían ser un medio alternativo para la biosíntesis, el transporte y almacenamiento de los compuestos. Los NaDES están formados por la combinación de compuestos naturales: ácidos orgánicos, carboxílicos, azúcares, aminoácidos, derivados de cloruro, alcoholes y urea [14]. Se caracterizan por la interacción de puentes hidrógeno o enlaces Van der Waals, y se componen por la mezcla de un aceptor de hidrógeno (HBA) y un donador de enlace de hidrógeno (HBD), lo que le atribuye ventajas como biodegradabilidad, baja toxicidad, solubilización, capacidad de modular la viscosidad y polaridad [13].

Los NaDES que se han investigado para la obtención de compuestos fenólicos son los basados en cloruro de colina o betaína actuando como HBA, y ácidos orgánicos, azúcares, amidas, polialcoholes actuando como HBD, así mismo, se conoce que los NaDES interactúan con los compuestos fenólicos a través de múltiples enlaces de hidrógeno [15]. Según Zhou, et al., (2023), los NaDES disuelven compuestos fenólicos, debido a polaridades e interacciones químicas similares, como los enlaces de hidrógeno. Estas interacciones son tan fuertes que supera a las otras fuerzas electrostáticas como polifenol – polifenol. La alta disolución de los polifenoles y solvatación de los NaDES facilita la difusión de las moléculas fuera de las células vegetales. Esta afinidad de los NaDES y compuestos fenólicos se puede conocer teóricamente mediante un modelo para solventes reales, COSMO-RS [16].

Además, los NaDES presentan mayor estabilidad que los solventes convencionales, en estudios previos se encontró que los NaDES basados en azúcares mantienen una mayor estabilidad de los compuestos fenólicos, que el agua o etanol al 40% [17]. Por otra parte, investigaciones recientes mostraron que los NaDES incrementan la solubilidad de los productos naturales de 18 hasta 460 000 veces más que el agua, posibilitando su aplicación en procesos de extracción [18].

1.2. Planteamiento del problema

El cacao (*Theobroma cacao* L.) se encuentra cultivado en regiones tropicales a nivel mundial y su semilla es el componente fundamental utilizado en la elaboración del chocolate. Durante la temporada de los años 2018 a 2019, la producción mundial de la semilla de cacao alcanzó un total de 4.7 millones de toneladas, y se estimó que, de esta producción, África contribuyó con un 76.3%, América con un 17.4% y las regiones restantes de Asia y Oceanía con un 6.3% [19]. En este escenario global, Ecuador se posiciona como el tercer productor mundial de cacao, generando 327 903 toneladas de semilla cacao fino de aroma en el año 2020 [20]. Para la obtención de la semilla de cacao, la mazorca y la cascarilla son los principales residuos representado el 80% de la fruta en seco [21]. Estos residuos son dispersados en el suelo o quemados por los agricultores, generando un impacto ambiental o una pérdida en los cultivos por la propagación de patógenos como *Moniliophthora perniciosa* [22]. Sin embargo, estos residuos podrían aprovecharse, ya que presentan un contenido de polifenoles de 1.45 – 94.95 mg GAE/g material vegetal, lo que los convierte en materia prima potencial para

su uso en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria [23]. Las técnicas de extracción convencional de estos compuestos requieren altos volúmenes de solventes orgánicos, generando un alto impacto ambiental y económico [24]. Asimismo, en el contexto industrial, el proceso de obtención de los compuestos fenólicos resulta costoso, debido a que es necesario la remoción de los solventes utilizados, lo que implica un consumo de tiempo, costos en maquinaria y riesgos al personal, por lo que deben utilizar elementos de protección personal en la manipulación de los solventes [25,26].

1.3. Justificación de la investigación

Los NaDES son solventes emergentes, descubiertos en el año 2011 como representantes de la química verde. Se caracterizan por ser biodegradables, no inflamables, poseer baja toxicidad, bajos costos y fácil preparación [25]. A diferencia de los solventes convencionales, los NaDES podrían ser seguros para el ser humano ya que los componentes que los conforman son moléculas orgánicas como los azúcares, ácidos orgánicos y ácidos carboxílicos, los cuales son parte de diferentes organismos vivos [17]. Las investigaciones sobre la aplicación de los solventes eutécticos profundos naturales se han incrementado exponencialmente en diferentes áreas como nanotecnología, síntesis química, electroquímica y medicina [27]. Por lo tanto, la extracción de compuestos fenólicos empleando NaDES es de gran interés a nivel industrial debido a que presentan una mayor capacidad de solvatación en la extracción de compuestos bioactivos [28].

En estudios previos, se identificaron combinaciones de NaDES que fueron aplicados en la extracción de compuestos fenólicos en semilla de cacao (SC). Entre ellas, la combinación de betaína: glicerol, presentó un contenido de catequina 1.46 ± 0.06 mg/g de peso seco, mientras que la betaína: glucosa obtuvo un valor de fenoles totales de 22.82 ± 0.40 mg equivalente ácido gálico/g de peso seco (SC). En contraste, el uso de solventes convencionales presentó un menor contenido de catequina, con un valor de 0.90 ± 0.08 mg/g peso seco (SC). No obstante, en los fenoles totales no se encontraron diferencias significativas con un valor 22.23 ± 0.20 40 mg equivalente ácido gálico/ g de peso seco (SC) [29]. Por otra parte, en la cáscara de semilla de cacao, la combinación de cloruro de colina: ácido málico obtuvo un contenido de epicatequina de 0.114 mg/g extracto [30].

Adicionalmente, según los estudios de Ruezgas et al., (2019), se observó un incremento en el contenido de fenoles totales en los residuos de cacao al emplear NaDES basado en cloruro de colina y ácido láctico, con un valor de 52.86 ± 1.05 g (EAG) equivalente ácido gálico/100 g peso seco. En comparación con el solvente convencional, etanol al 70% que obtuvo un valor de 19.55 ± 1.05 g EAG /100 g [31].

Estos resultados sugieren la posibilidad de obtener extractos con alto contenido de compuestos bioactivos. En consecuencia, la investigación sobre los NaDES en la extracción de compuestos bioactivos en Ecuador es necesaria, ya que podría añadir un valor agregado a los residuos de cacao. Además, crea nuevas oportunidades para impulsar la sostenibilidad en los procesos a escala industrial en la región.

1.4. Objetivos de la investigación

1.4.1. Objetivo general

Evaluar el uso de solventes eutécticos profundos naturales (NaDES) en la extracción de compuestos fenólicos de los residuos de cacao.

1.4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas (viscosidad, densidad, pH y conductividad) y describir la estructura de los NaDES mediante espectroscopia infrarrojo -FITR.
- Determinar la toxicidad de los NaDES en la sangre mediante el ensayo de hemólisis.
- Determinar la actividad antioxidante DPPH y FRAP de los extractos con NaDES.
- Determinar la combinación óptima de los NaDES para la extracción de compuestos fenólicos en residuos de cacao.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

El enfoque que se utilizó para la evaluación del uso de solventes eutécticos profundos naturales consta de cuatro etapas: 1) preparación de los solventes eutécticos profundos naturales (NaDES), 2) evaluación de las propiedades fisicoquímicas (densidad, viscosidad, pH y toxicidad), 3) comparación de la extracción de polifenoles con NaDES VS. solventes convencionales, 4) evaluación de la actividad antioxidante (DPPH y FRAP) de los extractos con NaDES y solvente convencional.

2.1. Preparación de los líquidos eutécticos profundos naturales (NADES)

Se realizaron combinaciones de betaína con diversos compuestos, entre los que se incluyen propilenglicol, glucosa, ácido oxálico, ácido láctico y glicerol (**Tabla 1**). Estas mezclas se sometieron a calentamiento y agitación, a temperaturas dentro de un rango de 50 a 80 °C y a una velocidad en 260 rpm. Posteriormente, se añadió agua en un rango de 30-50%.

Los líquidos obtenidos se dejaron en reposo de 24 a 48 h a temperatura ambiente, se realizó las combinaciones por triplicado y se almacenó en un desecador para los análisis posteriores. Se nombró cada combinación con diferentes códigos para su identificación.

Tabla 1. Condiciones de preparación de los NaDES

NaDES*		Relación molar	Temp. [°C]	Tiempo [min]	Código	Ref
HBA	HBD					
Betaína	Propilenglicol	(1:4)	80	30	NaDELS#30	[32]
	Glucosa	(1:1)	50-60	120	NaDELS#31	[29,33]
	Ácido oxálico	(1:1)	80	40	NaDELS#32	[34]
	Ácido láctico	(1:7)	50	120	NaDELS#33	[35]
	Glicerol	(1:2)	60	120	NaDELS#34	[31]

*Nota: Se emplearon reactivos comerciales
Realizado por: Encalada, 2023.

2.2. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y toxicidad de los NaDES

2.2.1. Espectroscopia Infrarrojo

Para identificar los enlaces de hidrógeno se empleó el espectrofotómetro FTIR (PERKIN ELMER SPECTRUM TWO/Estados Unidos), en tiempo real con una resolución óptima de 0.5 cm^{-1} , los datos se obtuvieron en un rango espectral de $4000\text{-}550\text{ cm}^{-1}$. Se tomó $5\text{ }\mu\text{L}$ de cada muestra y se colocó en el cristal del equipo. Se analizaron las mezclas y sus componentes a temperatura ambiente.

2.2.2. Densidad, viscosidad, pH y conductividad eléctrica

Se realizó la medición de la densidad, pH, viscosidad y conductividad a temperatura ambiente. Para la densidad se utilizó un picnómetro de 10 mL . La viscosidad se determinó con un viscosímetro (viscosímetro dinámico NDj-5S-8S-9S/China), se utilizó un volumen de 200 mL para cada líquido, la medida del rotor y ángulo se ajustó de acuerdo con la viscosidad que tenía la muestra.

Para medir la conductividad eléctrica se utilizó el conductímetro (Conductometer Metrohm -914 pH/DO/Conductometer/Suiza) con un volumen de 50 mL de cada solvente. Para la medición del pH aparente se usó el pH-metro (Edge® blu/España) y se diluyó la muestra con agua en una relación $1/10\text{ (v/v)}$. Los ensayos de cada propiedad fisicoquímica se realizaron por triplicado.

2.2.3. Hemólisis

Para determinar la toxicidad de los NaDES se utilizó la metodología de Proaño et al., (2019) con ligeras modificaciones, en las concentraciones. Para trabajar con las muestras de sangre se obtuvieron los permisos de los voluntarios (**Anexo 4**). Se obtuvo 4 mL de sangre y se centrifugó a 1000 RCF para descartar el plasma. Posteriormente, se realizó el lavado de los eritrocitos con 10 mL de PBS (buffer fosfato salino) estéril 1X , se centrifugó a 1000 g y se descartó el sobrenadante, este procedimiento se repitió hasta que el sobrenadante quedó claro. Se añadió 50 mL de PBS 1X para obtener una concentración al $4\%\text{ v/v}$. Se transfirieron $200\text{ }\mu\text{L}$ de cada muestra a tubos de 1.5 mL , y se añadió $200\text{ }\mu\text{L}$ de la solución de eritrocitos al $4\%\text{ (v/v)}$. En el control negativo, se

añadió 200 µL de PBS 1X y 200 µL de la solución de eritrocitos, en el control positivo, se agregaron 200 µL de solución de eritrocitos, 195 µL de PBS 1X y 5 µL de Tritón X-100 (Promega). Se realizaron 5 repeticiones para la muestra, control positivo, control negativo y se incubó a 37 °C por 120 minutos [36].

Se centrifugó a 1000 RCF por 5 min y se transfirió 200 µL del sobrenadante de cada concentración a una placa multipocillos (**Anexo 3**). Finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm. Los datos adquiridos del control positivo se consideraron como 100% de hemólisis. El porcentaje de hemólisis se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(A - A_0)}{(A_x - A_0)} \times 100$$

A= Absorbancia de la muestra

A0= Absorbancia del control negativo

Ax= Absorbancia del control positivo

2.3. Preparación del material vegetal

Los residuos de cacao fueron proporcionados por la empresa Magic Nature (Quito – Ecuador). Después del proceso de fermentación y tueste, se obtuvieron los residuos secos de cacao (RSC). Se almacenó en un desecador hasta su posterior uso.

2.4. Extracción de compuestos fenólicos de los residuos de cacao

El proceso de extracción se realizó según el protocolo proporcionado por la empresa Magic Nature. Se maceró y evaluó la capacidad de extracción de los NaDES (NaDELS# 30, NaDELS#31, NaDELS#33 y NaDELS#34) frente al solvente convencional (mezcla etanol-agua). Se utilizó una cantidad de solvente y un material vegetal estándar para este tipo de extracción. Estas muestras se mantuvieron almacenadas durante 5 días, agitándose durante 1 minuto cada día. Después, el extracto final se filtró utilizando un tamiz #60 ASTM y se almacenó a temperatura ambiente para su posterior análisis. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada solvente. El protocolo fue similar para el solvente convencional (mezcla etanol-agua).

2.5. Cuantificación de fenoles

La cuantificación de fenoles totales se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Matic, et al., (2017) con ligeras modificaciones, en el rango de la curva de calibración y tiempo de incubación [37]. Se preparó una curva de calibración con el estándar ácido gálico en concentraciones (60-100 µg/mL) (**Anexo 6**). Se preparó concentraciones de 3 y 4 mg/mL de los extractos en tubos de 1.5 mL. Se tomó una alícuota de 200 µL de cada extracto y se transfirió a tubos de ensayo, se añadió 1720 µL de agua destilada, y 80 µL de reactivo de Folin. Las muestras se mezclaron en un vórtex y se dejaron en reposo por 5 minutos. Posteriormente, se añadió 200 µL de la solución de Na₂CO₃ (7 % p/v) y 1800 µL de agua destilada. Se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente por 60 minutos. Se midió la absorbancia a 765 nm en el espectrómetro UV-3600i Plus UV-Vis-NIR.

Se realizó la validación del método respecto al límite de detección y cuantificación, linealidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), y veracidad (% recuperación). Se utilizaron tres concentraciones diferentes: 62 µg/mL para el nivel bajo, 74 µg/mL para el nivel medio y 94 µg/mL para el nivel alto.

2.6. Actividad antioxidante

2.6.1. Ensayo DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)

La inhibición de los radicales libres DPPH se determinó mediante el ensayo de Sanchez-Moreno et al., (1998) con ligeras modificaciones, se preparó una solución de DPPH (-2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) con etanol grado industrial y se almacenó en refrigeración a 4 °C hasta su uso. Se prepararon soluciones de trolox a concentraciones (10-400 µM). Para las muestras se prepararon concentraciones en un rango de 50 – 5000 µg /mL en tubos de 1.5 mL. Para determinar el porcentaje de inhibición se midió tres absorbancias: absorbancia de la muestra, absorbancia blanco de la muestra y la absorbancia de la solución del DPPH. Las absorbancias se midieron en un espectrofotómetro para microplacas (GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader/) a una longitud de 490 nm.

Para medir la absorbancia de la muestra, se tomó 100 µL del extracto o estándar, se añadió 100 µL del etanol y 50 µL de la solución DPPH. En la absorbancia de la solución

DPPH, se tomó 200 µL de etanol y se añadió 50 µL de DPPH, y para medir la absorbancia del blanco de la muestra, se tomó 100 µL del extracto o estándar y se añadió 150 µL de etanol. (**Anexo 9**). Se determinó el porcentaje de inhibición según la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[1 - \frac{(\text{Absorbancia de la muestra} - \text{Absorbancia blanco de la muestra})}{\text{Absorbancia del DPPH}} \right] \times 100$$

Se determinó el IC₅₀ de las muestras y estándar, mediante el software R. El IC₅₀ es la concentración a la cual las muestra inhiben la actividad del radical DPPH en un 50%. Los resultados (**Anexo 8**) se expresaron en µmoles equivalentes de trolox /gramos RSC con la siguiente fórmula:

$$TE = \frac{IC_{50} \text{trolox} \left[\frac{\mu\text{moles}}{mL} \right]}{IC_{50} \text{muestra} \left[\frac{\text{gramos}}{mL} \right]}$$

2.6.2. Ensayo FRAP (Poder Reductor Férrico)

La determinación del poder reductor férrico se realizó con el ensayo de Benzie y Strain, (1996) con ligeras modificaciones en el tiempo de incubación y volúmenes de los reactivos. Se preparó la solución FRAP (Potencial Antioxidante Reductor Férrico) compuesta por solución buffer a 20 mM (pH 3.6), TPTZ (2,4,6-Tri(2-piridil)-1,3,5-triacina) y FeCl₃, se almacenó a 37°C. Se prepararon disoluciones de concentración (0.1 - 1 mM) de sulfato de hierro heptahidratado. Para las muestras se prepararon concentraciones de 4 mg/mL. Se midió las absorbancias del blanco, muestra y estándar en una placa multipocillos a una longitud de onda de 600 nm. En la muestra se colocó 300 µL de FRAP, 10 µL de la muestra y 30 µL de agua destilada, en la solución del FRAP se añadió 300 µL del FRAP y 40 µL de agua destilada, (**Anexo 10**). Se incubó la placa por 4 min y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro para microplacas (GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader). Los resultados se expresaron en µmoles Fe⁺² /g RSC (residuo seco cacao) (**Anexo 8**).

2.7. Análisis estadístico

Para el tratamiento de datos se realizó un análisis de varianza ANOVA para cada uno de los ensayos con un nivel de significancia de p < 0.05. Después, se realizó una prueba post-hoc de Tukey para comparar las medias, con un nivel de confianza del 95 %.

Adicionalmente, se realizó una correlación de Pearson entre los tres ensayos fenoles totales, FRAP y DPPH. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1. Formación de los NaDES

Se obtuvieron 5 mezclas líquidas con diferentes proporciones molares reportadas en la (Tabla 2). Por cada mezcla se realizó tres réplicas, resultando en 15 muestras líquidas.

Tabla 2. Descripción de los NaDES elaborados

Muestra	Descripción
NaDELS #30	Se formó un líquido incoloro, burbujeante
NaDELS #31	Se formó un líquido incoloro, burbujeante
NaDELS #32	Se formó un líquido transparente con cristales que sedimentaron
NaDELS #33	Se formó un líquido incoloro, burbujeante
NaDELS #34	Se formó un líquido incoloro, burbujeante

Realizado por : Encalada, 2023.

Las mezclas NaDELS#30, NaDELS#31, NaDELS#33 y NaDELS#34 mostraron un contenido de agua inferior al 50%, mientras que NaDELS#32 presentó un contenido de agua superior al 50%.

3.2. Propiedades fisicoquímicas de los NaDES

Se realizaron evaluaciones de las propiedades fisicoquímicas de cuatro NaDES específicos : NaDELS#30, NaDELS #31, NaDELS# 33 y NaDELS #34. Se excluyó, el NaDELS#32 de los posteriores ensayos debido a la formación de precipitados, lo que indicó que no formaba una mezcla estable a temperatura ambiente.

3.2.1. Viscosidad

La viscosidad de los NaDES es una propiedad importante para los procesos de extracción. Los valores obtenidos de los NaDES se encontraron en un rango de 30 ± 0.0 a 287.33 cP. En la (Tabla 3) se puede observar el valor de la viscosidad, las mezclas

con mayores valores fueron el NaDELS # 31 y NaDELS# 34 con viscosidades de 287.33 ± 1.57 y 75.33 ± 0.57 cP, respectivamente. En cambio, los NaDES que presentaron menores viscosidades fueron el NaDELS# 30 y NaDELS# 33 con valores de 34.33 ± 0.57 y 30 cP.

Tabla 3. Medida de las propiedades físicas de los NaDES por triplicado a temperatura ambiente.

Muestras	Densidad [g/ml]		pH		Viscosidad [cp]		Conductividad eléctrica [μ S/cm]	
NaDELS#30	1.059	± 0.0003	5.673	± 0.0058	34.333	± 0.5774	5195.33	± 2.0817
NaDELS#31	1.252	± 0.0023	5.593	± 0.0058	287.333	± 1.5275	3116.66	± 3.0551
NaDELS#33	1.149	± 0.0008	2.190	± 0.0000	30.000	± 0.0000	4029.66	± 6.6583
NaDELS#34	1.171	± 0.0006	5.626	± 0.0115	75.333	± 0.5774	2429.33	± 4.1633

Realizado por: Encalada, 2023.

3.2.2. Densidad

Los valores de densidad fueron de 1.05 ± 0.0003 a 1.25 ± 0.0023 g/mL. En la (Tabla 3) se observan que los NaDES más densos fueron el NaDELS # 31 y NaDELS# 34 con densidades de 1.25 ± 0.0023 y 1.17 ± 0.0006 g/mL. Por otra parte, los NaDES con menores valores de densidad fueron los NaDELS# 30 y el NaDELS# 33 con 1.05 ± 0.0003 y 1.14 ± 0.0008 g/mL, respectivamente.

3.2.3. pH

El pH de los NaDES varía en un rango de 2.19 hasta 5.67 ± 0.0058 . En la (Tabla 3) se observa que los NaDELS# 30, NaDELS#31 y NaDELS# 34 tienen valores de pH similares de 5.67 ± 0.0058 , 5.59 ± 0.0058 y 5.62 ± 0.0115 respectivamente. Sin embargo, el NaDELS# 33 presentó un pH más bajo correspondiente a 2.19.

3.2.4. Conductividad eléctrica

La conductividad de los NaDES se encontró en un rango de 2429.33 ± 4.16 a 5195.33 ± 2.08 μ S/cm. En la (Tabla 3) se observa que los NaDES con menor conductividad eléctrica fueron el NaDELS# 31 y NaDELS# 34 con valores 3116.66 ± 3.05 y 2429.33 ± 4.16 μ S/cm, respectivamente. Por otro lado, para los NaDELS# 30 y NaDELS#33 se obtuvieron valores de 5195.333 ± 2.0817 y 4029.666 ± 6.6583 μ S/cm.

3.3. Caracterización de los NaDES y sus componentes mediante FTIR

En la (**Figura 1**) se observan los espectros IR de los NaDES, que incluyen el NaDELS#30, NaDELS#31, NaDELS#33, NaDELS#34, junto con sus respectivos componentes: betaína, propilenglicol, glucosa, ácido láctico, glicerol. Asimismo, en los **Anexos 11, 12, 13 y 14**, se indica el número de onda y los modos vibracionales de los NaDES y sus componentes.

En todos los NaDES se identificaron las bandas de absorción características del espectro de IR de la betaína, como se muestra en la (**Figura 1**). Se observó tres señales intensas en $3\ 356.98$, $2\ 924$ y $1\ 627.59\ \text{cm}^{-1}$, relacionados al estiramiento de los grupos O-H, CH_2 y C=O, respectivamente. Adicionalmente, se detecta una banda a $1\ 568.08\ \text{cm}^{-1}$, que se atribuye al grupo N-H. Además, se detectaron bandas de baja intensidad en $2\ 957.14$ y $1\ 398.01\ \text{cm}^{-1}$, correspondiente al estiramiento de los grupos CH_3 , C-N, respectivamente.

En el espectro del propilenglicol se observó una banda ancha en $3\ 312.6\ \text{cm}^{-1}$ que pertenece al estiramiento del grupo O-H. Además, se detectó bandas intensas a $2\ 930.1$, $1\ 36.06$, $1\ 038.36$ y $921.83\ \text{cm}^{-1}$, que corresponden al estiramiento del grupo CH_2 , la flexión del grupo CH_2 y el estiramiento de los grupos C-O y C-O-C, respectivamente. En el (**Anexo 11**) se observa los grupos funcionales y modos vibracionales del NaDELS# 30.

En la (**Figura 1**) se visualiza el espectro IR del NaDELS #30 formado por betaína y propilenglicol, se identificaron bandas intensas en $3\ 332.73$, $2\ 972.82$, $2\ 855.40$, $1\ 632.66$ y $1\ 041.53\ \text{cm}^{-1}$, que corresponden al estiramiento de los grupos O-H, CH_3 , CH_2 , C=O y C-O, respectivamente. Además, se observó un pico de baja intensidad en $1\ 562.20\ \text{cm}^{-1}$ asociado al grupo N-H.

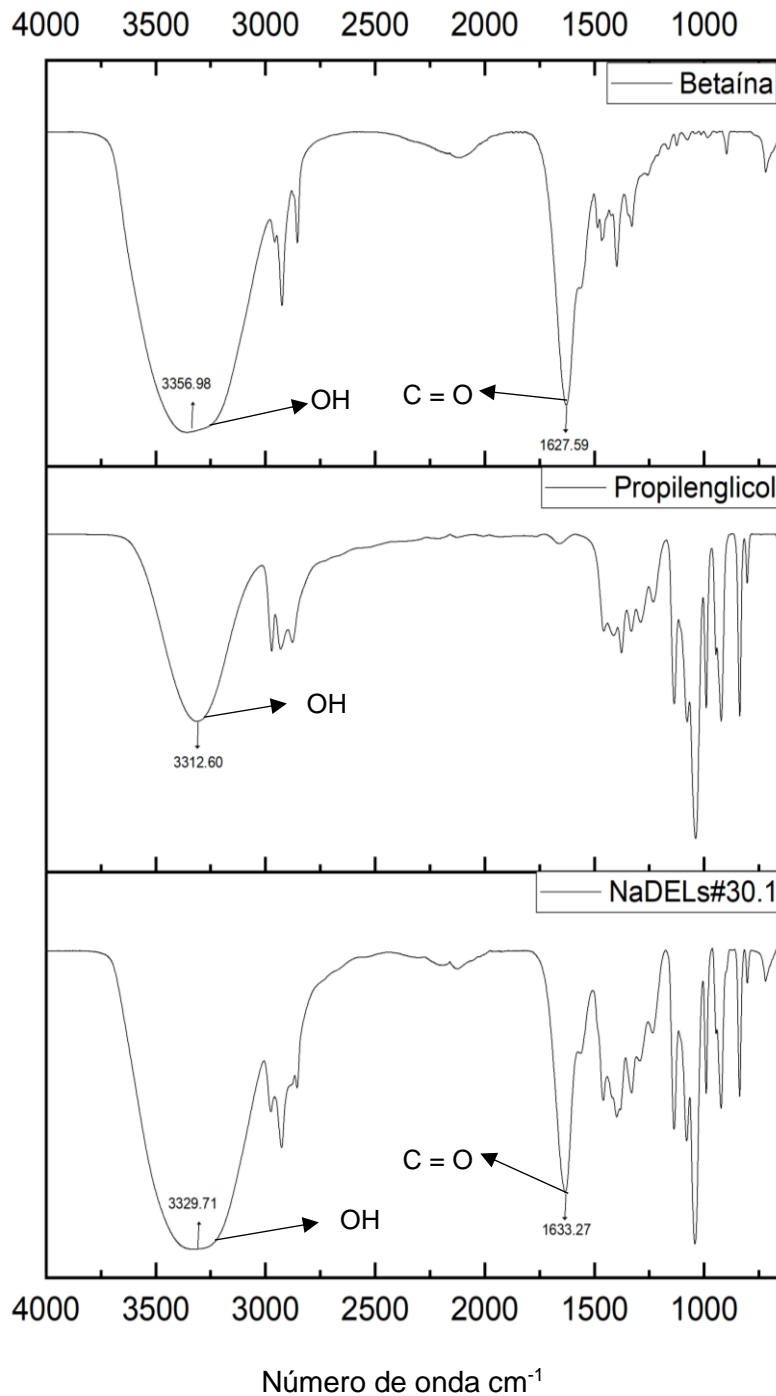


Figura 1. Espectro de los NaDES y sus componentes individuales. NaDEls#30 (betaína: propilenglicol)

Realizado por: Encalada, 2023

En la (**Figura 2**) se observa el espectro IR del NaDEls#31 compuesto por betaína y glucosa, se mostró una banda en 3287.76 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del grupo O-H. También se observaron bandas en 1630.82 , 1399.24 , 1149.34 y 1019.78 cm^{-1} , los cuales se relacionan al estiramiento del grupo C=O, la flexión del grupo C-O-H

y los estiramientos de los grupos C-O respectivamente. Así mismo, se detectó una banda de baja intensidad en $1\ 562.20\ \text{cm}^{-1}$ la cual se atribuye al grupo N-H. En el espectro de la glucosa se observaron bandas intensas en $3\ 277.32$, $1\ 014.55$, 925.35 y $1\ 360.32\ \text{cm}^{-1}$, las cuales corresponden al estiramiento de los grupos O-H, C-O, C-C y flexión del grupo C-O-H. En el (**Anexo 12**) se observa los grupos funcionales y modos vibracionales del NaDEls# 31.

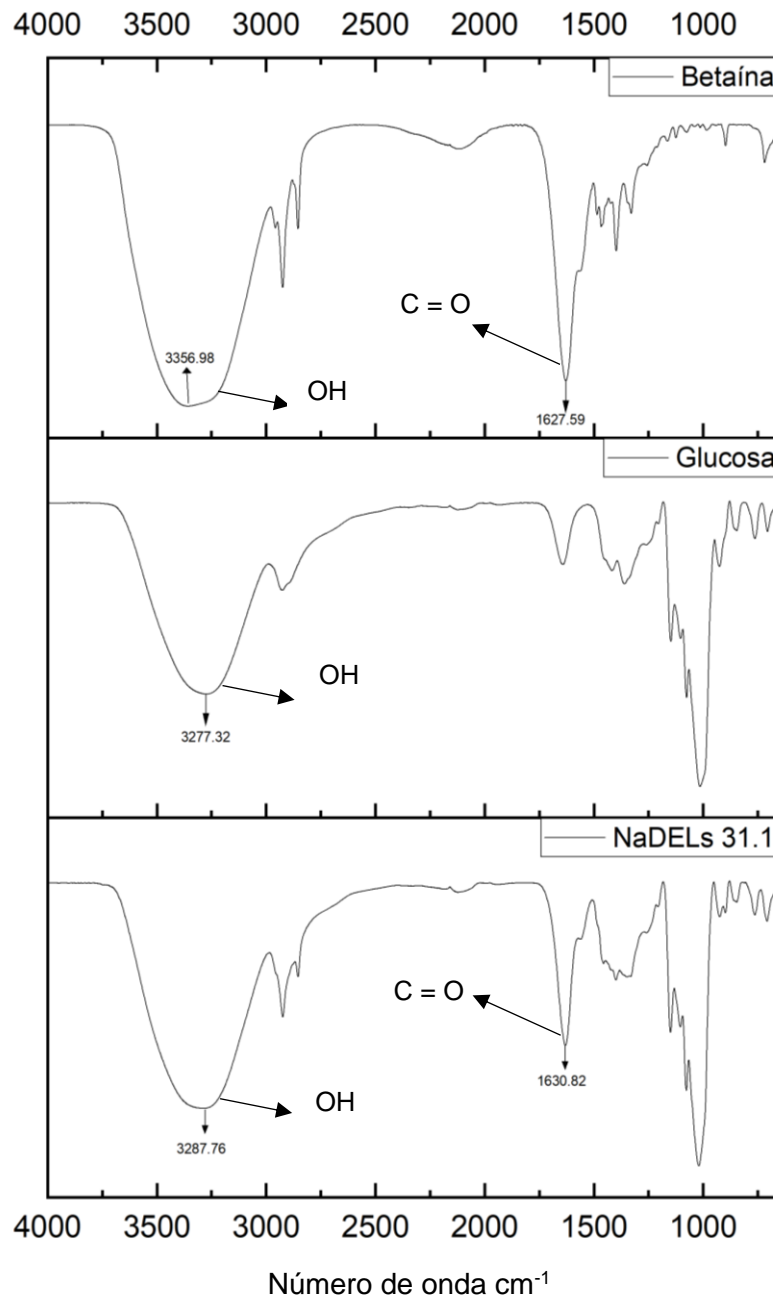


Figura 2. Espectro de los NaDES y sus componentes individuales. NaDEls#31 (betaína: glucosa)

Realizado por: Encalada, 2023

El espectro IR del NaDELS#33 formado por betaína y ácido láctico, se muestra en la (Figura 3). Se observa un pico intenso a 3391.11 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento del grupo O-H. Además, se presentó el estiramiento del grupo carbonilo C=O en las bandas en 1719.43 cm^{-1} y 1634.19 cm^{-1} . También se detectaron la deformación o flexión de los grupos CH_3 , C-H y O-H en picos a 1455.59 , 1375.33 y 1044.06 cm^{-1} , respectivamente. Asimismo, se presentaron bandas intensas a 2925.67 , 1125.59 y 1226.60 cm^{-1} , correspondientes al estiramiento de los grupos CH_2 , C-O y C-O-C, respectivamente.

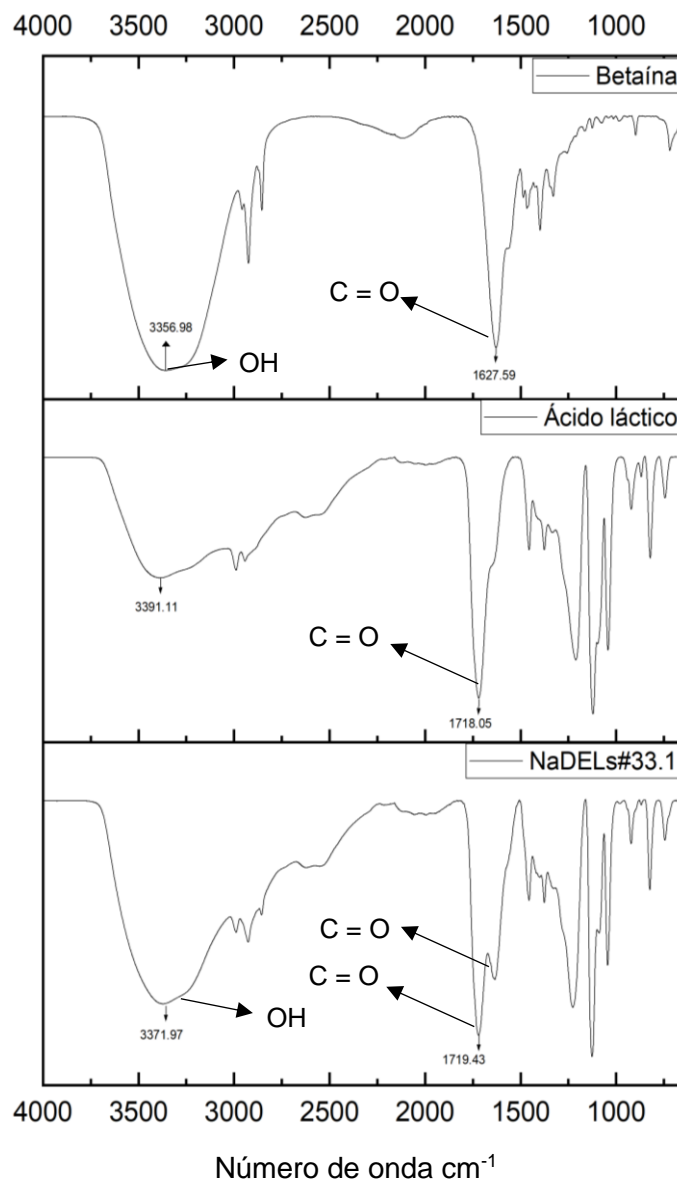


Figura 3. Espectro de los NaDES y sus componentes individuales. NaDELS#33 (betaína: ácido láctico)

Realizado por: Encalada, 2023

En el ácido láctico puro se identificó una banda en 3391.11 cm^{-1} que corresponden al estiramiento del grupo O-H. Además, se evidenció el estiramiento de los grupos C=O, CH₃, C-O, C-O-C en 1718.05 , 2942.56 , 1121.01 y 1096.28 cm^{-1} , respectivamente. Del mismo modo, se observó bandas intensas en 1455.59 , 1375.33 , 1042.06 cm^{-1} correspondiendo la flexión de los grupos CH₃, C-H y O-H, respectivamente. En el (Anexo 13) se observa los grupos funcionales y modos vibracionales del NaDELS# 33.

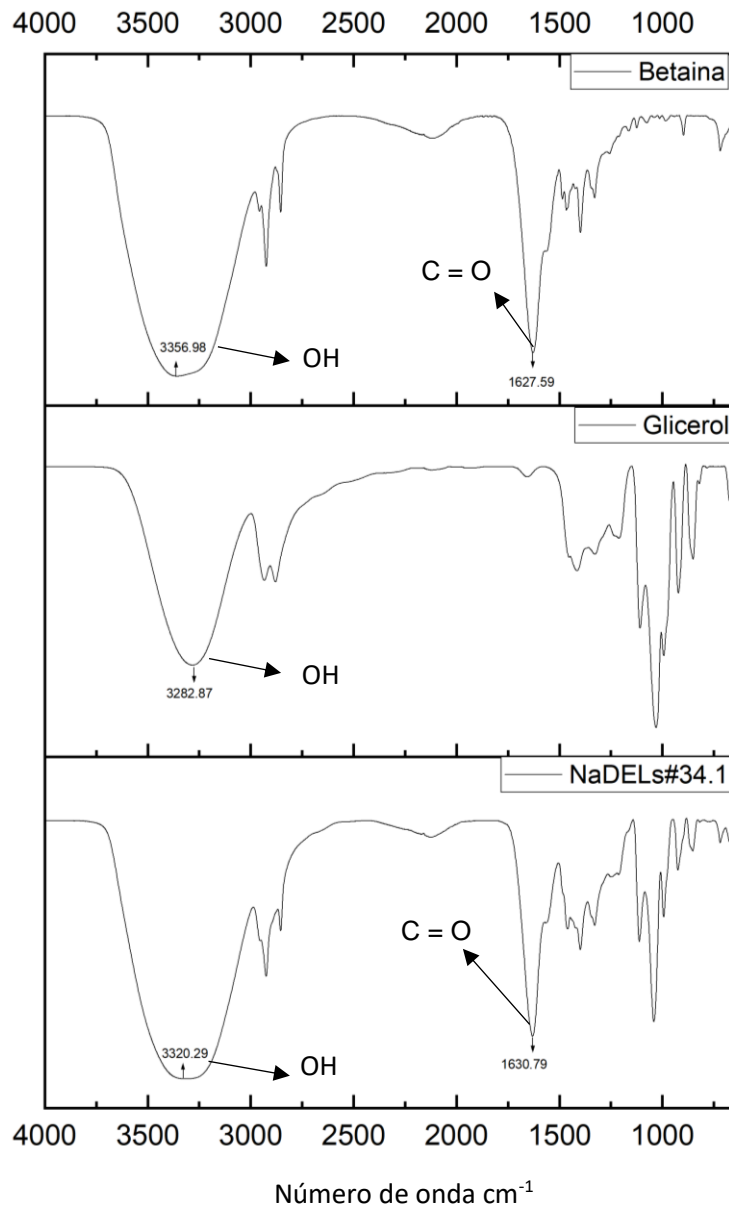


Figura 4. Espectro de los NaDES y sus componentes individuales. NaDELS#34 (betaína: glicerol)

Realizado por: Encalada, 2023

En la (**Figura 4**) se mostró el espectro IR del NaDELS# 34 constituido por betaína y glicerol. Se observó el estiramiento de los grupos O-H a $3\ 320.29\ \text{cm}^{-1}$, CH_2 a $2\ 924.7$, Se observó el grupo carbonilo C=O y el grupo CH_2 a picos en $1\ 630.79$ y $2\ 854.18\ \text{cm}^{-1}$, respectivamente.

Además, se presentó picos en rangos de $1\ 041.58$ y $1\ 111.89\ \text{cm}^{-1}$ relacionados con el estiramiento del grupo C-O, asimismo, se identificó la deformación de los grupos CH_2 a $1\ 459.18\ \text{cm}^{-1}$, C-O-H a $1\ 249.18\ \text{cm}^{-1}$ y O-H a $1\ 328.61\ \text{cm}^{-1}$. El glicerol puro, presentó el estiramiento de los grupos O-H a $3\ 282.87\ \text{cm}^{-1}$, C-H a $2\ 879.57$ y $2\ 933.61\ \text{cm}^{-1}$, C-O a $1\ 030.52$ y $1\ 108.53\ \text{cm}^{-1}$, C-C-O a 851.17 , 922.39 y $993,34\ \text{cm}^{-1}$. También se observó la flexión de los grupos O-H a $1\ 328.05\ \text{cm}^{-1}$, CH_2 a $1\ 415.76\ \text{cm}^{-1}$ y C-O a $1\ 211.01\ \text{cm}^{-1}$. En el (**Anexo 14**) se observa los grupos funcionales y modos vibracionales del NaDELS# 34.

3.4. Hemólisis de las NaDES

La toxicidad de los NaDES en la sangre se realizó a través del ensayo de hemólisis. En la (**Figura 2**), se observan los resultados de los NaDELS# 30, NaDELS# 31, NaDELS# 33, NaDELS# 34 y etanol, obteniéndose valores de 86.20 ± 0.39 , 91.62 ± 0.59 , 38.13 ± 1.22 , 85.36 ± 0.99 y $63.48 \pm 1.70\%$, respectivamente.

Asimismo, se obtuvieron resultados de los componentes de los NaDES, los cuales incluyen betaína, propilenglicol, glucosa, glicerol, y ácido láctico con porcentajes de hemólisis de 70.93 ± 0.52 , 93.79 ± 1.89 , 2.66 ± 0.12 , 1.70 ± 0.18 , $32.61 \pm 1.13\%$, respectivamente. En la (**Figura 5**) se evidencia la interacción de los componentes de los NaDES; en particular, el NaDELS# 34 (betaína-glicerol) y NaDELS# 31 (betaína-glucosa), presentaron porcentajes de hemólisis significativamente superiores a los componentes individuales con un nivel de significancia ($p < 0.05$)

La glucosa y el glicerol presentaron los menores porcentajes de hemólisis debido a que la glucosa es un compuesto utilizado en la producción de energía, específicamente ATP (adenosín trifosfato), generado en los procesos metabólicos como la glucólisis. [38]. La energía producida es fundamental para mantener la función de los eritrocitos [39]. En cambio, el glicerol es utilizado como crioprotector debido a que penetra la membrana celular, protegiendo al eritrocito de los daños causados por la congelación [39].

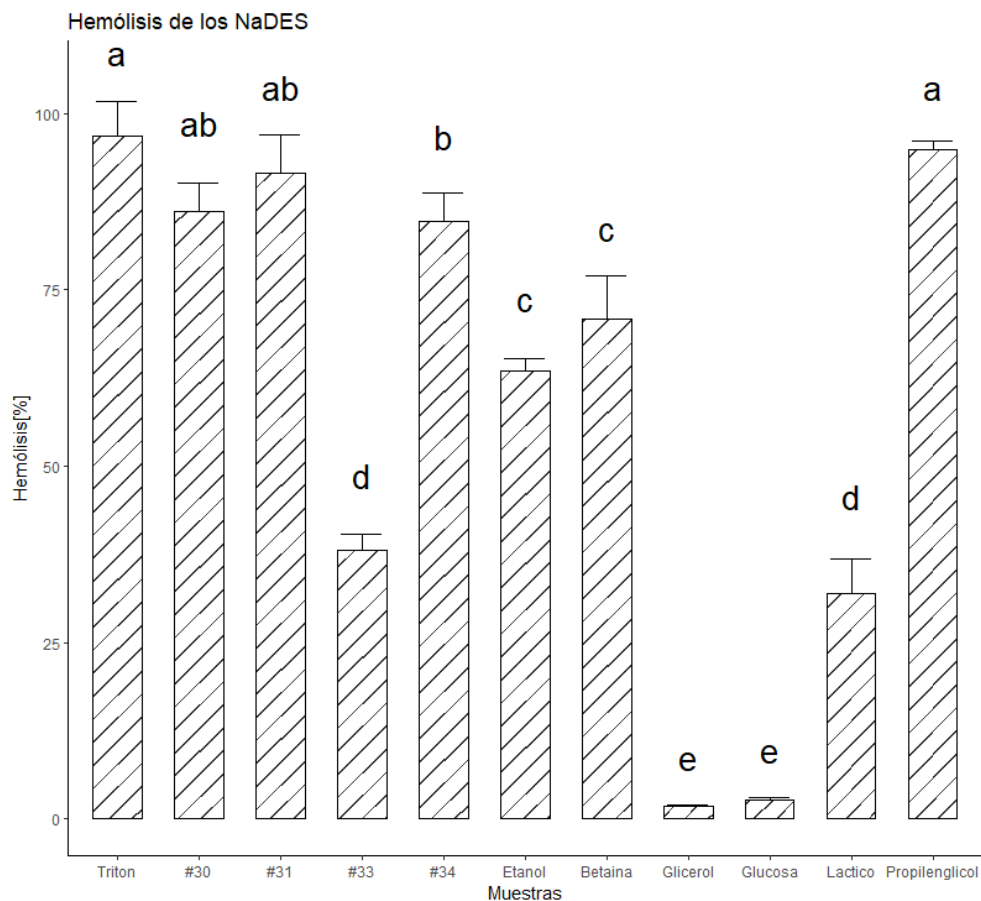


Figura 5. Hemólisis de los NaDES y sus componentes individuales.

Realizado por: Encalada, 2023

Por otra parte, el NaDELS# 33 presentó un porcentaje de hemólisis significativamente menor que la betaína y mayor que el ácido láctico ($p < 0.05$). En contraste, no se encontraron diferencias significativas en los NaDELS#30, NaDELS#31 NaDELS#34 entre sí ($p > 0.05$). Mientras que, los NaDELS#30 y NaDELS#31 no presentaron diferencias significativas con el control positivo (tritón), $p > 0.05$.

3.5. Extracción de compuestos fenólicos

Los extractos con NaDES y etanol presentaron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales (**Figura 6**). Se observó un alto contenido de fenoles totales en los extractos con NaDELS# 30 y NaDELS# 34 con valores de 18.42 ± 0.973 y 19.53 ± 1.234 mg EAG /g RSC respectivamente, seguido de los extractos con el solvente convencional con un valor de 14.67 ± 0.96 mg EAG /g RSC, NaDELS# 33 con 12.98 ± 0.541 mg EAG /g RSC y NaDELS# 31 con 9.86 ± 0.578 mg EAG/ gRSC, (**Anexo 7**). Los NaDELS# 30

y NaDELS# 34 obtuvieron un mayor contenido fenólico y no presentaron diferencias significativas entre sí ($p > 0.05$). Además, el extracto con etanol extrajo un mayor contenido fenólico que el NaDELS#31 y NaDELS# 33. Estos resultados reflejan el efecto de los solventes en la extracción de los compuestos fenólicos.

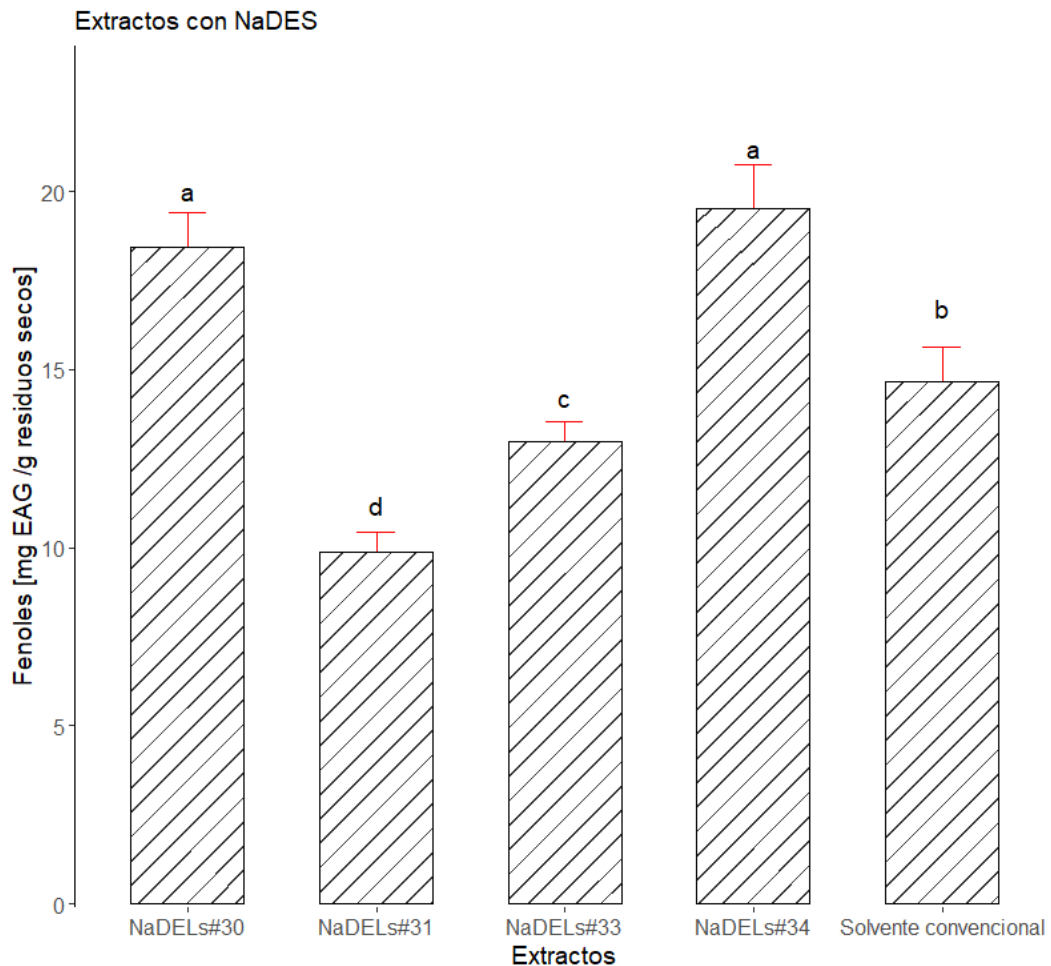


Figura 6. Extractos con NaDES y solvente convencional
Realizado por: Encalada, 2023

Los resultados de la validación del método analítico de la cuantificación de fenoles se observan en la (**Tabla 5**). Se obtuvo la ecuación de la recta de la curva de calibración: $Y = 0.0014 X - 0.0407$ y el coeficiente de determinación $R^2 = 0.9938$, (**Anexo 6**). Los límites de detección y cuantificación fueron de 57.68 y 59.18 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Los niveles bajos, medios y altos se presentan en concentraciones de 62, 74 y 92 $\mu\text{g/mL}$. Los porcentajes de recuperación de estas concentraciones estaban en un rango de 101.05 - 101.36 %. Se evaluó la precisión intermedia y la repetibilidad de los niveles bajos, medios y altos. En la precisión intermedia se obtuvieron porcentajes de

covarianza de 6.54, 5.42 y 7.61%, mientras que en la repetibilidad se registró porcentajes de covarianza 2.08, 1.76, 1.67 % respectivamente.

Tabla 4. Parámetros para la validación del método de cuantificación de fenoles totales mediante espectrofotometría UV-Vis-NIR.

PARÁMETROS		RESULTADOS
Ecuación de la curva de calibración		$y = 0.0014 X - 0.0407$
R ²		0.9938
LD [µg/mL]		57.68
LC [µg/mL]		59.18
	Concentración	Resultados
	[µg/mL]	
Recuperación [%]	62	101.05
	74	102.59
	92	101.36
Precisión intermedia [% CV]	62	6.54
	74	5.42
	92	7.61
Repetibilidad [% CV]	62	2.085
	74	1.761
	92	1.671

Realizado por: Encalada, 2023.

3.6. Actividad antioxidante

En la actividad antioxidante de DPPH y FRAP, se compararon los extractos con NaDES y el solvente convencional utilizado como control. Inicialmente, para evaluar la actividad DPPH, se observa los resultados de porcentajes de inhibición de los extractos con NaDES y solvente convencional (**Figura 6**).

Los extractos con NaDES en un rango de concentraciones 0 - 1000 µg/mL presentaron porcentajes de inhibición superiores al extracto con solvente convencional, excepto, el NaDELS#31 que obtuvo porcentajes inferiores. Por otro lado, el NaDELS# 34 presentó altos porcentajes de inhibición frente a todos los extractos. De igual manera, se observó que todos los extractos a una concentración de 5000 µg/ mL tienen porcentajes de inhibición mayor al 70%. En el (**Anexo 8**) se observa los resultados de la actividad antioxidante DPPH.

El extracto con solvente convencional obtuvo un valor de 85.31 ± 4.69 µmol trolox / g RSC y los extractos con NaDES que presentaron mayor capacidad antioxidante con

respecto al extracto con solvente convencional, fueron los NaDELS# 34 y NaDELS# 30 que obtuvieron valores de 112.71 ± 6.63 y 103.15 ± 4.72 $\mu\text{mol trolox / g RSC}$ respectivamente. Estos extractos entre si no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

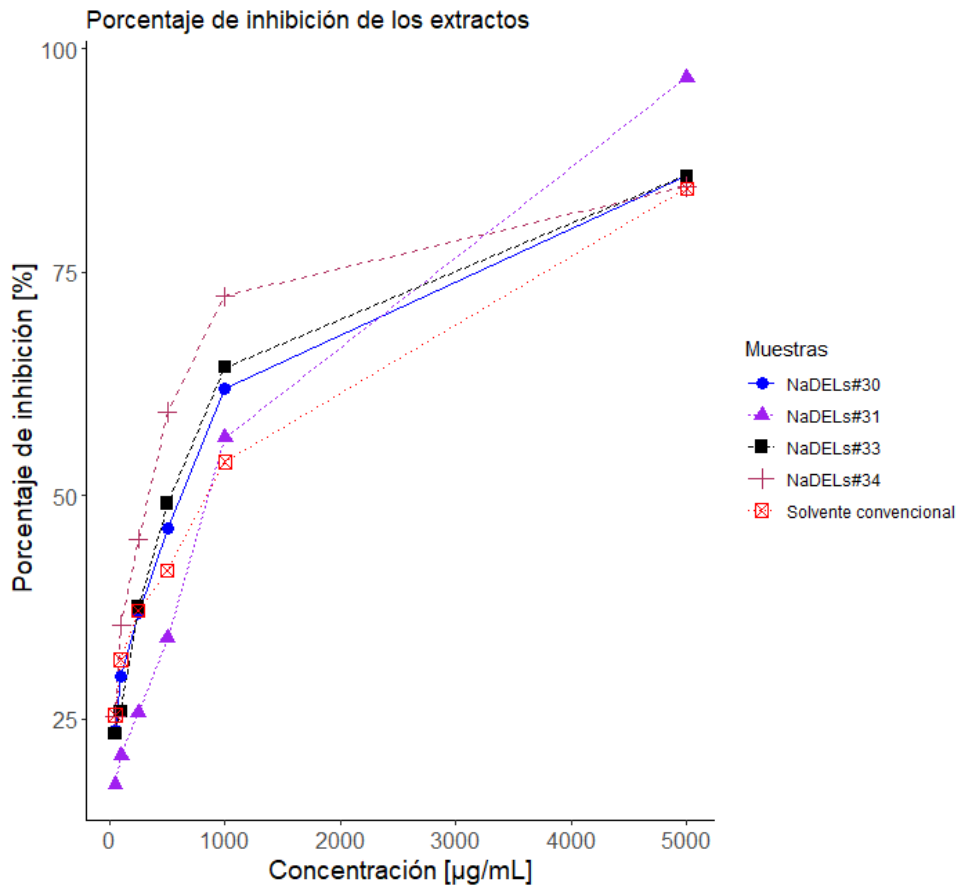


Figura 7. Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH por parte de los extractos con NaDES y etanol en concentraciones [50-5000 $\mu\text{g/mL}$].

Realizado por: Encalada, 2023

Por el contrario, se observa que los extractos NaDELS# 30, NaDELS# 31 y NaDELS# 34, presentaron diferencias significativas en comparación con el solvente convencional ($p < 0.05$) (**Figura 8**). Sin embargo, el NaDES que no presentó diferencias significativas con el solvente convencional (etanol - agua), fue el NaDELS# 33 que obtuvo un valor de 76.69 ± 6.63 $\mu\text{mol trolox / g RSC}$. Mientras que, el extracto NaDELS# 31 obtuvo la menor capacidad antioxidante DPPH con un valor de 47.43 ± 2.06 $\mu\text{mol trolox/g RSC}$.

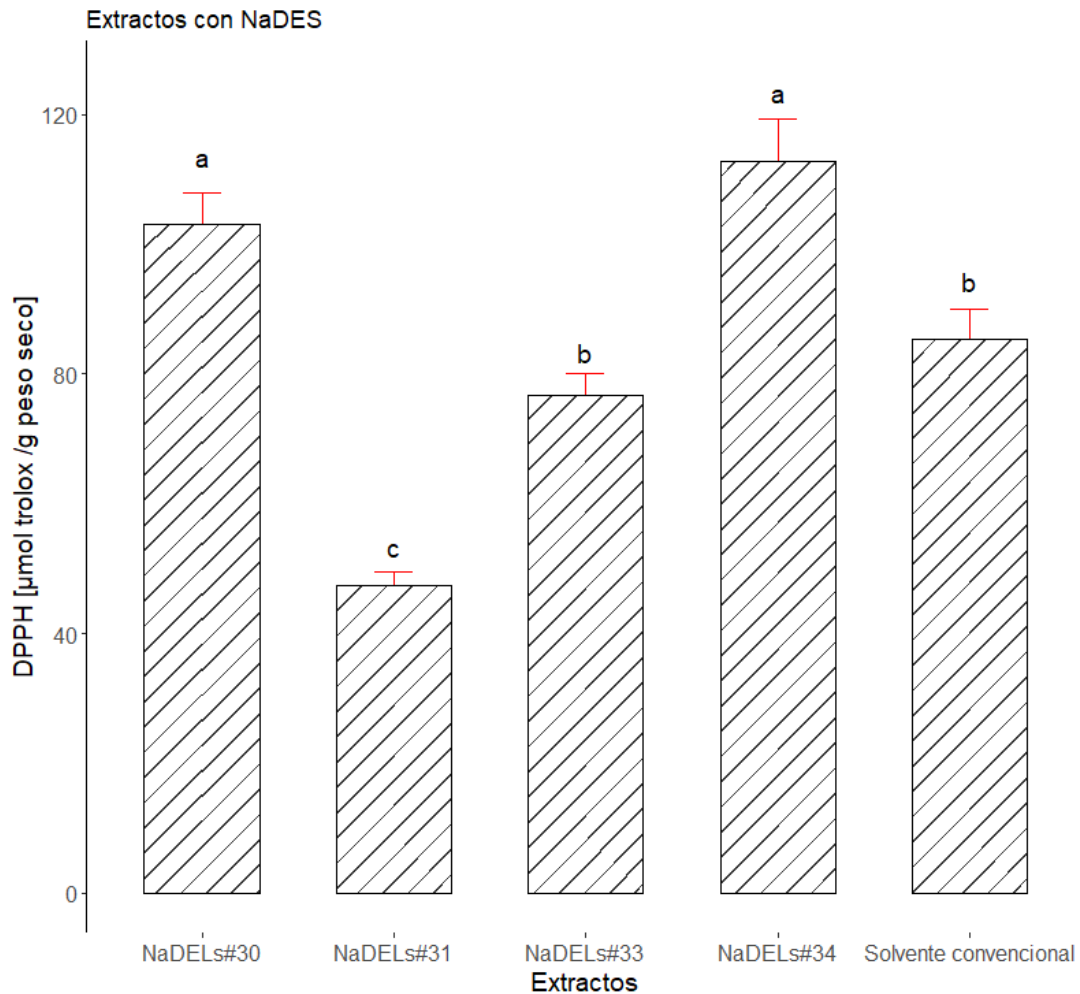


Figura 8. Actividad antioxidante DPPH de los extractos con NaDES y etanol.
Realizado por: Encalada, 2023

En la (**Figura 8**), se observa la actividad antioxidante FRAP, los extractos con NaDES con mayor actividad antioxidante fueron NaDELS# 33 con un valor de 276 ± 9.79 $\mu\text{moles Fe}^{2+}/\text{g RCS}$, seguido de los NaDELS# 30 y NaDELS# 34 que obtuvieron valores de 216.97 ± 8.47 y 205.74 ± 9.56 $\mu\text{moles Fe}^{2+}/\text{g RSC}$, respectivamente. El extracto con etanol obtuvo un valor de 116.87 ± 7.07 $\mu\text{moles Fe}^{2+} / \text{g RSC}$ y el NaDELS# 31 presentó una menor actividad antioxidante en comparación con el resto de los extractos con un valor de 97.04 ± 0.178 $\mu\text{moles Fe}^{2+}/\text{g RSC}$. Los extractos con NaDES que no presentaron diferencias significativas fueron el NaDELS# 30 y NaDELS# 34 con un valor ($p > 0.05$). Sin embargo, todos los extractos con NaDES presentaron diferencias significativas con respecto al etanol.

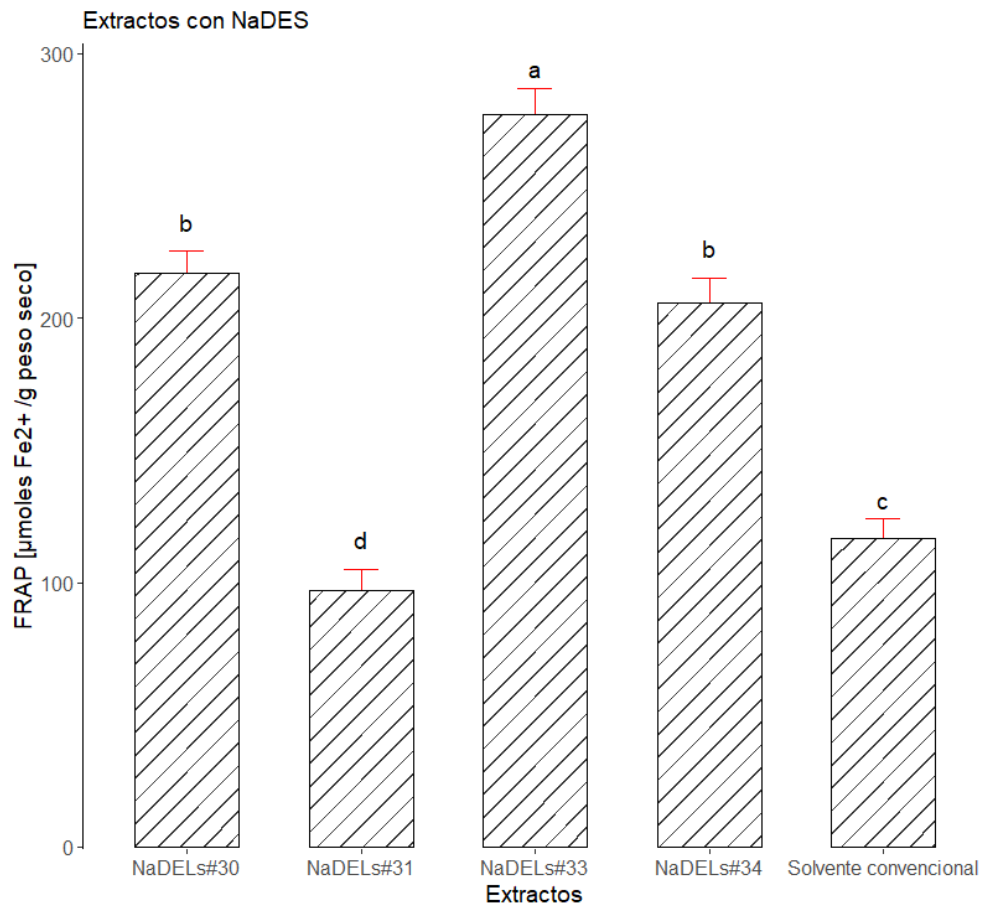


Figura 9. Actividad antioxidante FRAP de los extractos con NaDES y etanol.

Realizado por : Encalada , 2023

3.7. Correlación de Pearson

En la (Tabla 6) se observa la correlación de Pearson entre la actividad antioxidante (DPPH, FRAP) y el total de compuestos fenólicos con un valor de $p < 0.05$. La correlación fue dividida dentro de cinco categorías basado en la interacción con la que las variables están relacionadas: muy fuerte (1,0-0,80), fuerte (0,79-0,60), moderada (0,59-0,40), débil (0,39-0,20) y muy débil (0,19-0,00) [36]. El ensayo de TFC y DPPH tuvo una correlación positiva muy fuerte con un $r = 0.95$, mientras que entre TFC y FRAP obtuvo una correlación positiva moderada con un $r = 0.52$. Asimismo, en los ensayos de DPPH y FRAP se observó una correlación positiva moderada con un $r = 0.56$.

Tabla 5. Correlación de Pearson (r) para el contenido fenólico y actividad antioxidante (DPPH y FRAP) de los extractos de cacao con NaDES y etanol

Correlación de Pearson (r)	TFC	DPPH	FRAP
TFC	1	0.95***	0.52*
DPPH		1	0.56*
FRAP			1

Realizado por: Encalada, 202

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1. Formación de los NaDES

Los NaDES son líquidos homogéneos, transparentes y estables a temperatura ambiente. En la (**Tabla 2**) se observa la descripción física de las mezclas, así como la formación de los cristales en el transcurso de 48 horas (**Anexo 1**).

La formación de cristales precipitados se observó en el NaDELS#32, al exponer la mezcla a temperatura ambiente, indicando una inestabilidad en la formación de los líquidos eutécticos. Debido a ellos, los cristales resultantes del NaDELS# 32 fueron caracterizados mediante FTIR-ATR (**Anexo 2**), y se observó que su principal componente es el ácido oxálico.

La formación de los cristales en el NaDELS#32 puede ser atribuido a diversos factores, tales como la proporción molar, la estructura de sus componentes (incluyendo el número de grupos aceptores o donadores de enlace de hidrógeno), la disposición espacial de los grupos funcionales y la posición de los enlaces [40].

La relación molar 1:1 de la combinación betaína y ácido oxálico del NaDELS#32 podría inducir a la formación de cristales, ya que en investigaciones previas realizadas por Zhang et al. (2022), mostraron que la misma combinación en una proporción 1:2 resultó en una mezcla líquida homogénea [41].

Además, en la investigación realizada por Dai et al. (2013), encontró que las diferentes proporciones molares pueden influir en la estabilidad de las mezclas líquidas. Inicialmente, en las mezclas de azúcares y cloruro de colina en proporciones 2:1, 1:1, 1:4, observaron una mezcla líquida transparente, sin embargo, con el tiempo notaron la precipitación de cristales. Esto puede ser ocasionado por un exceso o falta de uno de los componentes de la mezcla [33]. Adicionalmente, la capacidad y cantidad de los ácidos orgánicos para establecer enlaces de hidrógeno resulta fundamental para incrementar la estabilidad de los líquidos eutécticos [42].

Esto se observa, en la investigación realizada por Zhang et al. (2022), quienes evaluaron la formación de 10 combinaciones de cloruro de colina y ácidos orgánicos en proporciones 5:1 y ninguna de estas combinaciones formó un NaDES. Mientras que, las combinaciones basadas en cloruro de colina: ácido glicólico (1:1) y cloruro de colina: ácido láctico (1:2), formaron líquidos transparentes. Por lo que, concluyeron que cuanto mayor es el número de grupos hidroxilo o carboxilo en la estructura del HBD, menor será la cantidad del compuesto HBD para formar NaDES [43].

En consecuencia, la formación de los enlaces de hidrógeno intermoleculares define la estructura física de los NaDES, estas fuerzas intermoleculares deben estar equilibradas para impedir que la mezcla se cristalice y formen un líquido eutéctico estable [44].

Por otro lado, el agua es importante en la formación de la mezcla eutéctica porque interactúa como donador o aceptor de enlace de hidrógeno. Por lo tanto, los NaDES con alto o bajo contenido de agua pueden romper las interacciones de hidrógeno de los componentes o pueden formar la mezcla eutéctica. Es importante señalar que todos los NaDEs # 30, NaDEs # 31, NaDEs # 33 y NaDEs # 34 presentaron un contenido de agua < 50%. Por lo que, la formación de cristales en el NaDEs#32, también podría estar relacionada con el contenido de agua debido a que esta mezcla presentó un contenido de agua > 50% y se ha reportado que los NaDES con esta cantidad de agua debilitan la interacción molecular, desintegrando este sistema [45].

Esto se relaciona con las investigaciones previas realizadas por Dai et al. (2014), las cuales analizaron mezclas eutécticas en agua, observaron que la mezcla de cloruro de colina y 1-2 propanodiol, conserva la estructura supramolecular cuando el contenido de agua es inferior a 50%, sin embargo, una mayor dilución produce una mezcla acuosa de sus componentes individuales [46].

4.2. Propiedades fisicoquímicas de los NaDES

4.2.1. Densidad

La densidad de los NaDES proporciona información sobre las interacciones moleculares, y, en general, es mayor a la del agua. Se ha observado que los NaDES basados en polialcoholes y ácidos orgánicos tienen densidades menores en

comparación con los NaDES basados en azúcares, como se muestra en la (**Tabla 3**), en la cual se indica la disminución de la densidad en orden decreciente NaDELS # 31 > NaDELS # 34 > NaDELS # 33 > NaDELS # 30 con valores de 1.25, 1.117, 1.14, 1.059 g/mL respectivamente, lo que concuerda con los resultados del estudio de Mohd Fuad y Nadzir (2022), donde se encontraron valores similares, NaDELS# 31: 1.28 g/mL, NaDELS# 34: 1.21 g/mL, NaDELS# 33: 1.19 g/mL, NaDELS# 30: 1.07 g/mL. Este estudio también señaló que las altas densidades en los NaDES se deben a las fuertes interacciones intermoleculares, las cuales limitan la movilidad de las moléculas [33].

En la investigación realizada por Basaiahgari et al. (2018), se encontró que los DES o NaDES basados en glicerol tienen una mayor densidad en comparación con los basados en etilenglicol. Esto sugiere que el número del grupo funcional -OH en el HBD (donantes de enlaces de hidrógeno) influye en la formación de los enlaces H, lo que a su vez afecta a la movilidad de las moléculas influyendo en la densidad [12]. Esto concuerda con la densidad del NaDELS#34 y NaDELS#30 basados en polioles. El NaDEL#34 al tener tres grupos hidroxilo en su estructura presentó una mayor densidad, mientras que el NaDELS#30 al tener dos grupos hidroxilo obtuvo una menor densidad.

4.2.2. Viscosidad

La viscosidad de los NaDES es influenciada por el tipo de HBD, como se indica en la (**Tabla 3**), se observó la variación de la viscosidad en un orden decreciente: NaDELS#31 > NaDELS#34 > NaDELS#30 > NaDELS#33. Estas combinaciones fueron reportadas por Mohd Fuad y Nadzir (2020), y se observó que difieren con los valores de viscosidad obtenidos. Esta variación podría estar relacionada con el contenido de agua presente en los NaDES.

Los NaDES que contienen un mayor porcentaje de agua tienden a reducir su viscosidad, lo que conlleva una alteración de sus propiedades físicas [33]. Un estudio realizado por Omar y Sadeghi reveló que los NaDES que contenían agua, presentaron una viscosidad de 320 mPa*s. En contraste, las mezclas solo con los dos componentes registraron una viscosidad de 1700 mPa*s [47]. La reducción o incremento de la viscosidad se relaciona con las interacciones débiles o fuertes de los enlaces de hidrógeno [48].

Además, se ha observado que la densidad y viscosidad de los NaDES esta influenciada por los pesos moleculares de sus HBDs. Las mezclas eutécticas compuestos con pesos moleculares más elevados presentan mayor densidad o viscosidad que los compuestos de menor peso molecular [50]. Esto se confirma en el NaDELS#31 basado en glucosa, con un peso molecular de 180.15 g/mol, que muestran una densidad y viscosidad superior, en comparación con los NaDES basados en ácido láctico – NaDELS#33 cuyo peso molecular es de 90.08 g/mol. Esta relación también se podría observar comparando los NaDES basados en polioles como glicerol - NaDELS#34 y propilenglicol - NaDELS#30 con pesos moleculares de 92.09 g/mol y 76.09 g/mol, respectivamente.

Adicionalmente, en los polioles se ha observado que la viscosidad y densidad está relacionada con el número de grupos hidroxilos presentes en la molécula. Este aumento de la viscosidad y densidad se debe al incremento de los enlaces de hidrógeno, lo cual se relaciona con la teoría de agujeros, asociada al espacio libre y la probabilidad de encontrar agujero de dimensiones adecuadas para que las moléculas se puedan mover libremente [49].

4.2.3. Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica está relacionada con la viscosidad de los NaDES por lo cual los solventes con mayor viscosidad presentan una menor conductividad y viceversa. Esto es ocasionado por la capacidad del flujo de los iones que se presenta en el fluido [50]. En la (**Tabla 3**) se observa que los NaDES con mayor conductividad eléctrica fueron el NaDELS#30, seguido del NaDELS#33, NaDELS#31 y NaDELS#34. Estos resultados son comparados con los reportados por Mohd Fuad y Nadzir (2022), quienes encontraron que los NaDES basados en azúcares y alcohol presentaron baja conductividad a diferencia de los NaDES basados en ácido orgánicos [33].

La conductividad eléctrica de los NaDES es influenciada por su estructura iónica, tamaño y forma, además son afectados por factores como la naturaleza de sales orgánicas y compuestos donadores de hidrógenos, la relación molar y el contenido de agua [51]. El tipo de compuestos donadores o aceptores de hidrógeno afectan a la conductividad eléctrica. En la investigación realizada por Juric et al. (2021), encontró que todos los NaDES de cloruro de colina combinados con ácidos orgánicos y azúcares, exhibieron valores bajos de conductividad < 7 mS/cm. Esto se relaciona con los HBD de

los NaDELS#31 y NaDELS#33, como se detalla en la (**Tabla 3**), mientras que los NaDES basados en polioles, úrea, propanodiolos y butanodiolos presentaron valores altos de conductividad eléctrica entre 14.45 – 25.59 mS/cm [50]. Sin embargo, estos últimos difieren de los NaDES basados en polioles, NaDELS#30 y NaDELS#34, lo que podría estar relacionado con el tipo de aceptador de enlaces de hidrógeno (HBA).

Por otro lado, la proporción molar influye en la conductividad de los NaDES. Por ejemplo: el NaDES basado en cloruro de colina/glicerol incrementa la conductividad, al añadir un 33% de la fracción molar del cloruro, lo cual provoca un cambio en la conductividad de 1 a 1.047 mS/cm [52]. Esto se puede observar en el NaDELS# 33 que incrementó su conductividad en comparación con el valor reportado. Esta variación podría estar relacionada con la relación molar, ya que la proporción preparada de betaína y ácido láctico fue de 1:7, mientras que la misma combinación reportada por Mohd Fuad y Nadzir (2022) fue de 1:2.

El contenido de agua en los NaDELS#30, NaDELS#31, NaDELS #33 y NaDELS#34 tiene un impacto en la conductividad eléctrica. Se ha observado que en los NaDES que contienen cloruro de colina y urea con un 10% de contenido de agua, su conductividad eléctrica se incrementó tres veces más [53]. Además, investigaciones previas han demostrado que los NaDES basados en cloruro de colina y ácido cítrico con contenidos de agua en un rango de 10 a 50 % p/p, presentaron un incremento en las conductividades eléctricas entre 4330 - 55700 μ S/cm [54]. Esto se relaciona con la conductividad del NaDELS#30 que obtuvo un valor de 5195.33 ± 2.081 μ S/cm con un contenido de agua <50%, en contraste con lo reportado por Mohd Fuad y Nadzir (2022) que para la misma combinación obtuvieron un valor de 1.087 ± 0.031 μ S/cm con un contenido de agua de 0.4136%.

4.2.4. pH

El pH de los NaDES está influenciado por sus componentes (HBDs). En la (**Tabla 3**), se observa la influencia de los distintos HBD en el pH de los NaDES. Las mezclas más ácidas son las basadas en ácidos orgánicos, como el NaDELS #33, con un pH de 2.19. Mientras que las mezclas ligeramente ácidas incluyen aquellas que contienen azúcares y polialcoholes, específicamente NaDELS#31, NaDELS#30 y NaDELS#34, con valores de pH de 5.59 ± 0.0058 , 5.67 ± 0.0058 y 5.62 ± 0.01 , respectivamente. Las mismas

combinaciones fueron identificadas en el estudio de Mohd Fuad y Nadzir (2022), quienes reportaron que los NaDES basados en polialcoholes como NaDELS #30 y NaDELS #34, presentaron valores de pH de 8.5 ± 0.14 y 7.56 ± 0.06 , respectivamente. Mientras que los NaDES que contenían azúcares, como NaDELS #31, mostraron un pH de 6.44 ± 0.013 , y aquellos basados en ácidos orgánicos NaDELS #33, obtuvieron un valor de pH de 3.337 ± 0.01 [33]. Las diferencias en los valores de pH de los NaDES pueden estar relacionadas con la proporción molar, el compuesto donador de enlace de hidrógeno y el contenido de agua. En el estudio de Hayyan et al. (2013), evaluaron la proporción molar de los NaDES basados en glucosa y observaron que el pH de la mezcla variaba entre 6.03-7.11 [55].

El pH se influye por su donador de enlace de hidrógeno, debido a la incorporación de compuestos ácidos en las mezclas. Esto se evidencia en el NaDELS#33 que presentó mayor acidez debido al ácido láctico presente en el NaDES. Este efecto del tipo de HBD también se encontró en el estudio de Skulcova et al., (2018) que analizaron 17 combinaciones de NaDES y observaron que, al combinar con ácidos orgánicos, su pH se ve afectado por la acidez de su HBD [56]. Esto se observa en el NaDELS#33 que obtuvo el menor pH con respecto a las otras mezclas.

Además, el contenido de agua afecta el pH de los NaDES, según Mitar et al. (2019). En su trabajo sobre los NaDES basados en ácidos orgánicos, observaron una disminución en el pH al agregar agua [54]. Por ende, la variación en el pH del NaDELS#33 podría explicarse por el contenido de agua presente en la mezcla.

4.3. Caracterización de los NaDES mediante FTIR

Los NaDES se forman por la interacción de los enlaces de hidrógenos entre los compuestos HBA y HBD. Estos enlaces se pueden identificar por medio del espectro infrarrojo a través del desplazamiento de la posición de los grupos funcionales representados por sus picos Joseph et al. (2007), definió dos tipos de desplazamientos hacia el rojo (red-shift) y hacia el azul (blue-shift). El red-shift se define como el alargamiento del enlace de hidrógeno, ocasionando un cambio en la intensidad del espectro y una reducción del número de onda, en cambio, blue-shift es el acortamiento del enlace de hidrógeno generando una disminución del espectro infrarrojo y un incremento en el número de onda [57].

En la (**Figura 1, 2, 3 y 4**), se muestran los espectros de los NaDELS#30, NaDELS#31, NaDELS#33 y NaDELS#34, los espectros de los componentes por separado y la interacción de sus mezclas eutécticas, observando que después de asociarse, los componentes de cada mezcla no perdieron su estructura, demostrando que no se produce una reacción química. En todos los NaDES, se han detectado los grupos funcionales de la betaína, entre los que incluyen -C=O y -OH.

En la (**Figura 1**), se muestra el espectro del propilenglicol, betaína y el NaDELS#30. Se observa que el NaDELS#30 presentó un blue-shift del grupo -OH desde 3 312.70 a 3 329.71 cm^{-1} , en comparación con el propilenglicol. Además, presentó un blue-shift en el grupo carbonilo C=O perteneciente a la betaína desde 1 627.59 a 1 633.27 cm^{-1} . Este cambio en el número de onda en las bandas del carboxilo y el incremento en la anchura de la banda del grupo hidroxilo se deben a la formación de enlaces de hidrógeno entre el grupo carboxilo de la betaína y el grupo hidroxilo del propilenglicol (**Figura 10**), influenciados por la electronegatividad del oxígeno -O presente en COO- [32], generado por la densidad electrónica en el oxígeno del carbonilo de la betaína, sugiriendo la formación de enlaces de hidrógeno en los NaDES [31], Sin embargo, según Zahrina et al. (2018), esta mezcla eutéctica presenta el menor grado de interacción de los enlaces de hidrógeno entre sus componentes, en comparación con otras mezclas eutécticas basados en polioles [58].

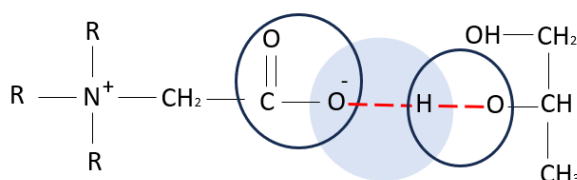


Figura 10. Puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo de la betaína y el grupo hidroxilo del propilenglicol – NaDELS# 30.

Realizado por: Encalada, 2023.

En la (**Figura 2**), se observa el espectro de la glucosa y el NaDELS#31. El NaDELS#31 presentó un blue-shift en el pico del grupo hidroxilo -OH, que pasa de 3 277.32 a 3 287.76 cm^{-1} en comparación con su componente individual la glucosa, y también en el pico del grupo carbonilo -C=O, que cambia de 1 627.59 a 1 630.82 cm^{-1} en comparación con la betaína. Los cambios en la intensidad y número de onda de los picos podrían ser

causados por la interacción de los grupos hidroxilo de la glucosa -OH y el grupo carbonilo de la betaína -COO, lo que permite la formación de enlaces de hidrógeno (**Figura 11**). Además, se ha identificado que el blue-shift de los grupos hidroxilo se debe al contenido de agua, según Alberti et al. (2023), reportó que los NaDES que contienen agua en combinaciones de ácido cítrico y glucosa, experimentan un incremento en el número de onda, formando enlaces débiles entre HBA y HBD de los componentes. Esto sugiere la participación del agua en la red de enlaces de hidrógeno con ácido cítrico y glucosa [59].

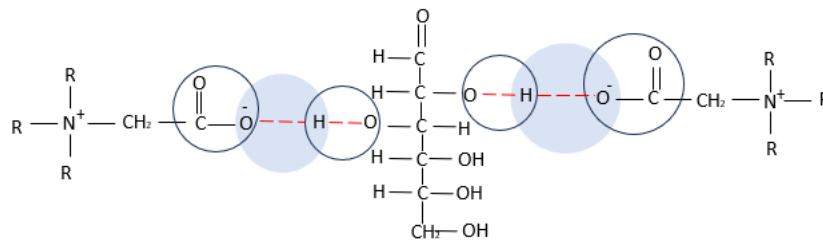


Figura 11. Puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo de la betaína y el grupo hidroxilo de la glucosa – NaDELS# 31.

Realizado por: Encalada, 2023.

En la (**Figura 3**), se observa el espectro del ácido láctico y el NaDELS# 33. En el NaDELS# 33, se observó un desplazamiento (red-shift) del pico correspondiente del grupo hidroxilo -OH, que cambia de 3 391.11 a 3 371.97 cm^{-1} . Además, se observan dos picos del grupo carbonilo C=O correspondiente a la betaína y del ácido láctico, estos picos presentan un blue-shift, que pasa desde 1 627.59 y 1 718.05 cm^{-1} a 1 634.19 y 1 719.43 cm^{-1} , respectivamente (**Figura 12**). El desplazamiento (red-shift) podría ser explicado por la formación de enlaces de hidrógeno estables [54]. En las investigaciones previas de los NaDES basados en ácido láctico y betaína, reportaron la interacción del grupo carboxilo de la betaína y el grupo hidroxilo del ácido láctico. Estas interacciones modifican el estiramiento del grupo hidroxilo y grupo carbonilo, provocando un cambio en el número de onda [60].

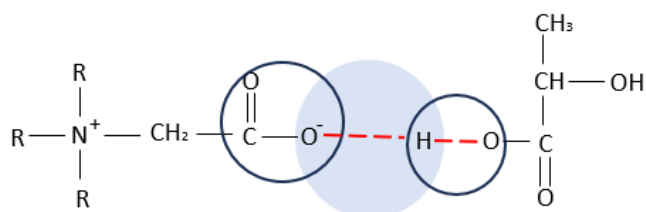


Figura 12. Puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo de la betaína y grupo hidroxilo del ácido láctico – NaDELS# 33.

Realizado por: Encalada, 2023.

En la (**Figura 4**) se muestra el espectro del glicerol y el NaDELS#34. En el NaDELS#34, se observa un desplazamiento blue-shift en la banda del grupo hidroxilo -OH correspondiente al glicerol de 3 282.87 a 3 320.29 cm^{-1} . Así mismo, se observó el cambio en la posición del pico relacionado al grupo carbonilo de la betaína C=O que va desde 1 627.59 a 1 630.79 cm^{-1} . Según Huang et al. (2023), reportaron la combinación del NaDELS#34, el estiramiento del grupo hidroxilo en la región entre 3 300 – 3 400 cm^{-1} [61]. En otra investigación encontraron que el grupo carbonilo de la betaína presentó un desplazamiento desde 1 610 a 1 624 cm^{-1} , y en el grupo hidroxilo se observó en un rango de 3 271 - 3 303 cm^{-1} [62]. El desplazamiento del grupo carbonilo de la betaína y grupo hidroxilo de los componentes que actúan como HBD permiten identificar la formación de enlaces hidrógeno (**Figura 13**).

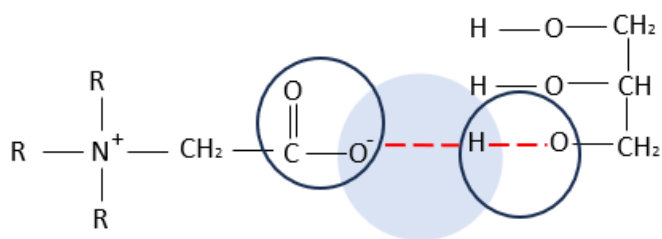


Figura 13. Puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo de la betaína y el grupo hidroxilo del glicerol – NaDELS# 34.

Realizado por: Encalada, 2023.

4.4. Hemólisis de los NaDES

Los NaDES podrían estar presente en los animales, quienes los utilizan como estrategia para sobrevivir en condiciones extremas de temperatura. Gertrudes, et al. 2017, encontró que la *Rana sylvatica*, acumula glucosa y úrea como estrategia de resistencia al frío [63]. La presencia de NaDES en diversos organismos vivos sugiere la posibilidad de aplicaciones en sectores como la cosmética, farmacéutica y la industria alimenticia. Sin embargo, para sus usos posteriores es necesario comprender la toxicidad de estos solventes. La hemólisis se presenta como un paso inicial para predecir la citotoxicidad in vivo, brindando información sobre la interacción de los NaDES con la membrana celular.

La membrana celular de los eritrocitos está compuesta por lípidos y proteínas, principalmente los fosfolípidos, los cuales proporcionan propiedades específicas a la membrana. La interacción de los componentes de los NaDES con los fosfolípidos presenta una relación directa con la toxicidad [64]. Por lo que, la toxicidad de los NaDES depende de la composición del catión de la sal, relación molar y la estructura química del HBD [54].

Los resultados de la actividad hemolítica de los NaDES basados en betaína se observan en la (**Figura 5**). Estos NaDES obtuvieron porcentajes de hemólisis mayores a 30%, mientras que sus componentes individuales presentaron porcentajes mayores a 1.70%. Investigaciones previas, reportaron que la toxicidad de los NaDES es mayor en mezclas eutécticas que en los componentes por separado, debido a la deslocalización de su carga producida por la formación de enlaces de hidrógeno del sistema [65]. Esto se observó también en el NaDELS#34 que presentó un 85.36 ± 0.99 % de actividad hemolítica, mientras que sus componentes por separado, betaína y glicerol obtuvieron un 70.93 ± 0.52 y 1.70 ± 0.18 %, respectivamente.

Por otra parte, se encontró que las estructuras del HBA tiene un efecto en la toxicidad de los NaDES. Esto se observa en la betaína, que presentó un 70.93 ± 0.52 % de hemólisis. Cornmell et al. (2008), reportaron que los cationes de sales de amonio cuaternario interactúan con los grupos aniónicos de los fosfolípidos de la membrana celular, penetrando en el citoplasma y provocando una pérdida de la integridad de la membrana [66].

Además, investigaciones previas por García, et al. (2023), respaldan que los líquidos eutécticos basados en colina aumentaban su toxicidad, al incrementar la longitud de la cadena alquílica en la estructura (**Figura 14**), lo cual se encuentra relacionado a su carácter hidrofóbico. Por lo que, al penetrar la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular, podría causar daños [67,68]. Estas investigaciones sugieren que tanto el número de átomos de oxígeno como la longitud total de las cadenas laterales catiónicas podrían ser elementos estructurales determinantes en la interacción con la membrana celular [69].

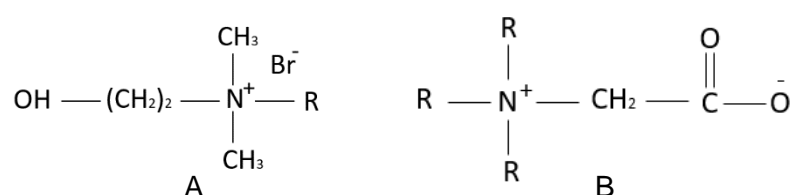


Figura 14. Estructura de la colina (A) y betaína (B)

Realizado por: Encalada, 2023.

Por otra parte, se ha encontrado que la proporción molar influye en la viscosidad, afectando a la toxicidad de los NaDES. Esto se observa en el NaDELS# 91.62 ± 0.59% de hemólisis con una viscosidad de 287.33 ± 1.52 cP. Hayyan et al. (2016), demostró la relación entre la viscosidad y la toxicidad mediante el modelo de COSMO-RS. Reportó que los líquidos más viscosos son más tóxicos, sugiriendo una toxicidad por la acumulación y agregación celular del solvente, debido a la interacción fuerte entre los NaDES y los lípidos de la membrana celular [64].

Adicionalmente, la toxicidad de los componentes podría afectar directamente en la toxicidad de los NaDES, tal como se muestra en la (**Figura 5**), el NaDELS#30 y NaDELS#33 pueden estar influenciados por el tipo de donante de los enlaces de hidrógeno (HBD). Esto concuerda en la investigación realizado por Hayyan, et al. (2015), en la cual encontraron que el HBD de los NaDES basados en cloruro de colina en estado puro tienen la capacidad de desnaturalizar las proteínas celulares [70]. Por lo tanto, se relaciona con los resultados presentados de los componentes por separado como el propilenglicol y ácido láctico.

El HBD del NaDELS#30 (propilenglicol) en su estado puro afecta directamente a las membranas celulares, provocando una hemólisis aguda en concentraciones mayores al 30 % [71,72]. Por otro lado, el ácido láctico en estado puro, HBD del NaDELS#33, puede causar hemólisis cuando la concentración en la sangre supera los 4 mmol/L, ya que provoca un aumento en la fragilidad osmótica de los eritrocitos [73,74].

En este contexto, al combinar estos componentes (**Figura 15**) se evidencia que los enlaces de hidrógeno no solo afectan las propiedades fisicoquímicas, sino también la estructura del NaDES, influyendo en su toxicidad. Esto se observa en el NaDELS#33, donde la toxicidad resultante de los componentes individuales, betaína y ácido láctico, presenta una sinergia en el NaDES, reduciendo así la toxicidad asociada a la betaína.

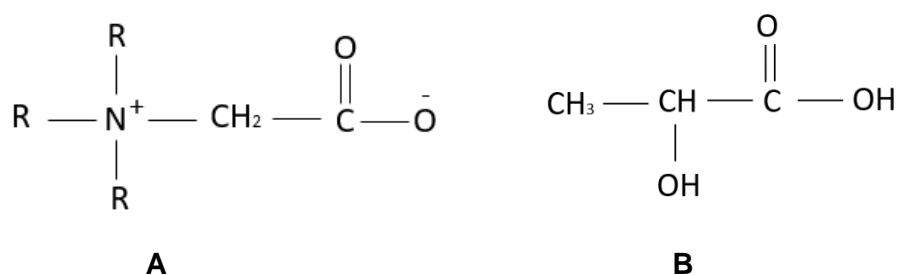


Figura 15. Estructura de la betaína (A) y ácido láctico (B)

Realizado por: Encalada, 2023.

La disminución del porcentaje de hemólisis del NaDELS#33 podría estar asociada por la interacción del ácido láctico y betaína, debido a la capacidad del HBD al ser una molécula hidrofílica. Esta afinidad por el agua podría resultar en una menor toxicidad, lo que sugiere una afinidad insuficiente hacia los lípidos [75,76]. Por lo tanto, la betaína presente en el NaDELS#33 podría reducir la interacción con la membrana celular.

4.5. Extracción de compuestos fenólicos

En la cuantificación de fenoles totales se encontró que los valores se encuentran en los rangos reportados por Matic, et al., (2017), se validó el método con los objetivos de la **Tabla 4** [37]. Las propiedades fisicoquímicas, la composición y el tipo del solvente influyen en la extracción de los compuestos fenólicos. En este estudio se comparó dos tipos de solventes: NaDES y solvente convencional (etanol-agua) (**Anexo 5**).

Se contrastó, los cuatro extractos de NaDES basados en betaína y sus HBDs (glicerol, ácido láctico, glucosa y propilenglicol) con el solvente convencional, utilizando un nivel de significancia de $p < 0.05$. En el (**Anexo 7**) se observa que todos los extractos obtuvieron valores superiores a 9.86 ± 0.578 mg EAG/g RSC, valor correspondiente al NaDELS# 31. Este extracto, obtuvo el menor contenido fenólico y podría estar relacionado con su viscosidad. La viscosidad se relaciona con la relación molar y la estructura química del HBA/HBD.

En investigaciones previas reportaron que la viscosidad afecta a la extracción de compuestos fenólicos debido a la baja transferencia de masa de la matriz vegetal con los solventes. La viscosidad se relaciona por los enlaces de hidrógeno, las interacciones electrostáticas y de Van der Waals [77]. Por lo que, la movilidad de los NaDES basados en polioles y los NaDES basados en ácidos orgánicos son mejores que los NaDES basados en azúcares, debido a que pueden penetrar la matriz y conseguir una extracción eficaz [15]. Esto se relaciona con los resultados presentados en el (**Anexo 7**) en la cual el HBD de los NaDES con mayor contenido fenólicos, fueron NaDELS#34 - glicerol, NaDELS # 30-propilenglicol, seguido del NaDELS # 33-ácido láctico y NaDELS # 31-glucosa.

Asimismo, se conoce que algunas propiedades de los NaDES podrían ser ajustadas al agregar ciertas cantidades de agua, como la viscosidad. Cuando se agrega agua, reduce la viscosidad, por ende, se incrementa la eficiencia de extracción, por lo que el NaDELS #30 y NaDELS#34 han obtenido altos valores en el contenido de fenoles, que corresponden a 18.42 ± 0.973 y 19.53 ± 1.234 mg EAG/g RSC, respectivamente. Esta relación del incremento del contenido de agua en los NaDES con la extracción de compuestos fenólicos se encuentra en la investigación de Pavlovic et al. (2020), en la cual reportó que la extracción de metabolitos secundarios de residuos de cacao se incrementó a agregar un 50 % de agua en los NaDES [30].

Además, la extracción con ambos NaDES no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$), debido a que el HBD (glicerol y propilenglicol) pertenecen al grupo de los polioles, estos resultados son similares a los reportados por Benitez et al. (2023), que encontró que los extractos de residuos de cacao con NaDES basados en cloruro de colina y polioles (etilenglicol y glicerol) obtuvieron un comportamiento similar en el contenido de fenoles totales ($p > 0.05$) [78]. Por otro lado, el extracto de etanol obtuvo

14.67 ± 0.968 mg EAG/g RSC, este valor fue inferior al trabajo realizado por Nsor-Atindana, et al. (2012), el cual reportó que el etanol con 80% obtuvo 23.36±1.59 mg EAG/g RSC [79]. Esta variación podría estar vinculada por el tipo de extracción y concentración del solvente.

El etanol es inferior en su capacidad de extracción al compararlo con los NaDELS# 34 y NaDELS# 30. Esto podría estar asociado con la interacción de los compuestos fenólicos y el solvente. En los NaDES se ha reportado la interacción de los enlaces de hidrógeno con los compuestos fenólicos. Zuo et al. (2023), encontró que los compuestos fenólicos que contienen múltiples grupos hidroxilo podrían desempeñar el papel de donantes de enlace de hidrógeno (HBD), compitiendo por el aceptor de enlace de hidrógeno (HBA) de los NaDES. Sin embargo, en la mezcla de los NaDES, el HBD podría bloquear e impedir la interacción entre los compuestos fenólicos y el HBA. Por lo tanto, cuando los compuestos fenólicos interactúan con el HBA, podrían ser extraídos [15].

En cambio, el NaDELS# 33 basado en ácido láctico obtuvo un contenido de fenoles ligeramente inferior en comparación con el extracto con el solvente convencional, correspondiente a 12.98 ± 0.541 mg EAG/g RSC. Estos valores son levemente superiores a los valores encontrados en el trabajo de Benitez et al. (2023), donde los extractos con NaDES basados en cloruro de colina y ácido láctico con un contenido de agua al 30% y etanol obtuvieron un contenido de fenoles de 8.09 ± 0.16 y 9.45 ± 0.26 mg EAG/g RSC, respectivamente. En el mismo estudio reportaron que las combinaciones de cloruro de colina y ácido láctico podrían tener valores superiores en el contenido fenólico al agregar agua hasta un 50% [78]. Estos resultados podrían estar asociados con su polaridad, ya que un incremento en el contenido de agua resulta en un incremento de esta, ocasionando una alteración de la estructura molecular de los NaDES, debilitando las interacciones de los enlaces de hidrógeno entre el HBA y HBD [33].

4.6. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante DPPH está relacionada con la transferencia de electrones, y el poder antioxidante reductor férrico (FRAP) se basa en la reducción de un complejo de hierro (Fe^{3+} a Fe^{2+}) [78]. La actividad antioxidante depende de varios factores como: tipo de solvente, concentración del compuesto antioxidante y estructura química de la

molécula antioxidante.

En la **(Figura 7)** se observa el porcentaje de inhibición del radical DPPH (%) como función de la concentración de los extractos con NaDES y solvente convencional. Se puede mostrar que los extractos NaDELS #30, NaDELS#33 y NaDELS#34 obtuvieron altos porcentajes de inhibición del radical DPPH con respecto al etanol. Vorobyova (2023) observó que la polaridad del solvente influye en la actividad antioxidante de los extractos de residuos de uva y encontró que los extractos con NaDES mostraron altos porcentajes de inhibición del radical DPPH en comparación con los extractos con etanol [80]. La alta actividad antioxidante se relaciona con el contenido fenólico de los extractos, en investigaciones previas mencionan que los extractos con NaDES tienen la capacidad de realizar una alta recuperación de compuestos bioactivos [81].

En la **(Figura 8)** se observa que los extractos que obtuvieron alta actividad antioxidante fueron el NaDELS# 30 y NaDELS# 34 con valores de 103.15 ± 4.72 y 112.71 ± 6.63 $\mu\text{mol trolox/g RSC}$ respectivamente, no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre sí. Esto podría relacionarse con el contenido de fenoles que se obtuvo en los extractos **(Anexo 7)**.

Los compuestos fenólicos podrían ser los responsables de la actividad antioxidante en DPPH con una fuerte correlación $r = 0.95$ y un nivel de significancia con un $p < 0.05$. Resultados similares fueron encontrados por Utami, et al. (2016), cuyo trabajo de investigación reportó una correlación positiva entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante DPPH de los extractos de residuo de cacao con acetona al 70%. La actividad antioxidante se relaciona con los compuestos fenólicos debido a su peso molecular, estructura y concentración en los extractos de residuos de cacao [82].

Asimismo, se observó que los extractos del NaDELS# 33 y solvente convencional con valores de 76.69 ± 3.45 y 85.31 ± 4.69 $\mu\text{mol trolox/g RSC}$ **(Figura 8)**, respectivamente no mostraron diferencias significativas entre sí ($p > 0.05$), aunque en el contenido fenólico obtuvieron diferencias significativas para ambos extractos **(Anexo 7)**. El mismo comportamiento fue reportado en estudios previos con extractos de residuos de cacao con NaDES basados en cloruro de colina [78].

Por otro lado, se encontró que los valores obtenidos en DPPH del extracto con el solvente convencional, presentó un incremento comparado con el trabajo de Okiyama et al. (2018), en el cual reportó que en el extracto de etanol absoluto obtuvo un valor de $65 \pm 2 \mu\text{mol trolox/g}$ [83]. Esta diferencia podría estar relacionada con la concentración de etanol, Dewi et al. (2022) encontró que los extractos de residuos de cacao con etanol al 50% incrementó la capacidad antioxidante [3].

En la evaluación de la actividad antioxidante mediante el método FRAP (**Figura 9**), se observa que el NaDES con mayor actividad antioxidante, fue el NaDELS #33 con un valor de $276.01 \pm 9.79 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g RSC}$. Este resultado podría estar influenciado por el pH, trabajos previos indican que la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} está influenciada por el pH, por lo tanto, han reportado que los extractos con NaDES basados en cloruro de colina y ácido láctico obtuvo un incremento en los valores de actividad antioxidante de FRAP, debido a bajos valores del pH [84].

Mientras que los NaDELS #30 y NaDELS# 34 obtuvieron valores de 216.97 ± 8.47 y $205.74 \pm 9.56 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g RSC}$, respectivamente. Estos extractos presentaron un incremento en la actividad antioxidante con respecto al extracto con solvente convencional, que obtuvo $116.87 \pm 7.07 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g RSC}$. Esto también ocurre en el trabajo de Benítez et al. (2023) que los extractos con NaDES presentaron una alta actividad antioxidante de FRAP en comparación con los solventes convencionales [78].

Por otro lado, se observa una moderada correlación entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante FRAP, $r = 0.52$. Esto puede ser explicado por el tipo de solvente extractor relacionado con la acidez, la solubilidad y capacidad de extraer compuestos fenólicos con alto poder reductor [85]. Adicionalmente, la correlación entre el método DPPH y FRAP fue moderada con un $r = 0.56$. Esto se puede explicar por qué ambas metodologías evalúan la transferencia de electrones que ocurre en los extractos, pero el tipo de solvente influye en la metodología.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

En este trabajo se investigó la formación de los NaDES de cinco mezclas líquidas compuestas por betaína (HBA) y sus respectivos HBD, que incluyen propilenglicol, glucosa, ácido oxálico, ácido láctico y glicerol. Sin embargo, resultaron ser eutécticas y estables a temperatura ambiente, cuatro combinaciones denominadas NaDELS#30, NaDELS#31, NaDELS#33 y NaDELS#34. El NaDELS#32 basado en ácido oxálico, no formó una mezcla líquida homogénea debido a la precipitación de cristales, causada por un exceso de agua (> 50%). Esta condición debilitó las interacciones de hidrógeno y evitó la formación de la mezcla eutéctica estable.

Las propiedades fisicoquímicas de los NaDES dependen del tipo de HBD, el contenido de agua y la proporción molar de la mezcla. Se caracterizaron los NaDELS#30, NaDELS#31, NaDELS#33 y NaDELS#34. El NaDES con la mayor densidad y viscosidad fue el NaDELS# por azúcares, seguido por el NaDELS#34, compuesto por polioles. Los NaDES con menor densidad y viscosidad fueron el NaDELS#33 compuesto por ácidos orgánicos, y el NaDELS#30. En cuanto al pH, el NaDELS#33 presentó el valor más bajo, seguido por el NaDELS#31, NaDELS#34 y NaDELS#30. La conductividad eléctrica aumentó a medida que disminuyó la viscosidad, lo que significa que los NaDES más viscosos fueron menos conductivos y viceversa. Los NaDES más conductivos fueron el NaDELS#30 y el NaDELS#33, seguidos por el NaDELS#31 y el NaDELS#34.

La formación de los NaDES se describió a través de las interacciones moleculares observadas en el espectro infrarrojo. Los NaDES se caracterizan por los enlaces de hidrógeno entre los grupos funcionales de la betaína (HBA) y sus HBD (propilenglicol, glicerol, ácido láctico y glucosa). En los espectros de los NaDES, se evidenció que la estructura de HBA y HBD no experimentó reacciones químicas, sino que se formó una mezcla de los compuestos. Además, se identificó el desplazamiento en la intensidad de las bandas del grupo carbonilo C=O y el grupo hidroxilo O-H, lo que indicó la formación de enlaces de hidrógeno. Los NaDES que presentaron mayor toxicidad fueron NaDELS#30, NaDELS#31 y NaDELS#34, mientras que el NaDELS#33 mostró menor toxicidad. Esto está relacionado con el tipo de HBD y sus propiedades fisicoquímicas.

En cuanto a la extracción de compuestos fenólicos con NaDES, los NaDELS#30 y NaDELS#34 obtuvieron un alto contenido de fenoles en comparación con el etanol, mientras que con el NaDELS#31 obtuvo el menor contenido y el NaDELS#33 no presentó diferencias significativas. Los NaDES que presentaron una mayor actividad antioxidante DPPH que el etanol fueron los NaDELS#34 y NaDELS#30, mientras que en la actividad antioxidante FRAP, los NaDELS#33, NaDELS#30 y NaDELS#34 presentaron mayor capacidad. Sin embargo, el NaDELS#31 mostró la menor actividad antioxidante en DPPH y FRAP. La correlación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante de DPPH fue alta ($R = 0.95$), pero moderada en la actividad antioxidante FRAP ($R = 0.56$).

5.2. Recomendaciones

Al realizar combinaciones de NaDES, se recomienda analizar las proporciones molares, capacidad de solvatación, contenido de agua y el tipo de compuesto bioactivo que se desea extraer.

Se recomienda evaluar el extracto NaDELS#33 para determinar los metabolitos que interactúan en el ensayo FRAP para futuras aplicaciones.

Para optimizar la extracción, se recomienda mejorar el proceso de filtración de los extractos.

Se sugiere llevar a cabo un análisis más detallado de las estructuras moleculares en las combinaciones de NaDELS #30, NaDELS #33 y NaDELS34, para determinar los grupos funcionales que interactúan para la formación de puentes de hidrógeno.

En las aplicaciones industriales, se recomienda realizar un estudio de las propiedades térmicas de los NaDES reportados en esta investigación. Esto implica llevar a cabo análisis termogravimétrico y calorimétrico para determinar la temperatura de almacenamiento de los solventes, es decir, la temperatura a la cual ocurre su degradación y cristalización.

REFERENCIAS

1. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*. Elsevier B.V.; 2021. pp. 200–214. doi:10.1016/j.crfs.2021.03.011
2. Albuquerque BR, Heleno SA 8., Oliveira MBPP, Barros L, Ferreira ICFR. phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food and Function*. Royal Society of Chemistry; 2021. pp. 14–29. doi:10.1039/d0fo02324h
3. Dewi SR, Stevens LA, Pearson AE, Ferrari R, Irvine DJ, Binner ER. Investigating the role of solvent type and microwave selective heating on the extraction of phenolic compounds from cacao (*Theobroma cacao* L.) pod husk. *Food and Bioproducts Processing*. 2022;134: 210–222. doi: 10.1016/j.fbp.2022.05.011
4. Boungo Teboukeu G, Tonfack Djikeng F, Klang MJ, Houketchang Ndomou S, Karuna MSL, Womeni HM. Polyphenol antioxidants from cocoa pods: Extraction optimization, effect of the optimized extract, and storage time on the stability of palm olein during thermoxidation. *J Food Process Preserv*. 2018;42. doi:10.1111/jfpp.13592
5. Bochi VC, Barcia MT, Rodrigues D, Speroni CS, Giusti MM, Godoy HT. Polyphenol extraction optimisation from Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. *Food Chem*. 2014;164: 347–354. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2014.05.031
6. Campos-Vega R, Nieto-Figueroa KH, Oomah BD. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends Food Sci Technol*. 2018;81: 172–184. doi: 10.1016/J.TIFS.2018.09.022
7. Sekharan TR, Chandira RM, Tamilvanan S, Rajesh SC, Venkateswarlu BS. Deep eutectic solvents as an alternate to other harmful solvents. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. AMG Transcend Association; 2022. pp. 847–860. doi:10.33263/BRIAC121.847860
8. Shishov A, Bulatov A, Locatelli M, Carradori S, Andruch V. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review. *Microchemical Journal*. Elsevier Inc.; 2017. pp. 33–38. doi: 10.1016/j.microc.2017.07.015
9. Ali Redha A. Review on extraction of phenolic compounds from natural sources using green deep eutectic solvents. *J Agric Food Chem*. 2021;69: 878–912. doi: 10.1021/acs.jafc.0c06641
10. Tomé LIN, Baião V, da Silva W, Brett CMA. Deep eutectic solvents for the production and application of new materials. *Applied Materials Today*. Elsevier Ltd; 2018. pp. 30–50. doi: 10.1016/j.apmt.2017.11.005
11. Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Tambyrajah V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*. 2003; 70–71. doi:10.1039/b210714g
12. Hansen BB, Spittle S, Chen B, Poe D, Zhang Y, Klein JM, et al. Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chemical Reviews*. American Chemical Society; 2021. pp. 1232–1285. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00385
13. Fernández M de los Á, Boiteux J, Espino M, Gomez FJV, Silva MF. Natural deep eutectic solvents-mediated extractions: The way forward for sustainable analytical developments.

- Analytica Chimica Acta. Elsevier B.V.; 2018. pp. 1–10. doi: 10.1016/j.aca.2018.07.059
14. Choi YH, van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IWCE, et al. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol.* 2011;156: 1701–1705. doi:10.1104/pp.111.178426
 15. Zuo J, Geng S, Kong Y, Ma P, Fan Z, Zhang Y, et al. Current Progress in Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Active Components from Plants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry.* Taylor and Francis Ltd.; 2023. pp. 177–198. doi:10.1080/10408347.2021.1946659
 16. Zhou M, Fakayode OA, Li H. Green Extraction of Polyphenols via Deep Eutectic Solvents and Assisted Technologies from Agri-Food By-Products. *Molecules.* 2023;28. doi:10.3390/molecules28196852
 17. Fernández M de los Á, Boiteux J, Espino M, Gomez FJV, Silva MF. Natural deep eutectic solvents-mediated extractions: The way forward for sustainable analytical developments. *Analytica Chimica Acta.* Elsevier B.V.; 2018. pp. 1–10. doi: 10.1016/j.aca.2018.07.059
 18. Durand E, Lecomte J, Upasani R, Chabi B, Bayrasy C, Baréa B, et al. Evaluation of the ROS Inhibiting Activity and Mitochondrial Targeting of Phenolic Compounds in Fibroblast Cells Model System and Enhancement of Efficiency by Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) Formulation. *Pharm Res.* 2017;34: 1134–1146. doi:10.1007/s11095-017-2124-4
 19. Rojo-Poveda O, Barbosa-Pereira L, Zeppa G, Stévigny C. Cocoa bean shell—a by-product with nutritional properties and biofunctional potential. *Nutrients.* MDPI AG; 2020. doi:10.3390/nu12041123
 20. FAOSTAT. Data of Crops and Livestock Products 2020. In: *Crops and livestock products* [Internet]. 24 Sep 2023 [cited 23 Sep 2023]. Available: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
 21. Ouattara LY, Kouassi EKA, Soro D, SY, Yao KB, AK, Drogui AP,, Tyagi DR, and APM. Cocoa_Pod_Husks_Renewable_Value_added_Product. *Bioresources.* 2021;16(1): 1988–2020. Available: <https://bioresources.cnr.ncsu.edu/resources/cocoa-pod-husks-as-potential-sources-of-renewable-high-value-added-products-a-review-of-current-valorizations-and-future-prospects/>
 22. Porto de Souza Vandenberghe L, Kley Valladares-Diestra K, Amaro Bittencourt G, Fátima Murawski de Mello A, Sarmiento Vásquez Z, Zwiercheczewski de Oliveira P, et al. Added-value biomolecules' production from cocoa pod husks: A review. *Bioresour Technol.* 2022;344: 126252. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2021.126252
 23. Mariatti F, Gunjević V, Boffa L, Cravotto G. Process intensification technologies for the recovery of valuable compounds from cocoa by-products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* Elsevier Ltd; 2021. doi: 10.1016/j.ifset.2021.102601
 24. Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom).* BioMed Central Ltd.; 2018. doi:10.1186/s13020-018-0177-x
 25. Szczepanska N, Plotka-Wasyłka J, Rutkowska M, Shyshchak O, Bratychak M, Namiesnik J. Natural Deep Eutectic Solvents in extraction process. *Chemistry & Chemical Technology.* Ukraine; 2016 Sep.
 26. Sekharan TR, Chandira RM, Tamilvanan S, Rajesh SC, Venkateswarlu BS. Deep eutectic solvents as an alternate to other harmful solvents. *Biointerface Research in Applied*

- Chemistry. AMG Transcend Association; 2022. pp. 847–860. doi:10.33263/BRIAC121.847860
27. Yang Z. Natural Deep Eutectic Solvents and their applications in biotechnology. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2019. pp. 31–59. doi:10.1007/10_2018_67
 28. Ruesgas-Ramón M, Figueroa-Espinoza MC, Durand E. Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society; 2017. pp. 3591–3601. doi: 10.1021/acs.jafc.7b01054
 29. Manuela P, Drakula S, Cravotto G, Verpoorte R, Hruškar M, Radojčić Redovniković I, et al. Biological activity and sensory evaluation of cocoa by-products NADES extracts used in food fortification. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2020;66. doi: 10.1016/j.ifset.2020.102514
 30. Pavlović N, Jokić S, Jakovljević M, Blažić M, Molnar M. Green extraction methods for active compounds from food waste - Cocoa bean shell. *Foods*. 2020;9. doi:10.3390/foods9020140
 31. Ruesgas-Ramón M, Suárez-Quiroz ML, González-Ríos O, Baréa B, Cazals G, Figueroa-Espinoza MC, et al. Biomolecules extraction from coffee and cocoa by- and co-products using deep eutectic solvents. *J Sci Food Agric*. 2020;100: 81–91. doi:10.1002/jsfa.9996
 32. Socas-Rodríguez B, Mendiola JA, Rodríguez-Delgado MÁ, Ibáñez E, Cifuentes A. Safety assessment of citrus and olive by-products using a sustainable methodology based on natural deep eutectic solvents. *J Chromatogr A*. 2022;1669. doi:10.1016/j.chroma.2022.462922
 33. Mohd Fuad F, Mohd Nadzir M. The formulation and physicochemical properties of betaine-based natural deep eutectic solvent. *J Mol Liq*. 2022;360: 119392. doi:10.1016/j.molliq.2022.119392
 34. Cao J, Chen L, Li M, Cao F, Zhao L, Su E. Efficient extraction of proanthocyanidin from Ginkgo biloba leaves employing rationally designed deep eutectic solvent-water mixture and evaluation of the antioxidant activity. *J Pharm Biomed Anal*. 2018;158: 317–326. doi: 10.1016/j.jpba.2018.06.007
 35. Krisanti EA, Saputra K, Arif MM, Mulia K. Formulation and characterization of betaine-based deep eutectic solvent for extraction phenolic compound from spent coffee grounds. *AIP Conference Proceedings*. American Institute of Physics Inc.; 2019. doi:10.1063/1.5134604
 36. Proaño-Bolaños C, Blasco-Zúñiga A, Almeida JR, Wang L, Llumiñana MA, Rivera M, et al. Unravelling the skin secretion peptides of the gliding leaf frog, *Agalychnis spurrelli* (hylidae). *Biomolecules*. 2019;9. doi:10.3390/biom9110667
 37. Matic P, Sabljic M, Jakobek L. Validation of Spectrophotometric Methods for the Determination of Total Polyphenol and Total Flavonoid Content. *J AOAC Int*. 2017;100: 1795–1803. doi:10.5740/jaoacint.17-0066
 38. Viskupicova J, Blaskovic D, Galiniak S, Soszyński M, Bartosz G, Horakova L, et al. Effect of high glucose concentrations on human erythrocytes in vitro. *Redox Biol*. 2015;5: 381–387. doi: 10.1016/j.redox.2015.06.011
 39. Pallotta V, D'Amici GM, D'Alessandro A, Rossetti R, Zolla L. Red blood cell processing for cryopreservation: From fresh blood to deglycerolization. *Blood Cells Mol Dis*. 2012;48: 226–232. doi: 10.1016/j.bcnd.2012.02.004

40. Dai Y, van Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal Chim Acta*. 2013;766: 61–68. doi: 10.1016/j.aca.2012.12.019
41. Zhang D, Chen X, Yuan B, Yu F, Xie C, Yu S. A novel green catalytic strategy for hydration of α -pinene by a natural deep eutectic solvent. *Biomass Convers Biorefin*. 2022;12: 2267–2275. doi:10.1007/s13399-020-00789-9
42. Dai Y. Natural deep eutectic solvents and their application in natural product research and development. s.n.]; 2013.
43. Zhang M, Tian R, Han H, Wu K, Wang B, Liu Y, et al. Preparation strategy and stability of deep eutectic solvents: A case study based on choline chloride-carboxylic acid. *J Clean Prod*. 2022;345. doi: 10.1016/j.jclepro.2022.131028
44. Hammond O. *Deep Eutectic Solvents: Structure, Solvation, and Synthesis*. University of Bath. 2019.
45. Pisano PL, Espino M, Fernández M de los Á, Silva MF, Olivieri AC. Structural analysis of natural deep eutectic solvents. Theoretical and experimental study. *Microchemical Journal*. 2018;143: 252–258. doi:10.1016/j.microc.2018.08.016
46. Dai Y, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem*. 2015;187: 14–19. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.123
47. Omar KA, Sadeghi R. Database of deep eutectic solvents and their physical properties: A review. *Journal of Molecular Liquids*. Elsevier B.V.; 2023. doi:10.1016/j.molliq.2023.121899
48. Benvenuti L, Sanchez-Camargo A del P, Zielinski AAF, Ferreira SRS. NADES as potential solvents for anthocyanin and pectin extraction from *Myrciaria cauliflora* fruit by-product: In silico and experimental approaches for solvent selection. *J Mol Liq*. 2020;315. doi:10.1016/j.molliq.2020.113761
49. Abbott AP, Capper G, Gray S. Design of improved deep eutectic solvents using hole theory. *ChemPhysChem*. 2006;7: 803–806. doi:10.1002/cphc.200500489
50. Jurić T, Uka D, Holló BB, Jović B, Kordić B, Popović BM. Comprehensive physicochemical evaluation of choline chloride-based natural deep eutectic solvents. *J Mol Liq*. 2021;343. doi:10.1016/j.molliq.2021.116968
51. El Achkar T, Fourmentin S, Greige-Gerges H. Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds. *Journal of Molecular Liquids*. Elsevier B.V.; 2019. doi:10.1016/j.molliq.2019.111028
52. Abbott AP, Harris RC, Ryder KS. Application of hole theory to define ionic liquids by their transport properties. *Journal of Physical Chemistry B*. 2007;111: 4910–4913. doi:10.1021/jp0671998
53. Shah D, Mjalli FS. Effect of water on the thermo-physical properties of Reline: An experimental and molecular simulation based approach. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2014;16: 23900–23907. doi:10.1039/c4cp02600d
54. Mitar A, Panić M, Prlić Kardum J, Halambek J, Sander A, Zagajski Kučan K, et al. Physicochemical properties, cytotoxicity, and antioxidative activity of natural deep eutectic solvents containing organic acid. *Chem Biochem Eng Q*. 2019;33: 1–18. doi:10.15255/CABEQ.2018.1454
55. Hayyan A, Mjalli FS, Alnashef IM, Al-Wahaibi YM, Al-Wahaibi T, Hashim MA. Glucose-

- based deep eutectic solvents: Physical properties. *J Mol Liq.* 2013;178: 137–141. doi:10.1016/j.molliq.2012.11.025
56. Skulcova A, Russ A, Jablonsky M, Sima J. The pH Behavior of Seventeen Deep Eutectic Solvents. *Bioresources.* 2018; 5042–5051. doi:10.15376/biores.13.3.5042-5051
 57. Joseph J, Jemmis ED. Red-, blue-, or no-shift in hydrogen bonds: A unified explanation. *J Am Chem Soc.* 2007;129: 4620–4632. doi:10.1021/ja067545z
 58. Zahrina I, Mulia K, Yanuar A, Nasikin M. Molecular interactions in the betaine monohydrate-polyol deep eutectic solvents: Experimental and computational studies. *J Mol Struct.* 2018;1158: 133–138. doi:10.1016/j.molstruc.2017.11.064
 59. Albertini B, Bertoni S, Sangiorgi S, Nucci G, Passerini N, Mezzina E. NaDES as a green technological approach for the solubility improvement of BCS class II APIs: An insight into the molecular interactions. *Int J Pharm.* 2023;634. doi:10.1016/j.ijpharm.2023.122696
 60. Isabel Landim Neves M, Socas-Rodríguez B, Valdés A, Keven Silva E, Cifuentes A, Angela A. Meireles M, et al. Synergic effect of natural deep eutectic solvent and high-intensity ultrasound on obtaining a ready-to-use genipin extract: Crosslinking and anti-neurodegenerative properties. *Food Chem X.* 2022;16. doi:10.1016/j.fochx.2022.100489
 61. Huang W, He X, Wu J, Ma X, Han J, Wang L, et al. The evaluation of deep eutectic solvents and ionic liquids as cosolvents system for improving cellulase properties. *Ind Crops Prod.* 2023;197. doi:10.1016/j.indcrop.2023.116555
 62. Santana-Mayor Á, Socas-Rodríguez B, Rodríguez-Ramos R, Herrera-Herrera A V., Rodríguez-Delgado MÁ. Application of Natural Deep Eutectic Solvents for the extraction of plasticizers in laying hen and goat feed. *Microchemical Journal.* 2023;193. doi:10.1016/j.microc.2023.109072
 63. Gertrudes A, Craveiro R, Eltayari Z, Reis RL, Paiva A, Duarte ARC. How Do Animals Survive Extreme Temperature Amplitudes? the Role of Natural Deep Eutectic Solvents. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering.* American Chemical Society; 2017. pp. 9542–9553. doi:10.1021/acssuschemeng.7b01707
 64. Hayyan M, Mbous YP, Looi CY, Wong WF, Hayyan A, Salleh Z, et al. Natural Deep Eutectic Solvents: cytotoxic profile. *Springerplus.* 2016;5. doi:10.1186/s40064-016-2575-9
 65. Hayyan M, Hashim MA, Al-Saadi MA, Hayyan A, AlNashef IM, Mirghani MES. Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere.* 2013;93: 455–459. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.05.013
 66. Cornmell RJ, Winder CL, Tiddy GJT, Goodacre R, Stephens G. Accumulation of ionic liquids in *Escherichia coli* cells. *Green Chemistry.* 2008;10: 836–84. doi:10.1039/b807214k
 67. Macário IPE, Oliveira H, Menezes AC, Ventura SPM, Pereira JL, Gonçalves AMM, et al. Cytotoxicity profiling of deep eutectic solvents to human skin cells. *Sci Rep.* 2019;9. doi:10.1038/s41598-019-39910-y
 68. García MT, Bautista E, de la Fuente A, Pérez L. Cholinium-Based Ionic Liquids as Promising Antimicrobial Agents in Pharmaceutical Applications: Surface Activity, Antibacterial Activity and Ecotoxicological Profile. *Pharmaceutics.* 2023;15. doi:10.3390/pharmaceutics15071806
 69. Gal N, Malferarri D, Kolusheva S, Galletti P, Tagliavini E, Jelinek R. Membrane interactions of ionic liquids: possible determinants for biological activity and toxicity. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2012;1818: 2967–2974. doi:10.1016/j.bbamem.2012.07.025

70. Hayyan M, Looi CY, Hayyan A, Wong WF, Hashim MA. In vitro and in vivo toxicity profiling of ammonium-based deep eutectic solvents. *PLoS One*. 2015;10. doi:10.1371/journal.pone.0117934
71. Demey HE, Daelemans RA, Verpooten GA, De Broe ME, Van Campenhout CM, Lakiere E V, et al. Intensive Care Medicine Propylene glycol-induced side effects during intravenous nitroglycerin therapy. *Intensive Care Med*. 1988.
72. Wilson KC, Reardon C, Theodore AC, Farber HW. Propylene glycol toxicity: A severe iatrogenic illness in ICU patients receiving IV benzodiazepines: A case series and prospective, observational pilot study. *Chest*. 2005;128: 1674–1681. doi:10.1378/chest.128.3.1674
73. Hiro Takumitsu. Studies on the osmotic fragility of erythrocytes influenced by a metabolic. *Japanese Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*. 1982;31: 279–290. doi:https://doi.org/10.7600/jspfsm1949.31.279
74. Pohanka M. D-Lactic Acid as a Metabolite: Toxicology, Diagnosis, and Detection. *Biomed Res Int*. 2020;2020. doi:10.1155/2020/3419034
75. Chandel S, Pathania AR. An insight into the advances in ionic liquids and its applications in medicine. *Mater Today Proc*. 2023. doi:10.1016/j.matpr.2023.09.105
76. Wen Q, Chen JX, Tang YL, Wang J, Yang Z. Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents. *Chemosphere*. 2015;132: 63–69. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.02.061
77. Gabriele F, Chiarini M, Germani R, Tiecco M, Spreti N. Effect of water addition on choline chloride/glycol deep eutectic solvents: Characterization of their structural and physicochemical properties. *J Mol Liq*. 2019;291. doi:10.1016/j.molliq.2019.111301
78. Benítez-Correa E, Bastías-Montes JM, Acuña-Nelson S, Muñoz-Fariña O. Effect of choline chloride-based deep eutectic solvents on polyphenols extraction from cocoa (*Theobroma cacao* L.) bean shells and antioxidant activity of extracts. *Curr Res Food Sci*. 2023;7. doi:10.1016/j.crfs.2023.100614
79. Nsor-Atindana J, Zhong F, Mothibe KJ, Bangoura ML, Lagnika C. Quantification of total polyphenolic content and antimicrobial activity of cocoa (*Theobroma cacao* L.) Bean shells. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2012;11: 574–579. doi:10.3923/pjn.2012.672.677
80. Vorobyova V, Vasylyev G, Skiba M, Frolenkova S, Zaporozhets J, Gnatko O, et al. Green extraction of phenolic compounds from grape pomace by deep eutectic solvent extraction: physicochemical properties, antioxidant capacity. *Chemical Papers*. 2023;77: 2447–2458. doi:10.1007/s11696-022-02635-w
81. Zannou O, Koca I. Greener extraction of anthocyanins and antioxidant activity from blackberry (*Rubus* spp) using natural deep eutectic solvents. *LWT*. 2022;158. doi:10.1016/j.lwt.2022.113184
82. Utami RR, Armunanto R, Rahardjo S, Supriyanto. Effects of cocoa bean (*Theobroma cacao* L.) fermentation on phenolic content, antioxidant activity and functional group of cocoa bean shell. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2016;15: 948–953. doi:10.3923/pjn.2016.948.953
83. Okiyama DCG, Soares ID, Cuevas MS, Crevelin EJ, Moraes LAB, Melo MP, et al. Pressurized liquid extraction of flavanols and alkaloids from cocoa bean shell using ethanol as solvent. *Food Research International*. 2018;114: 20–29. doi:10.1016/j.foodres.2018.07.055

84. Ivanović M, Grujić D, Cerar J, Razboršek MI, Topalić-Trivunović L, Savić A, et al. Extraction of Bioactive Metabolites from *Achillea millefolium* L. with Choline Chloride Based Natural Deep Eutectic Solvents: A Study of the Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Antioxidants*. 2022;11. doi:10.3390/antiox11040724
85. Zannou O, Pashazadeh H, Galanakis CM, Alamri AS, Koca I. Carboxylic acid-based deep eutectic solvents combined with innovative extraction techniques for greener extraction of phenolic compounds from sumac (*Rhus coriaria* L.). *J Appl Res Med Aromat Plants*. 2022;30. doi:10.1016/j.jarmap.2022.100380
86. Djama M, Benhaddad L, Idir B, Achoui N, Daifallah H. Synergistic corrosion inhibition effect of copolymer and an amphoteric surfactant on carbon steel in 3.5 NaCl solution: experimental and theoretical research. *Journal of Solid State Electrochemistry*. 2023. doi:10.1007/s10008-023-05456-3
87. WU Hai-long HJLX. Synthesis and characterization of cocamidopropyl betaine. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*. 2014. Doi: 10.13218/j.cnki.csd.2014.01.006
88. Aytimur A, Koçyilit S, Uslu I, Gökmeşe F. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol based copolymers as wound dressing fibers. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2015;64: 111–116. doi:10.1080/00914037.2014.891118
89. Song LX, Du FY, Guo XQ, Pan SZ. Formation, characterization and thermal degradation behavior of a novel tricomponent aggregate of β -cyclodextrin, ferrocene, and polypropylene glycol. *Journal of Physical Chemistry B*. 2010;114: 1738–1744. doi:10.1021/jp910633j
90. Rusli NS, Embong Z, Hashim ZN, Muhammad N, Wahab AA, Jafery KM, et al. Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis for O-H, C-H and C-O Functional Group in Major Carrier Solvents of Raw E-Cigarette Liquids (PG and VG). Kelantan, Malaysia; 2022 May.
91. Mulia K, Krisanti E, Nasruddin, Libriandy E. Betaine-based deep eutectic solvents with diol, acid and amine hydrogen bond donors for carbon dioxide absorption. *Journal of Physics: Conference Series*. Institute of Physics Publishing; 2019. doi:10.1088/1742-6596/1295/1/012039
92. Nybacka L. FTIR spectroscopy of glucose. 2016 Oct. Available: <http://www.teknat.uu.se/student>
93. Medhat Ibrahim MAHE-HAFJA de L. Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. *Ecletica quimica*. 2006;31.
94. Max JJ, Chapados C. Glucose and fructose hydrates in aqueous solution by IR spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A*. 2007;111: 2679–2689. doi:10.1021/jp066882r
95. Ivanov-Omskii VI. Characteristics of hydrogen bonds in D-glucose. *Technical Physics Letters*. 2014;40: 690–692. doi:10.1134/S1063785014080215
96. Gupta A, Pal AK, Woo EM, Katiyar V. Effects of amphiphilic chitosan on stereocomplexation and properties of poly(lactic acid) nano-biocomposite. *Sci Rep*. 2018;8. doi:10.1038/s41598-018-22281-1
97. Tang W, Wang B, Li J, Li Y, Zhang Y, Quan H, et al. Facile pyrolysis synthesis of ionic liquid capped carbon dots and subsequent application as the water-based lubricant additives. *J Mater Sci*. 2019;54: 1171–1183. doi:10.1007/s10853-018-2877-0

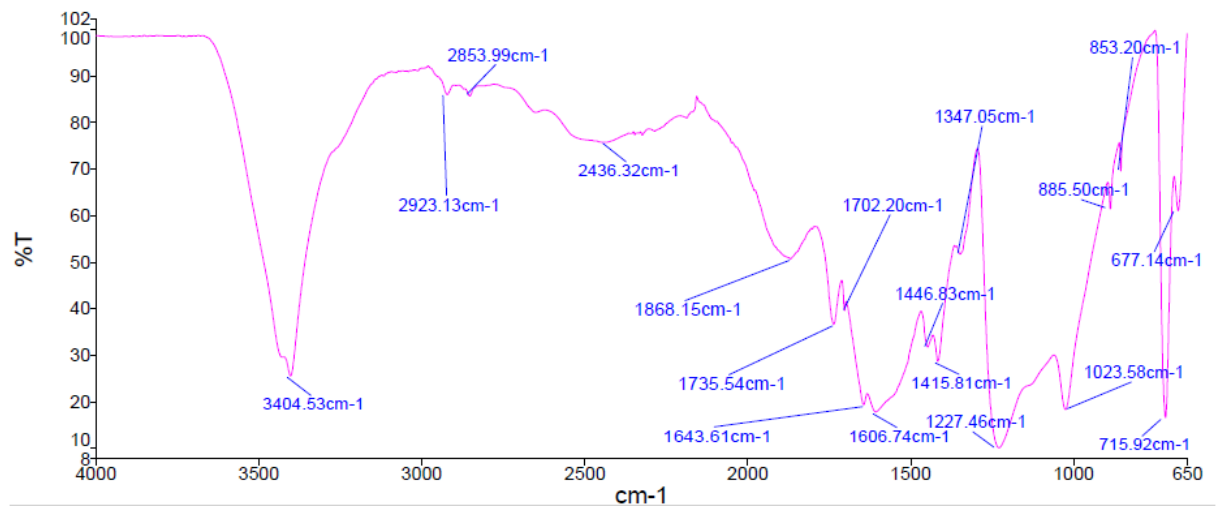
98. Hoyos Torres Sebastián. Síntesis y caracterización de ácido poli l-láctico de bajo peso molecular para aplicaciones biomédicas. Escuela de Ingeniería Química , Universidad del Valle. 2012.
99. Zakariyah RF, Ojo MO, Ajijolakewu KA, Saliu KB, Ahmed RN, Agbabiaka TO, et al. Optimisation of Lactic Acid Fermentation from Cassava Peel by *Lactobacillus casei* (ATCC334). *Microbiol Res J Int.* 2021; 29–42. doi:10.9734/mrji/2021/v31i630325
100. Hayyan M, Abo-Hamad A, AlSaadi MAH, Hashim MA. Functionalization of graphene using deep eutectic solvents. *Nanoscale Res Lett.* 2015;10. doi:10.1186/s11671-015-1004-2
101. Saifuddin N, Refal H, Kumaran P. Rapid purification of glycerol by-product from biodiesel production through combined process of microwave assisted acidification and adsorption via chitosan immobilized with yeast. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology.* 2014;7: 593–602. doi:10.19026/rjaset.7.295
102. Wang Y, Hu Y, Wang H, Tong M, Gong Y. Green and enhanced extraction of coumarins from *Cortex Fraxini* by ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction. *J Sep Sci.* 2020;43: 3441–3448. doi:10.1002/jssc.202000334

ANEXO

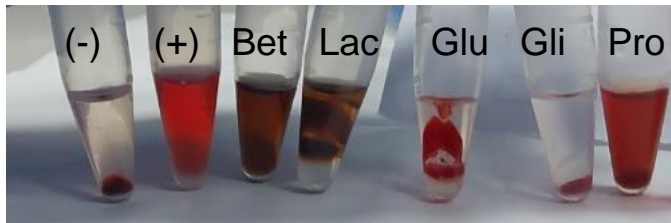
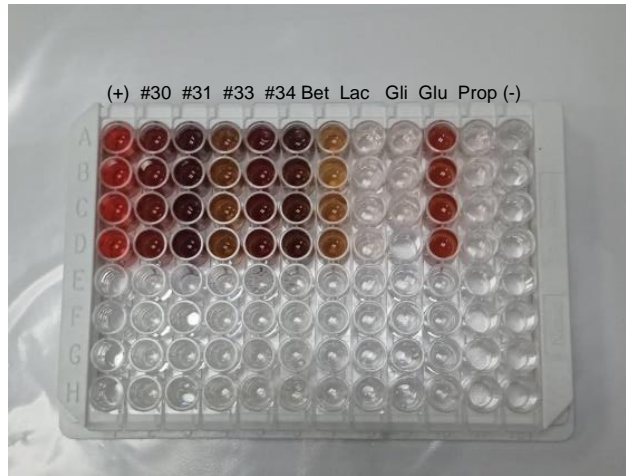
Anexo 1. Apariencia visual de las muestras después de 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente



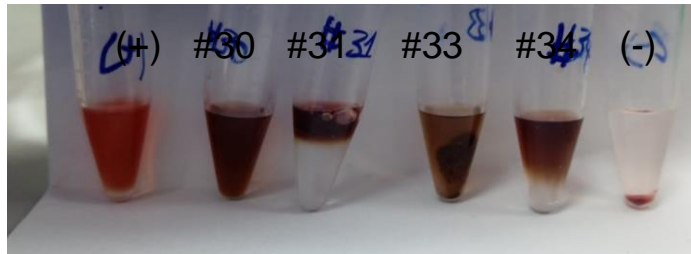
Anexo 2. Espectro infrarrojo de los cristales precipitados del NaDELs# 32



Anexo 3. Ensayo de hemólisis de los líquidos eutécticos profundos naturales. Componentes por separados / mezclas



Ensayo de hemólisis de los componentes de los NaDES
 Bet= betaína, lac= ácido láctico , glu= glucosa , gli = glicerol , pro = propilenglicol.



Ensayo de hemólisis de las mezclas de los NaDES.
 NaDELS#30 - Betaína: propilenglicol, NaDELS#31 - Betaína: glucosa,
 NaDELS#33 - Betaína: ácido láctico, NaDELS#34 - Betaína: glicerol.

Anexo 4 Consentimiento informado para la extracción de sangre humana

 Universidad Regional Amazónica	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EXTRACCIÓN DE SANGRE	
		PAG. 1/2

HOJA DE INFORMACIÓN

Este documento sirve para que el estudiante autorice la extracción de sangre, muestra que será utilizada ÚNICAMENTE con fines de investigación.


La venopunción es la técnica por lo cual se perfora una vena por vía transcutánea con una aguja o catéter; el objetivo de este procedimiento es la extracción de sangre para su posterior análisis.

Este procedimiento tiene como objetivo utilizar la muestra para el posterior análisis en las prácticas de laboratorio.

El protocolo de recolección de muestra de sangre se lo realiza en una vena visible o palpable en la región del antebrazo, procediendo a la extracción de la sangre con debidas medidas de asepsia y antisepsia.

En algunas ocasiones se pueden producir algunos riesgos con este procedimiento como son:

- Un ligero sangrado, será necesario esperar a que cese.
- Aparición de un ligero hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel), lo que comúnmente se denomina "morado", el mismo que se resolverá sin tratamiento al cabo de algunos días.
- Riesgo leve de infección.
- En casos difíciles de extracción de sangre serán necesarias otras punciones adicionales. ● La cantidad total de sangre que se extraiga estará a criterio de cada docente responsable, el cual guiará la práctica de laboratorio.

	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EXTRACCIÓN DE SANGRE	
		PAG.2/2

Certificado de consentimiento

Fecha: 24 de Mayo del 2023

Docente responsable: PhD. Ery Fukushima

Nombre del alumno: Kevin Jonier Merizalde Toro C.C: 2200122030


Se me ha solicitado dar mi consentimiento para que me realicen la extracción de sangre. Reconozco que me han INFORMADO de manera amplia, precisa, clara y sencilla sobre los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre. Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida. Conozco el alcance de los riesgos. Firmo este consentimiento, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión. AUTORIZO a la persona encargada la toma de la muestra. La Coordinación de Laboratorios NO tendrá NINGUNA responsabilidad sobre este procedimiento.



Firma del docente



Firma del alumno

	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EXTRACCIÓN DE SANGRE	
		PAG.2/2

Certificado de consentimiento

Fecha: 22 de Mayo del 2023

Docente responsable: Ph.D. Ery Fukushima

Nombre del alumno: Roberth Vinicio Reyes Shiguango C.C: 2100849682

Se me ha solicitado dar mi consentimiento para que me realicen la extracción de sangre. Reconozco que me han INFORMADO de manera amplia, precisa, clara y sencilla sobre los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre. Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida. Conozco el alcance de los riesgos. Firmo este consentimiento, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión. AUTORIZO a la persona encargada la toma de la muestra. La Coordinación de Laboratorios NO tendrá NINGUNA responsabilidad sobre este procedimiento.



Firma del docente



Firma del alumno

	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EXTRACCIÓN DE SANGRE	
		PAG.2/2

Certificado de consentimiento

Fecha: 30 de Mayo del 2023


Docente responsable: PhD. Ery Fukushima

Nombre del alumno: Jefferson Pastuña.....C.C: 0504058371.....

Se me ha solicitado dar mi consentimiento para que me realicen la extracción de sangre. Reconozco que me han INFORMADO de manera amplia, precisa, clara y sencilla sobre los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre. Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida. Conozco el alcance de los riesgos. Firmo este consentimiento, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión. AUTORIZO a la persona encargada la toma de la muestra. La Coordinación de Laboratorios NO tendrá NINGUNA responsabilidad sobre este procedimiento.

Firma del docente

Firma del alumno

	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EXTRACCIÓN DE SANGRE	
		PAG. 2/2

Certificado de consentimiento

Fecha: 12 de Junio del 2023

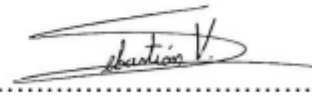
Docente responsable: Ph.D. Ery Fukushima

Nombre del alumno: Sebastián Valencia..... C.C: 1753001427.....

Se me ha solicitado dar mi consentimiento para que me realicen la extracción de sangre. Reconozco que me han INFORMADO de manera amplia, precisa, clara y sencilla sobre los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre. Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida. Conozco el alcance de los riesgos. Firmo este consentimiento, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión. AUTORIZO a la persona encargada la toma de la muestra. La Coordinación de Laboratorios NO tendrá NINGUNA responsabilidad sobre este procedimiento.



Firma del docente

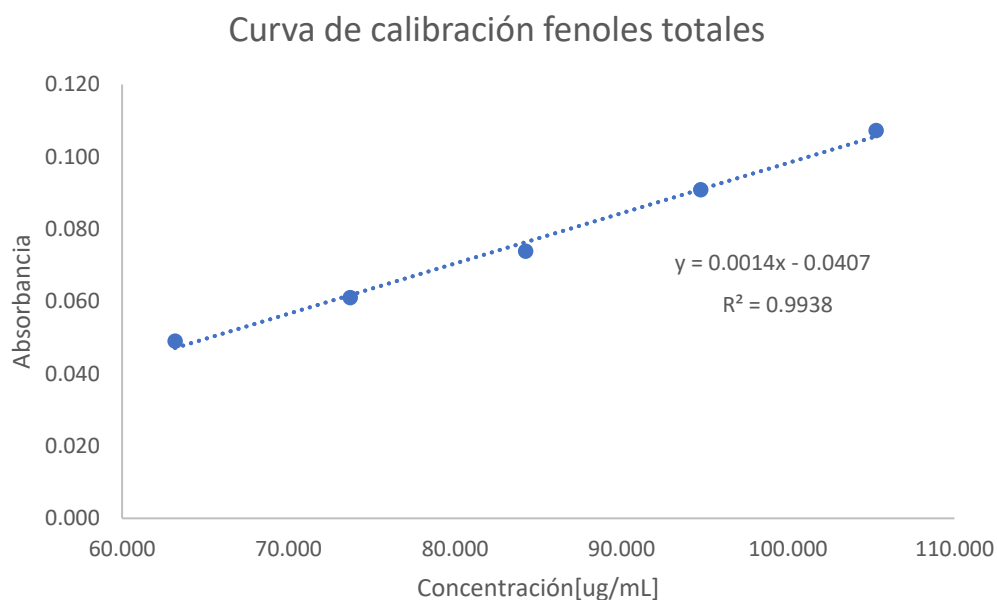


Firma del alumno

Anexo 5 Extractos de residuos de cacao con NaDES y solvente convencional



Anexo 6. Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales presentes en el extracto con residuos de cacao en concentraciones 60-100 [ug/mL]



Anexo 7. Contenido de fenoles totales de los extractos con NaDES y etanol

Extractos	Polifenoles*		
NaDELS# 30	18.42	±	0.973 ^a
NaDELS# 31	9.86	±	0.578 ^d
NaDELS# 33	12.98	±	0.541 ^c
NaDELS# 34	19.53	±	1.234 ^a
Etanol-Agua	14.67	±	0.968 ^b

*Los resultados son expresados en mg equivalente de ácido gálico (EAG) /g residuos secos de cacao (RSC). Los valores que tienen diferentes letras presentan diferencias significativas (p<0.05).

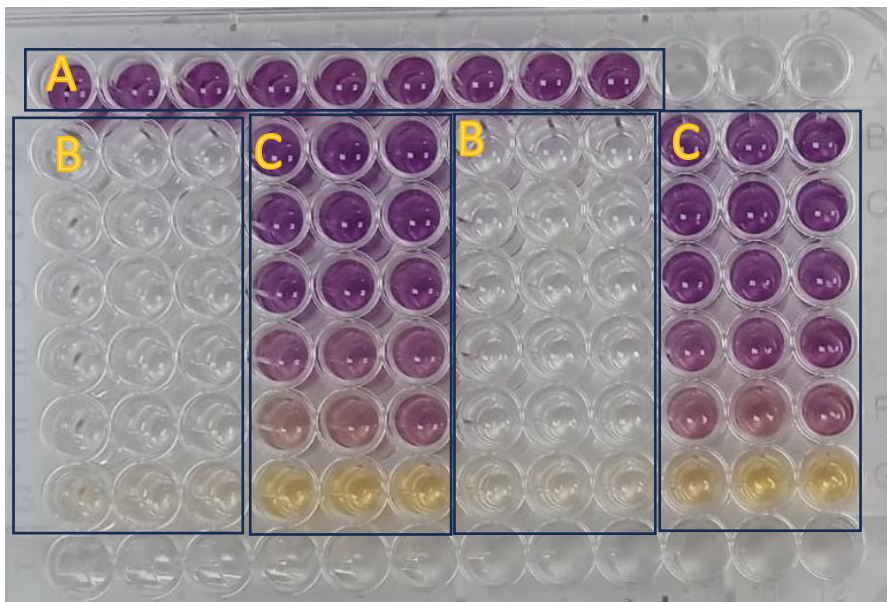
Realizado por: Encalada, 2023.

Anexo 8. Actividad antioxidante DPPH y FRAP de los extractos con NaDES y solvente convencional

EXTRACTOS	DPPH*		FRAP*	
	[$\mu\text{mol trolox/g}$]		[$\mu\text{moles Fe}^{2+}/\text{g}$]	
NaDELS# 30	103.15	\pm 4.72 ^a	216.97	\pm 8.47 ^b
NaDELS# 31	47.43	\pm 2.06 ^c	97.04	\pm 8.06 ^d
NaDELS# 33	76.69	\pm 3.45 ^b	276.91	\pm 9.79 ^a
NaDELS# 34	112.71	\pm 6.63 ^a	205.74	\pm 9.56 ^b
Solvente convencional	85.31	\pm 4.69 ^b	116.87	\pm 7.07 ^c

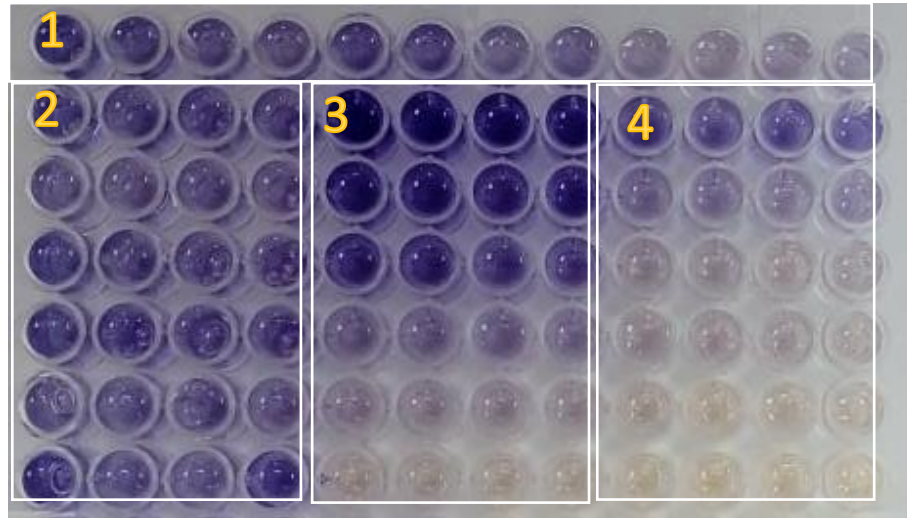
*La actividad antioxidante se determinó en (g) de residuos seco de cacao (RSC). Los valores que tienen diferentes letras presentan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Anexo 9. Actividad antioxidante DPPH del extracto NaDELS #30



- A. Solución de DPPH (Etanol + DPPH)
- B. Solución blanco de la muestra (Muestra + etanol)
- C. Solución de la muestra (Muestra + etanol + DPPH)

Anexo 10. Actividad antioxidante FRAP de los extractos con NaDES y solvente convencional



1. Solución FRAP (FRAP + agua)
2. Muestras (FRAP+ muestras)
3. Estándar (sulfato heptahidrato + FRAP)
4. Estándar (sulfato heptahidrato + FRAP)

Anexo 11. Número de onda (cm^{-1}) y modos vibracionales de los grupos funcionales de la betaína, propilenglicol y el NaDELS# 30

Grupo funcional	Número de onda [cm^{-1}]					
	Betaína	Propilenglicol	NaDELS #30	Betaína ^[86,87]	Propilenglicol ^[88-90]	NaDELS#30 ^[32,58,91]
vO-H	3356.98	3312.6	3332.73	3361	3471	3327
vC=O	1627.59	-----	1632.66	1631	-----	1631
vC-H ₃	2957.14	2970.68, 2876.32	2972.82	2954	2877, 2970	----
vC-H ₂	2924.20, 2853.99, 1466.39	2930.68	2925.86, 2855.40	2929, 2851, 1463	2929	----
N-H	1568.08	-----	1562.2	1552	-----	----
δ C-O-H	-----	-----	1330.06 - 1458.86	----	-----	1370 -1450
ρ C-H ₂	-----	1136.06	1136.50	----	1137	-----
vC-O	-----	1038.36	1041.53	----	1036	-----
vC-N	1398.01	-----	1398.21	1398	----	-----
vC-O-C	-----	921.83	922.26	----	929	-----

δ = flexión

v = tensión o estiramiento

ρ = balanceo

Anexo 12. Número de onda (cm⁻¹) y modos vibracionales de los grupos funcionales de la betaína, glucosa y el NaDELS# 31

Grupo funcional	NaDELS# 31					
	Número de onda [cm ⁻¹]					
	Betaína	Glucosa	NaDELS #31	Betaína ^[86,87]	Glucosa ^[92-95]	NaDELS#31 ^[33]
vO-H	3356.98	3277.32	3287.76	3361	3350	3251
v C=O	1627.59	-----	1630.82	1631	-----	1624
vC-H ₃	2957.14	-----	-----	2954	-----	----
vC-H ₂	2924.20, 2853.99,1466.39	2926.71	2923.71,2853.94, 1456.02	2929, 2851,1463	2930, 2885	----
N-H	1568.08	-----	1562.20	1552	-----	----
δC-O-H	-----	1360.32, 1417.19	1348.68, 1399.24	-----	1360, 1420,	----
vC-O	-----	1014.55,1076.04,1147.97	1019.78,1077.08,1149.34	-----	1025, 1076,1149	----
vC-N	1398.01		1399.24	1398	-----	----
vC-C	-----	763.19, 846.44, 925.35	762.66, 846.40, 923.37	-----	763 ,841, 917	

δ = flexión

v = tensión o estiramiento

ρ = balanceo

Anexo 13. Número de onda (cm⁻¹) y modos vibracionales de los grupos funcionales de la betaína, ácido láctico y el NaDELS# 33

NaDELS# 33

Grupo funcional	Número de onda [cm ⁻¹]					
	Betaína	Ácido láctico	NaDELS#33	Betaína ^[86,87]	Ácido láctico ^[96-99]	NaDELS#33 ^[33,80]
vO-H	3356.98	3391.11	3371.97	3361	3402.58	3375
v C=O	1627.59	1718.05	1634.19 y 1719.43	1631	1720	1616 y 1726
vC-H ₃	2957.14	2942.56, 2988.71	2988.56	2954	2943.5, 2993	----
δC-H ₃	----	1455.59	1455.76	----	1454	----
δC-H	----	1375.33	1375.38	----	1375	----
δO-H	----	1042.06	1044.09	----	1041	----
vC-H ₂	2924.20, 2853.99, 1466.39	----	2925.67, 2855.33	2929, 2851,1463	----	----
N-H	1568.08	----	----	1552	----	----
vC-O	----	1121.01	1044.09,1125.59,1226.60	----	1121	1043.49-1222.87
vC-N	1398.01	----	----	1398	----	----
vC-O-C	----	1096.28, 1210.62	1088.16,1226.60	----	1075,1218.1	----
C-C	----	868.1	868.3	----	870	823.6

δ = flexión

v = tensión o estiramiento

ρ = balanceo

Anexo 14. Número de onda (cm⁻¹)y modos vibracionales de los grupos funcionales de la betaína, glicerol y el NaDELS#34

NaDELS # 34

Grupo funcional	Número de onda [cm ⁻¹]					
	Betaína	Glicerol	NaDELS#34	Betaína[86,87]	Glicerol[50,100,101]	NaDELS#34[33,61,102]
vO-H	3356.98	3282.87	3320.29	3361	3290	3298
C=O	1627.59	----	1630.79	1631	----	1632
vC-H	2957.14	2879.57 y 2933.61	----	2954	2880, 2936	----
δO-H	----	1328.05	1328.61	----	1326	----
vC - H ₂	2924.20,2853.99,1466.39	----	2854.18, 2924.71 ,1459.18	2929, 2851, 1463	----	----
δC - H ₂	----	1415.76	----	----	1417	----
N-H	1568.08	----	1565.95	1552	----	----
δC-O-H	----	1211.01	1249.18	----	1210	----
vC-N	1398.01	----	1398.74	1398	1398	----
vC-O	----	1030.52, 1108.53	1041.58,1111.89	----	1038, 1109	----
vC-C-O	----	851.17,922.39 y 993.34	852.38, 924.62 993.58	----	851, 924 y 994	----

δ = flexión

v = tensión o estiramiento

ρ = balanceo