



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Aplicación de ultrasonidos y extracción subcrítica para la  
obtención de extractos acuosos activos de la paja de arroz.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Ivars Medina, Laura

Tutor/a: Chiralt Boix, M<sup>a</sup> Amparo

Director/a Experimental: VIEIRA DE FREITAS, PEDRO AUGUSTO

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

# APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS Y EXTRACCIÓN SUBCRÍTICA PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS ACTIVOS DE LA PAJA DE ARROZ

## RESUMEN

La paja de arroz es un residuo agroalimentario muy abundante y su gestión resulta muy problemática. Sin embargo, este subproducto contiene compuestos de gran interés que pueden obtenerse para su revalorización en el marco de un modelo de economía circular. En el presente trabajo se han obtenido extractos acuosos de la paja de arroz seca y molida (tamaño de partícula inferior a 0,5 mm) mediante tres procesos: a) tratamiento combinado con aplicación de ultrasonidos y calentamiento a reflujo, b) extracción a presión a 160 °C y c) extracción a presión a 180 °C. Cada extracto fue liofilizado y caracterizado en su contenido en fenoles mediante el método Folin-Ciocalteu, contenido en lignina, proteínas y minerales. Asimismo, se analizó la actividad antioxidante de los extractos a través de la capacidad de inhibición de los radicales ABTS y DPPH. Se determinó también la actividad antibacteriana de los extractos frente a *Escherichia coli* y *Listeria innocua* mediante el análisis de la concentración mínima inhibitoria (MIC). La extracción con agua subcrítica fue la más efectiva para la obtención de compuestos fenólicos y proporcionó extractos con mayor bioactividad. La extracción a 180 °C dio lugar a la mayor capacidad antioxidante, próxima a la de los antioxidantes típicos, como tocoferol o ácido ascórbico, y a una mayor capacidad antibacteriana. La formación de compuestos de Maillard o caramelización durante el proceso de extracción podría haber contribuido a su mayor bioactividad.

**Palabras clave:** paja de arroz; polifenoles; actividad antioxidante; actividad antibacteriana; extracción acuosa subcrítica; ultrasonidos.

# ULTRASOUND ASSISTED AND SUBCRITICAL WATER EXTRACTION TO OBTAIN ACTIVE EXTRACTS FROM RICE STRAW

## ABSTRACT

Rice straw is a highly available agri-food waste and its management is problematic. However, this subproduct contains compounds of considerable interest that can be obtained for its revalorization in order to achieve a circular economy model. In the present study, aqueous extracts were obtained from dried and milled rice straw (particle size less than 0.5 mm) by three treatments: a) combined treatment with ultrasound application and reflux heating, b) pressure extraction at 160 °C and c) pressure extraction at 180 °C. Each extract was lyophilized and characterized as to phenolic content, by the Folin-Ciocalteu method, lignin, protein and mineral content. The antioxidant activities of the extracts were also analyzed through the capacity to inhibit ABTS and DPPH radicals. The antibacterial activity of the extracts against *Escherichia coli* and *Listeria innocua* was also determined through the analysis of the minimum inhibitory concentration (MIC). Subcritical water extraction was the most effective for obtaining phenolic compounds and provided extracts with the highest bioactivity. Extraction at 180 °C resulted in the highest antioxidant capacity, close to that of typical antioxidants such as tocopherol or ascorbic acid, and higher antibacterial capacity. The formation of Maillard or caramelisation compounds during the extraction process may have contributed to its higher bioactivity.

**Keywords:** rice straw; polyphenols; antioxidant activity; antibacterial activity; subcritical aqueous extraction; ultrasound.

# APLICACIÓ D'ULTRASONS I EXTRACCIÓ SUBCRÍTICA PER A L'OBTENCIÓ D'EXTRACTES AQUOSOS ACTIUS DE LA PALLA D'ARRÒS

## RESUM

La palla d'arròs és un residu agroalimentari molt abundant i la seua gestió resulta una problemàtica. No obstant això, aquest subproducte conté compostos de gran interès que poden obtenir-se per a la seua revaloració amb la finalitat d'aconseguir un model d'economia circular. En el present treball s'han obtingut extractes aquosos de la palla d'arròs seca i molta (tamany de partícula inferior a 0,5 mm) mitjançant tres tractaments: a) tractament combinat amb aplicació d'ultrasons i escalfament a reflux, b) extracció a pressió a 160 °C i c) extracció a pressió a 180 °C. Cada extracte va ser liofilitzat i caracteritzat en el seu contingut en fenols mitjançant el mètode Folin-Ciocalteu, contingut en lignina, proteïnes i minerals. Així mateix, es va analitzar l'activitat antioxidant dels extractes a través de la capacitat d'inhibició dels radicals ABTS i DPPH. Es va determinar també l'activitat antibacteriana dels extractes contra *Escherichia coli* i *Listeria innocua* mitjançant l'anàlisi de la concentració mínima inhibidora (MIC). L'extracció amb aigua subcrítica va ser la més efectiva per a l'obtenció de compostos fenòlics i va proporcionar extractes amb major bioactivitat. L'extracció a 180 °C va donar lloc a la major capacitat antioxidant, pròxima a la dels antioxidants típics, com tocoferol o àcid ascòrbic, i a una major capacitat antibacteriana. La formació de compostos de Maillard o caramel·lització durant el procés d'extracció podria haver contribuït a la seua major bioactivitat.

**Paraules clau:** palla d'arròs; polifenols; activitat antioxidant; activitat antibacteriana; extracció aquosa subcrítica; ultrasons.

**Autora:** Ivars Medina, Laura

**Tutora:** Chiralt Boix, M<sup>a</sup> Amparo

**Director Experimental:** Vieira de Freitas, Pedro Augusto

Valencia, julio de 2023

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer en primer lugar a Amparo y a Pedro, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y aprender de ellos.

A mis compañeras y amigas de la universidad, en especial a Carla, por haber recorrido este camino juntas.

A mi familia, mamá y papá, por haberme dado la oportunidad de estudiar, por confiar en mí y apoyarme en todo lo que hago.

A Borja, por creer siempre en mí.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Paja de arroz como residuo agroalimentario .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Valoración de la paja de arroz .....</b>	<b>4</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Materia prima .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2. Obtención de extractos acuosos .....</b>	<b>11</b>
<b>3.3. Caracterización de extractos acuosos .....</b>	<b>13</b>
3.3.1. Rendimiento de la extracción .....	13
3.3.2. Contenido en lignina .....	14
3.3.3. Contenido en proteínas .....	14
3.3.4. Contenido en cenizas .....	15
3.3.5. Contenido fenólico (TPC) .....	15
3.3.6. Análisis termogravimétrico (TGA).....	15
3.3.7. Análisis espectral (UV-Vis) .....	16
3.3.8. Capacidad antioxidante (DPPH, ABTS).....	16
3.3.9. Capacidad antimicrobiana ( <i>L. innocua</i> y <i>E. coli</i> ).....	17
3.3.10. Análisis estadístico .....	17
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1. Composición de los extractos.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2. Análisis termogravimétrico (TGA) .....</b>	<b>20</b>
<b>4.3. Capacidad antioxidante .....</b>	<b>22</b>
<b>4.4. Capacidad antimicrobiana .....</b>	<b>24</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>26</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>27</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Producción mundial de arroz en cada continente (FAOSTAT, 2021). .....	1
<b>Figura 2.</b> Distribución de la producción de arroz por CCAA 2016/17(t) (MAPA, 2017). .....	2
<b>Figura 3.</b> Esquema de los procesos de extracción con fotos de los extractos y rendimiento (Freitas et al., 2022a). .....	12
<b>Figura 4.</b> Perfiles de temperatura-Presión durante el proceso de extracción con agua subcrítica a 160 y 180 °C.....	13
<b>Figura 5.</b> Espectros UV-Vis de los diferentes extractos diluidos en agua con concentración de 66 mg/L. ....	20
<b>Figura 6.</b> Análisis termogravimétrico de los diferentes extractos: curvas de pérdida de peso frente a la temperatura y su correspondiente curva derivada.....	22
<b>Figura 7.</b> Determinación de los valores de EC <sub>50</sub> de los diferentes extractos frente al radical DPPH. ....	24
<b>Figura 8.</b> Placa multipocillos inoculados con la bacteria con las diferentes concentraciones de los extractos para determinar su concentración mínima inhibitoria (MIC).....	25

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Emisiones de la quema de paja de arroz (Kaur et al., 2017). .....	3
<b>Tabla 2.</b> Rendimiento de la extracción y contenidos en lignina, proteínas, cenizas y fenoles de los diferentes extractos.....	18
<b>Tabla 3.</b> Capacidad antioxidante de los diferentes extractos evaluada a través de la capacidad para inhibir el radical DPPH (EC <sub>50</sub> : cantidad de extracto en relación a la de DPPH necesaria para reducir la concentración del radical al 50 %) y el radical ABTS (TEAC: expresada como equivalentes de TROLOX).....	23
<b>Tabla 4.</b> Concentración mínima inhibitoria de los diferentes extractos frente a <i>Listeria innocua</i> y <i>Escherichia coli</i> . ....	25



## ÍNDICE DE ABREVIACIONES

**Abs:** Absorbancia

**ABTS:** Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

**ANOVA:** Análisis de varianza

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

**DTGA:** Derivada de la pérdida de peso térmica

**EC<sub>50</sub>:** Mitad de la concentración efectiva máxima

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

**GAE:** Equivalentes de ácido gálico

**HSD:** Diferencia honestamente significativa

**MAPA:** Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

**MIC:** Concentración mínima inhibitoria

**SWE:** Extracción con agua subcrítica

**SWE-160:** Extracción con agua subcrítica a 160 °C, 7 bares

**SWE-180:** Extracción con agua subcrítica a 180 °C, 11 bares

**TEAC:** Capacidad antioxidante equivalente a Trolox

**TGA:** Análisis termogravimétrico

**TPC:** Contenido total de fenoles

**USHT:** Método de aplicación combinada de ultrasonidos y calentamiento a reflujo

**UV-Vis:** Ultravioleta-visible

**α:** Nivel de significación

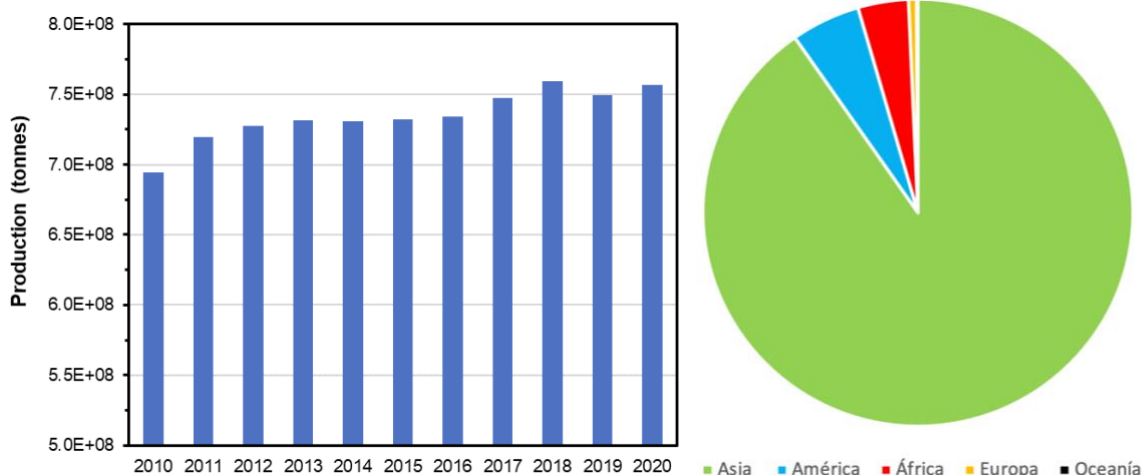
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Paja de arroz como residuo agroalimentario

El arroz (*Oryza sativa* L.) es el cultivo más importante a nivel mundial ya que proporciona un componente importante de la dieta de más de la mitad de la población (Ramos, et al., 2023). Según el pronóstico de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2021), la producción mundial de arroz en la campaña 2022/2023, se ha incrementado hasta los 516,7 millones de toneladas (arroz elaborado). Se ha de destacar que ha disminuido un 1,8% con respecto a la estimación de 2021/2022, año en el cual se alcanzó el máximo histórico de 526 millones de toneladas.

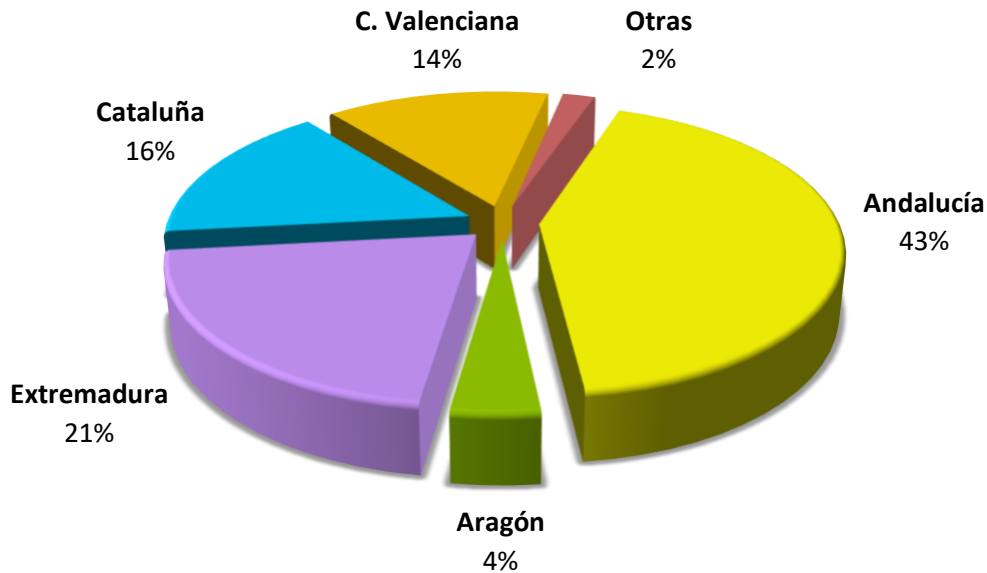
Asia es el principal productor y consumidor de arroz del mundo, con una producción total del 90% (Figura 1). Siendo los principales productores del mundo China, India, Indonesia y Bangladesh. Estos cuatro países concentran dos tercios de la producción mundial (CEPAL, 2015). Seguidamente se encuentran el continente americano y África. Por su parte, Europa representa el 0,6% de la producción mundial total (FAOSTAT, 2021).

Alrededor de dos tercios del arroz consumido en Europa se cultiva en la Unión Europea (UE), posicionándose Italia como el primer productor con un 50% de la producción total. Por su parte, España se encuentra posicionada en segundo lugar, con un 28% de producción, alrededor de 783.000 toneladas de arroz al año, y 25% de la superficie (MAPA, 2017).



**Figura 1.** Producción mundial de arroz en cada continente (FAOSTAT, 2021).

La producción de arroz en España se encuentra mayoritariamente en la comunidad autónoma de Andalucía (43%), seguida de Extremadura (21%), Cataluña (16%), Comunidad Valenciana (14%) y Aragón (4%) (Figura 2) (MAPA, 2017).



**Figura 2.** Distribución de la producción de arroz por CCAA 2016/17(t) (MAPA, 2017).

Se estima que la producción de arroz continuará aumentando debido al crecimiento exponencial de la población (FAO, 2017). Además, su demanda se ve motivada principalmente por su precio, ya que es un cereal muy económico, y por su composición nutricional, puesto que proporciona un elevado aporte energético.

El principal aprovechamiento de este cereal son sus granos, por lo que tras el cultivo y la cosecha del arroz se obtienen grandes cantidades de subproductos como son el salvado, la cascarilla y la paja. Entre estos, la paja de arroz es especialmente relevante ya que es el segundo residuo agroindustrial más producido a nivel mundial. Por cada kilogramo de grano de arroz se generan entre 1 y 1,5 kilogramo de paja (Peanparkdee & Iwamoto, 2019). Dicho de otro modo, se producen aproximadamente de 5 a 6 toneladas de paja por hectárea de arroz (CEPAL, 2015).

Al mismo tiempo, la paja de arroz es uno de los subproductos más problemáticos debido a que es un residuo difícil de gestionar por su alto costo y bajo aprovechamiento. Para gestionar este problema tradicionalmente se optaba por la quema de la paja, ya que se consideraba una práctica muy sencilla que además tenía efectos fitosanitarios, como la reincorporación de nutrientes al suelo (N, P y K) y la eliminación de esporas de hongos, de bacterias y semillas de malas hierbas (Sadh et al., 2017). Sin embargo, esta práctica conlleva problemas importantes de salubridad en las zonas cercanas a los cultivos, puesto que la quema de paja genera grandes

emisiones, en periodos de tiempo muy cortos, tales como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), metano (CH<sub>4</sub>), monóxido de carbono (CO), amoníaco (NH<sub>3</sub>), óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>), dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), hidrocarburos no metilados (NMHC), compuestos orgánicos volátiles (VOC) y partículas (Tabla 1) (Zhang et al., 2011; Jain et al., 2013). Asimismo, con la quema de paja se produce otro residuo, las cenizas, las cuales contienen sustancias cancerígenas. Consecuentemente, se genera una alta concentración de estas emisiones que puede ocasionar problemas de salud por contaminación local (Ribó et al., 2017) y resulta en enfermedades respiratorias como la bronquitis, el asma y las irritaciones oculares. La quema abierta en los campos también afecta a la fauna y a la flora del entorno. Incluso se convierte en un riesgo para la seguridad vial ya que reduce la visibilidad y aumenta el número de accidentes de tráfico (Tripathi, 2013).

Como resultado, la quema de paja ha sido restringida en muchos países del mundo. Por su parte, la Unión Europea propuso una reducción progresiva de esta práctica mediante la Política Agrícola Común (PAC) de la UE publicada en 2018, hasta erradicarla con la nueva PAC que se aplicará a partir del 1 de enero de 2023 (European Commission, 2022). Dicha legislación ha obligado a los agricultores a gestionar la retirada de miles de toneladas de residuos.

**Tabla 1.** Emisiones de la quema de paja de arroz (Kaur et al., 2017).

Contaminante	Factor emisión (g / kg materia seca)	Emisiones (giga gramo)
CO <sub>2</sub>	1.460	16.253
CH <sub>4</sub>	1,20	13
N <sub>2</sub> O	0,07	1
CO	34,70	386
NMHC	4,0	45
NO <sub>x</sub>	3,10	35
SO <sub>2</sub>	2,0	22
Partículas totales	13,0	45
PM <sub>2,5</sub>	12,95	144

Con el fin de evitar los problemas medioambientales que suponen la quema de la paja de arroz se ha considerado la opción de incorporar la paja de nuevo al campo. Esta práctica se denomina fanguero. Tras la recogida de la cosecha el suelo se somete a un laboreo a poca profundidad, que facilita trocear la paja favoreciendo su descomposición y al mismo tiempo, facilita la aireación y oxigenación. Según estudios previos (Kongchum, 2005), el fanguero supone una mejora en las condiciones del suelo y la planta, ya que es una fuente de nutrientes para el suelo que lleva a un aumento del rendimiento del arrozal. También se ha concluido que la incorporación de la paja de arroz generalmente resulta en un incremento en el rendimiento de grano de arroz, especialmente si la incorporación de paja de arroz es continua durante varias temporadas de crecimiento (Ponnamperuma, 1984). Sin embargo, esta alternativa tampoco se considera la opción más recomendable ya que genera entre 2,5 y 4,5 veces más metano que la quema de la paja de arroz (Abril et al., 2009). Asimismo, las emisiones totales de dióxido de carbono equivalente son un 18% superiores (ICTA, 2011).

Los investigadores del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA) de la Universidad Politécnica de Valencia han realizado un estudio comparativo de las emisiones de metano que se generan según el método de gestión de la paja de arroz. Los datos muestran como la peor opción es el fanguero con una emisión estacional de 418 kg/ha. A continuación, se encuentra la quema de la paja, con una emisión de 239 kg/ha, y en último lugar, la retirada del campo de la paja que produce una emisión de metano de 187 kg/ha (ICTA, 2011).

En este contexto, durante los últimos años se ha estado investigando especialmente la retirada de la paja de los campos de arroz con el fin de revalorizarla. Su composición lignocelulósica hace que la paja de arroz tenga gran variedad de usos potenciales, aunque hoy en día apenas se utiliza a nivel industrial. Se requiere la búsqueda de alternativas económicamente rentables para los agricultores de modo que se les involucre en este camino hacia una economía circular mediante la obtención de productos y procesos respetuosos con el medio ambiente.

## **1.2. Valorización de la paja de arroz**

La paja de arroz posee muchas posibilidades en cuanto a su revalorización, por lo que hoy en día hay diferentes opciones para lograr su aprovechamiento. Sin embargo, pese a los múltiples usos potenciales de este subproducto, pocas industrias son capaces de aprovecharlo. Las razones se concentran en la viabilidad económica. Para que esta práctica sea económicamente viable se

debe compensar el coste de la retirada de la paja, de modo que se obtengan beneficios mayores a los obtenidos de su incorporación a los campos o su quema.

Entre las posibilidades para la revalorización están su uso para la generación de energía, plásticos para las industrias de embalaje, como sustitutos en las fibras de hormigón, fabricación de tejidos, usos con fines alimentarios y farmacéuticos e incluso en procesos biotecnológicos. La generación de diversos productos de alto valor fortalecería la economía del sector disminuyendo a su vez el impacto ambiental. A continuación, se comentan diferentes estudios llevados a cabo con el propósito de darle un nuevo valor a este subproducto de la agricultura.

En el contexto del cambio climático y la búsqueda de fuentes alternativas de energías renovables las biorrefinerías, permiten aprovechar la biomasa (que puede ser materia prima procedente de origen agrícola, ganadero, forestal, etc.) para transformarla en un amplio espectro de productos finales como la bioenergía, biocombustibles, biofertilizantes, piensos, ingredientes alimentarios etc. (Barroso, 2010). Los procesos llevados a cabo en las biorrefinerías son similares a los de las refinerías tradicionales, pero utilizando biomasa como materia prima. Para obtener un rendimiento adecuado esta debe ser sometida a transformaciones biológicas, químicas, físicas y termoquímicas que permitan maximizar su valor. La clave para optimizar el rendimiento consiste en la obtención de productos de alto valor como compuestos químicos de interés comercial y productos de menor valor, pero obtenidos en cantidades relevantes, como los biocombustibles. Los biocombustibles de segunda generación utilizan biomasa para su producción, cumpliendo con los requisitos establecidos en las normas ASTM D6751 y EN 14214 (Milano, et al., 2018). Dentro de este grupo se encuentra la producción de bioetanol a partir de los residuos agroindustriales de la paja de arroz, que resulta prometedora por ser un residuo vegetal no comestible y, por tanto, no compite con la producción de alimentos, y tiene una gran disponibilidad, al ser uno de los residuos lignocelulósicos más abundante en el mundo. Posee un alto contenido de celulosa y hemicelulosa que podrían hidrolizarse enzimáticamente en azúcares fermentables para la producción de bioetanol (Sticklen, 2008). Sin embargo, posee un alto contenido en lignina y cenizas, que dificulta la obtención de azúcares, por lo que se está trabajando para desarrollar un método eficiente para disminuir estos compuestos (Abedinifar et al., 2009). Pese a ello, se considera que la paja de arroz es una opción prometedora para la creación de bioetanol (Binod et al., 2010).

Otro uso alternativo de la paja de arroz es su aplicación como acolchado en los suelos agrícolas. Los acolchados consisten en residuos vegetales formados naturalmente (Turney & Menge, 1994), o de material sintético (Robinson, 1988), aplicados al suelo. Estos acolchados mejoran la

productividad del cultivo en fruticultura y horticultura con lo que se obtienen beneficios directos e indirectos, como la disminución de malas hierbas y el control de insectos perjudiciales, evitando el uso de plaguicidas (Visconti et al., 2021) y mejorando la calidad de los suelos con el aumento del contenido de materia orgánica y la mejora de la microporosidad que, a su vez, aumenta la capacidad de filtración y retención del agua de lluvia en el suelo (Mulumba & Lal, 2008; Jordán et al., 2010).

En esta línea, también se pueden preservar los suelos mediante el uso de paja de arroz como compost (FAO, 2015), lo cual aumenta la capacidad de retención de humedad de los suelos, evita su erosión y aporta nutrientes y microorganismos beneficiosos para el ciclo biológico (Valencia Huancas, 2018). Además, debido a su alto contenido en silicio, la paja de arroz tiene propiedades muy interesantes por los múltiples beneficios de este compuesto en agricultura (Quero, 2008), favoreciendo la acción de otros elementos como fósforo (P), potasio (K) y zinc (Zn), a la vez reduce la incidencia y severidad de enfermedades y plagas en los cultivos (Furcal & Herrera, 2013). El proyecto denominado LIFE BIOCOMPOST (European Commission, 2004) del Ayuntamiento de Valencia concluyó que el compost paja-lodos de depuradora posee un contenido de materia orgánica, nitrógeno, fósforo y potasio muy interesante, pero habría que eliminar los metales pesados para su uso como fertilizante orgánico (Abril et al., 2009). También se ha compostado la paja de arroz con restos vegetales obtenidos en Mercavalencia ofreciendo resultados prometedores para obtener un compost de calidad (Blay et al., 2018).

Otros estudios pretenden la optimización del proceso de separación de compuestos de interés de la paja de arroz, como sus compuestos de naturaleza fenólica con actividad antioxidante, antimicrobiana o beneficiosa para la salud que podrían tener aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica o cosmética (Freitas et al., 2022a), así como la fracción celulósica (Freitas et al., 2023a). Aproximadamente 180 mil millones de toneladas de celulosa son producidas al año en todo el mundo por las plantas. La celulosa representa alrededor del 15-30% de las paredes primarias de las plantas y hasta el 40% de las secundarias, donde se presenta en forma de microfibrillas. Este polisacárido es por tanto el más abundante en la naturaleza y, debido a su alta disponibilidad, su biocompatibilidad, biodegradabilidad y su firmeza, es considerado por la industria un biopolímero de origen renovable muy prometedor (Sticklen, 2008). Los materiales basados en celulosa y sus derivados se pueden utilizar en productos sostenibles para usos médicos, farmacéuticos, aditivos alimentarios, envases (Bangar et al., 2023), papel (Mousavi et al., 2013) o materiales de aislamiento térmico (Panyakaew & Fotios,

2011), entre otros. Sin embargo, cabe mencionar algunas desventajas de su obtención, como son los elevados costes y bajos márgenes de beneficios.

La extracción de fracciones celulósicas como las fibras de celulosa (FC), la celulosa microfibrilada (CMF), la celulosa nanofibrilada (CNF) y los nanocristales de celulosa (CNC), provenientes de residuos y subproductos de origen agroalimentario, como la paja de arroz, han sido objeto de estudio durante los últimos años (Freitas et al., 2022b). El proceso de aislamiento de la fracción celulósica consiste en la eliminación de componentes no celulósicos y/o regiones amorfas de las fracciones celulósicas. Estos componentes incluyen hemicelulosa, lignina, ceras, proteínas, azúcares y cenizas (Boonterm et al., 2016). Para ello, se han propuesto diversas estrategias y métodos para purificar las fibras naturales, tanto con fines industriales como de investigación.

El método más comúnmente utilizado se centra en tratar la biomasa con una solución alcalina de hidróxido de sodio. Este tratamiento químico provoca problemas medioambientales por la contaminación de los disolventes alcalinos, así como por la gran cantidad de agua requerida para limpiar las fibras tras el proceso de extracción (Boonterm et al., 2016). Por ello, se deben considerar otros tratamientos más respetuosos con el medio ambiente, para lo que se han estudiado otros procesos como la combinación de ultrasonidos y calentamiento a reflujo, y/o la extracción con agua subcrítica (Freitas et al., 2022a).

Los desechos agroindustriales, como la paja de arroz, son una fuente de compuestos activos que pueden tener múltiples aplicaciones, con un coste relativamente bajo. La fracción de lignina y hemicelulosa de la matriz vegetal posee gran cantidad de compuestos fenólicos, los cuales confieren carácter bioactivo a estos extractos. Algunos de los compuestos son el ácido p-hidroxibenzoico y sus derivados, así como los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados (Farhoosh et al., 2016). Asimismo, se encuentran presentes en altas concentraciones otros compuestos fenólicos como son los taninos, los flavonoides y estilbenos. Todos estos compuestos poseen gran poder antioxidante y acción antibacteriana.

En cuanto a los métodos de extracción de estos compuestos bioactivos, se pueden utilizar tanto técnicas convencionales como no convencionales. Entre los métodos convencionales se encuentran la extracción sólido-líquido con solventes orgánicos, con Soxhlet o la extracción líquido-líquido tras la maceración acuosa (Alara et al., 2021). Este tipo de técnicas pueden requerir una gran cantidad de energía y tiempo, con limitaciones en el rendimiento de la extracción, así como la gestión de solventes tóxicos. En este sentido, se han propuesto métodos alternativos más ecológicos y libres de solventes tóxicos. Estos se basan en técnicas de



extracción como la extracción acuosa asistida por microondas o por ultrasonidos, la extracción en agua subcrítica, la extracción supercrítica o la extracción a alta presión hidrostática, entre otras (Alara et al., 2021; Freitas et al., 2022a; Torres-Valenzuela et al., 2020). Cabe destacar que la eficiencia de extracción de componentes activos depende del tipo de materia prima, el tipo de disolvente, el método de extracción y las condiciones del proceso.

Dada la gran demanda por parte de los consumidores de productos saludables, libres de sustancias nocivas y el uso de procesos responsables con el medioambiente, los extractos naturales activos obtenidos con procesos sostenibles tienen gran interés para diversas aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica o cosmética. Estos extractos activos obtenidos a partir de residuos agroindustriales pueden también ser incorporados en el desarrollo de envases biodegradables activos, constituyendo una opción muy interesante para prologar y mejorar la calidad y seguridad de los alimentos envasados. Como ejemplo, cabe mencionar el estudio de Freitas et al. (2022a, 2023a) donde se obtuvieron películas bioactivas de PLA gracias a la incorporación de extracto acuoso rico en compuestos fenólicos de paja de arroz. Se aplicó un método de extracción acuosa, combinando ultrasonidos y extracción a reflujo. Los resultados obtenidos son muy prometedores ya que mostraron alta capacidad antioxidante. Esta opción de gestión de la paja de arroz impulsa la economía circular, la correcta gestión de los residuos agroindustriales y la disminución de la contaminación del medio ambiente.

La extracción con aplicación de ultrasonidos se fundamenta en la cavitación acústica mediante sondas ultrasónicas, cuya frecuencia oscila entre 20 y 1000 kHz. Estas promueven la formación de burbujas de aire o vapor de agua (zonas de rarificación) y un aumento de la presión (zonas de compresión) en el disolvente, lo cual conlleva la explosión de las burbujas de aire o vapor de agua, provocando efectos mecánicos en las matrices celulares (Cheung & Wu, 2013; Luque-García & Luque de Castro, 2003).

La aplicación de ultrasonidos puede utilizarse combinada con calentamiento a reflujo. Esto facilita la accesibilidad del disolvente a más regiones de la matriz celular, lo que promueve una mayor liberación de los compuestos fenólicos de la matriz vegetal. Por ende, el extracto obtenido posee mayor capacidad antioxidante y antimicrobiana. Se ha demostrado que el método combinado es más rápido que el método tradicional de extracción a reflujo (Freitas et al., 2022b). Se incrementa la velocidad de extracción al potenciar penetración del solvente en los canales y los poros generados por la cavitación ultrasónica (sonocapilaridad) (Machado

et al., 2019). Consecuentemente, los extractos obtenidos tienen una mayor actividad antioxidante y antimicrobiana (Ismail et al., 2019).

Otro método limpio para potenciar la extracción de compuestos activos es la extracción con agua subcrítica, también conocida como extracción con agua caliente presurizada. Esta es una técnica innovadora y sostenible que utiliza agua líquida en condiciones subcríticas, es decir, con una temperatura superior al punto de ebullición y con presión superior a la atmosférica, por debajo del punto crítico (374 °C, 218 atm) (Castro-Puyana et al., 2013). Esta técnica presenta una serie de ventajas importantes sobre las técnicas de extracción tradicionales: es más rápida, generalmente produce mayores rendimientos y sin el uso de disolventes tóxicos. En estas condiciones de procesado subcrítico se consigue una mejor transferencia de masa, con una mayor solubilización de compuestos, debido a los cambios en las propiedades del agua en condiciones subcrítica: disminución de la constante dieléctrica, tensión superficial, densidad y viscosidad, en función de la temperatura, lo que aumenta su capacidad de penetración en la matriz sólida y de solubilización de compuestos menos polares (Ong et al., 2006; Plaza et al., 2010), lo que le confiere un gran potencial en la extracción de componentes no celulósicos de residuos lignocelulósicos. A su vez, la extracción en agua subcrítica a diferente temperatura/presión dará lugar a extractos con diferentes perfiles de composición y bioactividad.

En definitiva, la extracción acuosa de la paja de arroz mediante aplicación de ultrasonidos o condiciones subcríticas constituye una técnica limpia con alto potencial para la obtención de extractos activos de la paja de arroz, contribuyendo a la valorización del residuo, ya que ambas pueden promover la liberación de compuestos fenólicos de la matriz, dando lugar a extractos de alta riqueza fenólica con aplicaciones potenciales en las industria alimentaria, farmacéutica o cosmética. Además, al no utilizar disolventes orgánicos, no posee un impacto negativo en el medio ambiente, contribuyendo al mismo tiempo a la economía circular. En este contexto de desarrollo sostenible y circularidad, se contribuye a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) especialmente al ODS 12 “Producción y consumo responsables”, al ODS 13 “Acción por el clima”, al ODS 14 “Vida submarina” y al ODS 15 “Vida de ecosistemas terrestres”.

## **2. OBJETIVO**

El objetivo general de este trabajo consistió en la obtención y caracterización de extractos acuosos de la paja de arroz mediante diferentes métodos: la combinación de ultrasonidos y calentamiento a reflujo (100 °C), y la extracción subcrítica a 160 °C y 180 °C. Los extractos se han caracterizado en su composición, contenido fenólico y capacidad antioxidante y antimicrobiana, a fin de comparar los tres procesos y determinar su efectividad en la producción de extractos bioactivos para distintas aplicaciones.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materia prima

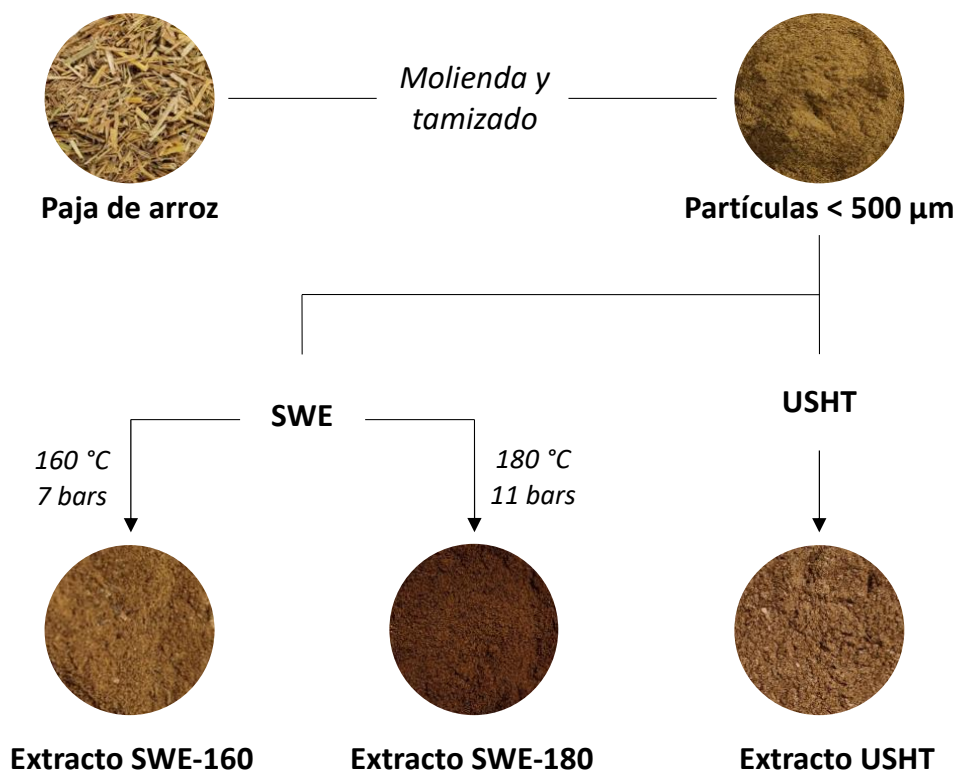
La paja de arroz (*Oryza sativa* L var. J. Sendra) ha sido obtenida de los campos de arroz de la Albufera de Valencia y suministrada por el Banco de Paja (Valencia, España). Para la obtención de las muestras se secó la paja de arroz a  $50 \pm 2$  °C a vacío (0,5 mmbar) durante 16 horas. A continuación, se procedió a la molienda mediante un molino (IKA, modelo M20, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemania) en 3 ciclos de 90 segundos cada uno. Finalmente, se procedió a la tamización del polvo para obtener partículas de un tamaño menor a 0,5 mm y se almacenó en un desecador a  $20 \pm 2$  °C hasta su posterior uso.

El reactivo de Folin-Ciocalteu, el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), la sal de diamonio 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (> 98 % de pureza), el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) (> 97 % de pureza), el etanol (98 % de pureza) y el metanol (> 99,9 % de pureza) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Misuri, EE. UU.). El ácido sulfúrico (98 %), el carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), el nitrato de magnesio ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ) y el pentóxido de di-fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) fueron suministrados por Panreac Química S.L.U (Castellar del Vallés, Barcelona, España).

Para las pruebas microbiológicas, el agua de peptona tamponada, caldo de soja tripticasaína (TSB) y agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) se adquirieron de Labkem (Barcelona, España). El agar bilis rojo violeta (VRB) fue suministrado por Scharlab S.L. (Sentmenat, Barcelona, España). Las cepas de *Listeria innocua* (CECT 910) y *Escherichia coli* (CECT 101) se adquirieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universidad de Valencia, Valencia, España).

#### 3.2. Obtención de extractos acuosos

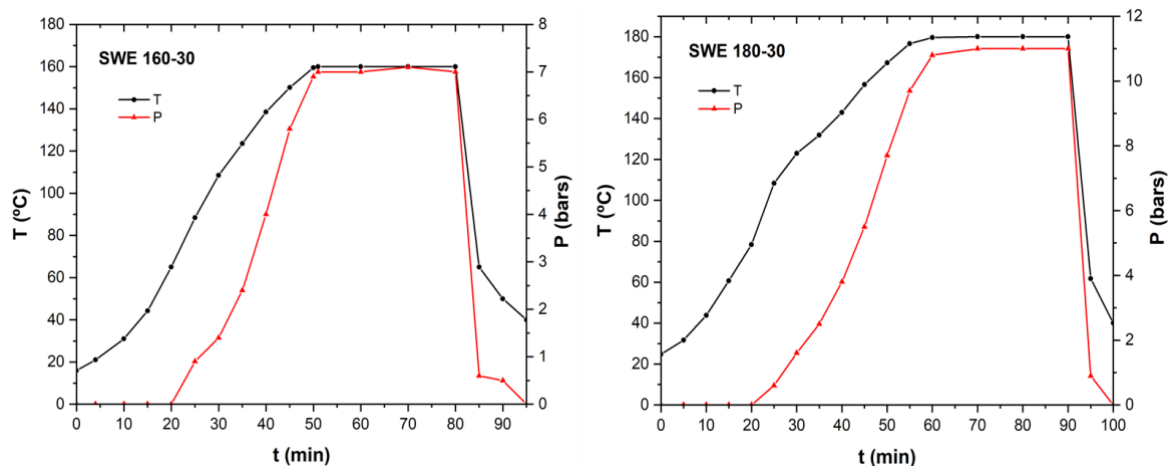
En cuanto a los extractos acuosos, se obtuvieron tres tipos en función de la técnica de extracción: tratamiento combinado de ultrasonidos y calentamiento por reflujo (USHT) previamente optimizado (Freitas et al., 2022b), y extracción con agua subcrítica (SWE) a 160 °C (SWE-160) y 180 °C (SWE-180) (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de los procesos de extracción con fotos de los extractos (Freitas et al., 2022a).

Para el proceso USHT, se preparó una suspensión acuosa de partículas de paja de arroz al 5% (p/p) en agua destilada y se sonicó durante 30 minutos. Para ello se utilizó una sonda homogeneizadora ultrasónica de alta intensidad (Vibra Cell™ VCX750, Sonics & Material, Inc., Newtown, CT, EE. UU.), la cual funcionaba a una frecuencia de 20 kHz, 750 W de potencia y 40% de amplitud de sonicación, en modo continuo, manteniendo la temperatura a unos 25 °C. Para mantener la temperatura se utilizó un baño de hielo, para evitar el calentamiento de la muestra. A continuación, la suspensión acuosa de paja de arroz se calentó a reflujo (100 °C) durante 1 hora.

Para los procesos SWE, las partículas de paja de arroz se dispersaron en agua destilada en una proporción 1:10 (p/v). A continuación, se sometieron a extracción en un reactor de presión (modelo 1-T-A-P-CE, 5 L de capacidad, Amar Equipaments PVT. LTD, Mumbai, India). La extracción se realizó con agitación a 150 rpm, durante 30 minutos una vez alcanzada la temperatura de trabajo, en dos condiciones de presión - temperatura: A) 160 °C, 7 bares, y B) 180 °C, 11 bares (Figura 4).



**Figura 4.** Perfiles de temperatura-Presión durante el proceso de extracción con agua subcrítica a 160 y 180 °C.

Tras cada una de las tres extracciones mencionadas, la dispersión de paja de arroz se filtró (Filterlab) para obtener los extractos líquidos. A continuación, estos se liofilizaron (Telstar, modelo LyoQuest-55) a -60 °C, 0,8 mbar durante 72 horas. Los extractos liofilizados se almacenaron en un frasco oscuro a 0 % de humedad relativa con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, y a 4 ± 2 °C hasta su uso posterior.

Los extractos secos se caracterizaron en su contenido en proteínas, lignina, cenizas y fenoles totales. Se caracterizaron también los análisis termogravimétrico y espectral (UV-Vis), capacidad antioxidante (DPPH, ABTS) y capacidad antimicrobiana (*L. innocua* y *E. coli*).

### 3.3. Caracterización de extractos acuosos

#### 3.3.1. Rendimiento de la extracción

El rendimiento de cada extracción se determinó por secado de una alícuota del extracto a 70 ± 2 °C a vacío durante 6 horas, hasta peso constante. A partir del contenido en sólidos y agua del extracto, se determinó la masa total de sólidos extraídos por unidad de masa de paja seca, considerando la cantidad de agua utilizada en la extracción. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada extracto.

### **3.3.2. Contenido en lignina**

Para la determinación del contenido de lignina Klason de los extractos se siguió la metodología NREL (NREL/TP-510-42.618) (Sluiter et al., 2008). Las muestras de extracto seco se hidrolizaron con ácido sulfúrico en dos etapas y se determinó el contenido de lignina Klason del residuo insoluble, restando el contenido en cenizas determinado en el mismo residuo por calcinado en mufla. Para ello, se pesaron 300 mg muestra en un tubo de presión (90 mL) y se añadieron 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (72%), manteniendo en baño de agua a 30 °C durante 1 hora. Después se añadieron 84 mL agua destilada y, tras agitación, las muestras se colocaron en autoclave a 121 °C durante 1 hora. Posteriormente, las muestras se filtraron en un crisol de filtración y el residuo se lavó con agua destilada. El filtrado se utilizó para determinar la lignina soluble; el residuo se secó en estufa a 105 °C hasta peso constante para determinar la masa del residuo insoluble en ácido, tras su pesada, las muestras se llevaron a la mufla a 500 °C durante 24 h para determinar cenizas gravimétricamente, cuyo peso se restó para cuantificar la lignina del residuo insoluble en ácido.

### **3.3.3. Contenido en proteínas**

Se empleó el método de Kjeldhal (Barbano et al., 1990) para determinar el contenido de proteínas totales en los extractos. Para ello, muestras de 700 g fueron colocadas en tubos de digestión y se añadieron 2 g de catalizador (relación K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:CuSO<sub>4</sub>:Se de 10:1:0,1), 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y 5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (110 volúmenes). Los tubos de digestión se colocaron en un digestor de muestras (Bloc Digest 6, P Selecta) a 420 °C durante 30 minutos, hasta que las muestras adquirieron una coloración verde. Posteriormente, se añadieron 50 mL de agua y los tubos se trasladaron a una unidad de destilación de vapor (UDK 127, Velp Scientifica) con NaOH (10 N) durante 4 minutos sobre un matraz Erlenmeyer con 50 mL de ácido bórico (4 %).

A continuación, se llevó a cabo la valoración del hidróxido de amonio recogido utilizando una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 N) hasta llegar al punto de equivalencia, el cual se caracterizó por viraje del indicador (fenolftaleína). Finalmente, se calculó el contenido total de proteínas expresado en porcentaje, teniendo en cuenta un factor de conversión de 6,25 (para arroz integral). Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

#### **3.3.4. Contenido en cenizas**

El contenido total en cenizas de los extractos se determinó a partir de análisis termogravimétricos (TGA 1 Stare System, Mettler-Toledo, Suiza), descritos a continuación.

#### **3.3.5. Contenido fenólico (TPC)**

El contenido total de fenoles (TPC) se determinó por triplicado para cada extracto, utilizando el método de Folin-Ciocalteu modificado, según lo descrito por Menzel et al. (2020). Se mezclaron primero 0,5 mL de extracto de concentración conocida y 6 mL de agua destilada en un tubo de vidrio y, a continuación, se añadieron 0,5 mL de reactivo Folin (2N). Después de un minuto, se añadieron 1,5 mL de solución de carbonato sódico (20%, p/v); la mezcla se llenó hasta 10 mL con agua destilada y se incubó durante 2 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. La absorbancia se midió espectrofotométricamente a 725 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 201, Thermo Scientific). Se utilizó una solución de ácido gálico como patrón para la calibración y el contenido fenólico total se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) /100 g de extracto seco. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

#### **3.3.6. Análisis termogravimétrico (TGA)**

Se utilizó un analizador termogravimétrico (TGA 1 Stare System, Mettler-Toledo, Suiza) para estudiar la estabilidad térmica de los extractos activos y su contenido en cenizas. Las muestras se pesaron en crisoles de alúmina (3-5 mg) y se sometieron a un proceso de calentamiento desde 25 °C hasta 700 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, bajo flujo de nitrógeno (10 mL/min). Se analizaron las curvas termogravimétricas y sus derivadas para determinar la temperatura inicial ( $T_{on}$ ) y la temperatura a la máxima velocidad de degradación térmica ( $T_p$ ), así como la masa residual correspondiente a cada evento térmico. Del residuo másico final se determinó el contenido en cenizas del extracto. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.



### 3.3.7. Análisis espectral (UV-Vis)

Para el análisis espectral se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible (Evolution 201, Thermo Scientific) y se determinaron los espectros de absorción UV-Vis de las soluciones acuosas de los extractos a una concentración de 0,1 mg/mL en un rango de longitudes de onda de 200 a 900. El análisis se llevó a cabo por triplicado.

### 3.3.8. Capacidad antioxidante (DPPH, ABTS)

La actividad antioxidante de los extractos se determinó mediante la capacidad de inhibición de los radicales ABTS y DPPH.

El ensayo ABTS se llevó a cabo según lo descrito por (Re et al., 1999). Para preparar el catión radical ABTS (ABTS<sup>•+</sup>), se disolvieron ABTS y K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en agua destilada hasta una concentración final de 7 mM y 2,45 mM, respectivamente. Estas soluciones se mezclaron y se mantuvieron durante 16 horas en la oscuridad a 4 °C. Se mezclaron diferentes volúmenes de extractos diluidos en agua destilada con la solución de ABTS<sup>•+</sup> (diluida hasta que la absorbancia a 734 nm fuera igual a 0,7 ± 0,2) y se midió la reducción de la absorbancia a 734 nm. Cada extracto se analizó por duplicado. La curva estándar se preparó utilizando diferentes concentraciones de Trolox y los resultados se expresaron como capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), en μmol Trolox/mg de extracto.

También se utilizó el método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Brand-Williams et al., 1995), con algunas modificaciones, según lo descrito por Freitas et al. (2022b). Cada extracto se mezcló con la solución metanólica de DPPH (Abs<sub>515nm</sub> = 0,7 ± 0,2) a diferentes concentraciones hasta un volumen final de 4 mL. Se utilizó una curva de calibración para determinar la concentración inicial de DPPH en el medio de reacción. La actividad antioxidante de los diferentes extractos se determinó como el valor EC<sub>50</sub>, que es la concentración necesaria para reducir la concentración de DPPH en un 50 % cuando la reacción es estable. El tiempo necesario para alcanzar la estabilidad de la reacción fue de 12 horas en todos los casos.

Para obtener los valores EC<sub>50</sub>, se obtuvieron los gráficos %[DPPH] remanente frente a mg de extracto sólido/mg de DPPH, donde:

$$\% \text{ [DPPH] remanente} = \left( \frac{[\text{DPPH}]_t}{[\text{DPPH}]_{t=0}} \right) \times 100$$

$[DPPH]_t$  es el valor de la concentración de DPPH cuando la reacción es estable, y  $[DPPH]_{t=0}$  es la concentración inicial de DPPH.

### **3.3.9. Capacidad antimicrobiana (*L. innocua* y *E. coli*)**

Se analizó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos para una bacteria grampositiva (*Lysteria innocua*) y una gramnegativa (*Escherichia coli*) con el fin de evaluar el potencial efecto antibacteriano de los extractos, tal y como describen (Requena et al., 2019a), utilizando una placa de microtitulación estéril desechable de 96 pocillos (volumen de pocillo de 200  $\mu$ L). Se obtuvieron soluciones madre de cada extracto y diferentes diluciones, comprendidas entre 20 y 200 mg.mL<sup>-1</sup> (con intervalos de 10 mg.mL<sup>-1</sup>) con el medio de cultivo TSB. Se colocaron alícuotas (100  $\mu$ L) de cada dilución del extracto en los pocillos correspondientes. Los pocillos se inocularon con 100  $\mu$ L de dispersión bacteriana de 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Los recuentos bacterianos en los pocillos se determinaron inoculando 100  $\mu$ L del contenido de cada pocillo en medio de agar de soja tríptico, durante 24 h a 37 °C. El valor MIC de cada extracto se consideró como la concentración más baja de los extractos en la que el recuento bacteriano en la placa fue cero. Cada extracto se analizó por duplicado.

### **3.3.10. Análisis estadístico**

Se aplicaron análisis de varianza (ANOVA) y el test HSD (Diferencia honestamente significativa) de Tukey, considerando la diferencia mínima significativa ( $\alpha$ ) del 5 %, para determinar si existían diferencias significativas entre los extractos. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa estadístico Minitab (versión 17).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Composición de los extractos

La tabla 2 presenta los valores obtenidos para el rendimiento de los extractos (sólidos extraídos por unidad de masa de paja seca) y su composición en lignina, proteínas, cenizas y contenido fenólico total, expresado por 100 g de extracto (TPC<sub>1</sub>), y la cantidad correspondiente extraída de la paja (TPC<sub>2</sub>, en g / 100 g de paja), en cada proceso de extracción. El rendimiento de la extracción varió según el método de extracción utilizado, siendo la eficiencia del método SWE mucho mayor, sin diferencias estadísticamente significativas entre SWE-160 y SWE-180. La SWE tiene mayor capacidad extractiva debido a las propiedades específicas del agua en condiciones subcríticas, con menor constante dieléctrica, tensión superficial y viscosidad, que la convierten en muy buen solvente para compuestos orgánicos que no serían solubles en condiciones normales (Ong et al., 2006; Plaza et al., 2010). A mayor temperatura se potencia usualmente el poder solvente del agua, en función del sustrato extraíble. Algunos autores reportan alta solubilización de la hemicelulosa de la matriz entre 160 y 180 °C mientras que esta puede hidrolizarse en mayor proporción a alta temperatura por el carácter ácido del agua en estas condiciones (Castro-Puyana et al., 2013).

**Tabla 2.** Rendimiento de la extracción y contenidos en lignina, proteínas, cenizas y fenoles de los diferentes extractos.

	USHT	SWE-160	SWE-180
<b>Rendimiento (g extracto/100 g paja)</b>	13.95 ± 0.13 <sup>b</sup>	23.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	23.4 ± 1.1 <sup>a</sup>
<b>Lignina Klason (g/100 g extracto seco)</b>	17.0 ± 0.7 <sup>b</sup>	22.9 ± 0.7 <sup>a</sup>	23.3 ± 0.1 <sup>a</sup>
<b>Proteínas (g BSA/100 g extracto seco)</b>	12.2 ± 2.2 <sup>a</sup>	10.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	9.1 ± 0.1 <sup>b</sup>
<b>Cenizas (g/100 g extracto seco)</b>	20.6 ± 0.6 <sup>a</sup>	9.8 ± 0.5 <sup>b</sup>	9.1 ± 1.7 <sup>b</sup>
<b>TPC<sub>1</sub> (g GAE/100 g extracto seco)</b>	3.71 ± 0.04 <sup>c</sup>	5.10 ± 0.20 <sup>b</sup>	8.30 ± 0.30 <sup>a</sup>
<b>TPC<sub>2</sub> (g GAE/100 g paja)</b>	0,441 ± 0,005 <sup>c</sup>	1,179 ± 0,040 <sup>b</sup>	1,931 ± 0,080 <sup>a</sup>

El método de extracción también influyó en el contenido en lignina de los extractos, siendo de nuevo más eficiente el método SWE, sin diferencias estadísticamente significativas entre SWE-160 y SWE-180. Por tanto, el método USHT eliminó una menor proporción de la fracción de lignina de la matriz vegetal.

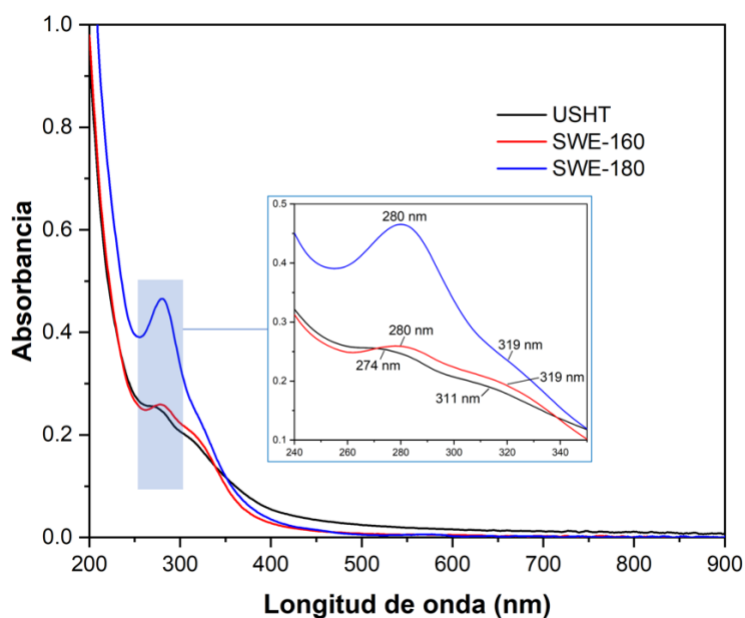
Con relación al contenido en proteínas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el método USHT y el SWE-160. Sin embargo, se observa que el método SWE-180 no resultó tan eficaz para la extracción proteica. Esto se puede atribuir principalmente a la desnaturalización de las proteínas inducida por el calor que decrece su solubilidad, tal como apuntan otros autores (Basak & Annapure, 2022).

El extracto de paja de arroz obtenido por USHT mostró un alto contenido de cenizas de aproximadamente el 20% en peso, cuya composición es atribuible principalmente a sílice que está altamente presente en la paja de arroz (Chen et al., 2011). Por contra, los extractos procedentes del método SWE tuvieron mucho menor contenido en cenizas (aproximadamente la mitad) lo que indica una menor capacidad extractiva de la SWE respecto a la sílice. La solubilización de la sílice depende en gran medida de la temperatura y el pH, favoreciéndose a altas temperaturas y pH superiores a 9,0 (Le et al., 2015). Al pH bajo de la SWE, la sílice no se extrae bien, mientras los extractos USHT presentan un contenido en cenizas mayor probablemente debido al mayor pH y al efecto mecánico de la sonicación. De hecho, esta técnica se ha propuesto como un método eficaz en la desilificación de biomasa para evitar los problemas operativos que presentan las partículas de sílice en las biorrefinerías (Le et al., 2015; Yunus et al., 2010). De las diferentes formas de sílice identificadas en la paja de arroz (grupos silanediol  $[(OH)_2Si(OSi)_2]$ , grupos silanol  $[(OH)Si(OSi)_3]$  y estructuras tetraédricas de silicio-oxígeno  $[Si(OSi)_4]$ ), las formas amorfas silanediol y silanol representan aproximadamente el 70% y pueden disolverse parcialmente en medios acuosos (Mochidzuki et al., 2001).

En cuanto al contenido fenólico de los extractos, cuantificado por el método Folin-Ciocalteu, presentó valores diferentes en cada uno de los extractos. El método SWE fue más eficaz que el proceso USHT en la extracción fenólica. Así mismo, se observan diferencias estadísticamente significativas entre los extractos SWE-160 y SWE-180, con valores de contenido fenólico superiores para la mayor temperatura de extracción. Estos valores son especialmente importantes ya que este tipo de compuestos tienen gran influencia en la capacidad antioxidante y bioactiva de los extractos. Además de potenciar la extracción de compuestos fenólicos, la mayor temperatura de extracción podría favorecer la ocurrencia y la intensidad de las reacciones de Maillard y de caramelización (Wang et al., 2009; Wu & Yen, 2005), cuyos

compuestos pueden influir en la bioactividad final de los extractos, dado su carácter antioxidante y antimicrobiano (Moreno et al., 2017). Es de destacar que, aunque no se analizaron específicamente, la mayoría de los compuestos no analizados corresponderían a carbohidratos con diferente peso molecular resultantes de la extracción parcial e hidrólisis de la hemicelulosa de la matriz vegetal, los cuales son altamente susceptibles de experimentar reacciones de Maillard y caramelización.

La diferente proporción en contenido fenólico se refleja también en los espectros UV de los extractos (Figura 5) cuya absorbancia en la región UV (máximo de absorción de los fenólicos) es mucho mayor para el extracto SWE-180 que para el SWE-160 y USHT. Por tanto, el método SWE a 180 °C produce extractos con contenido fenólico casi dos veces el de los otros métodos, extrayendo de la matriz vegetal del orden de 2 g de GAE por 100 g de paja seca.



**Figura 5.** Espectros UV-Vis de los diferentes extractos diluidos en agua con concentración de 66 mg/L.

#### 4.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

El comportamiento térmico de las muestras se evaluó mediante análisis termogravimétrico (TGA). Tanto la curva TGA como la derivada (DTGA) de las diferentes muestras se dan en la figura 6. En todos los casos, se observan tres eventos significativos de pérdida de masa o degradación térmica que se reflejan en la pérdida rápida de peso y el correspondiente pico en la curva

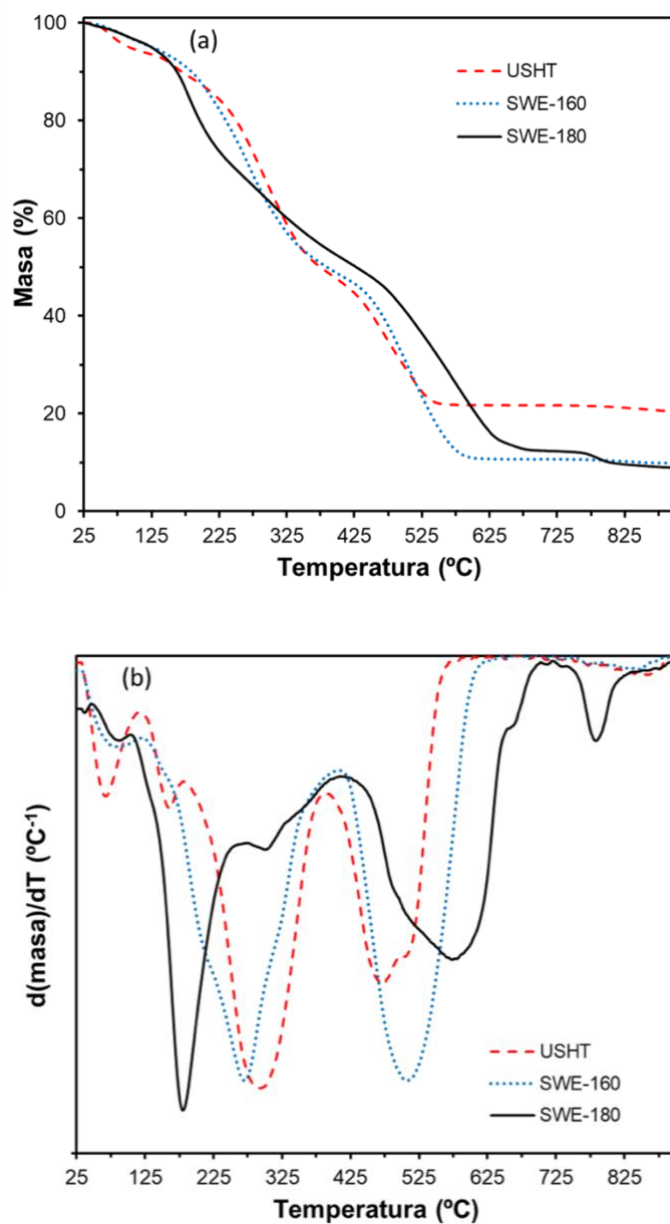
derivada, que refleja la temperatura de máxima velocidad de degradación en cada caso. El primero se da en el rango de temperatura de 30 a 140 °C y está asociado con la pérdida de moléculas de agua ligada a los compuestos polares del extracto (Theng et al., 2017; Wu et al., 2013).

En materiales lignocelulósicos, como la paja de arroz, las fracciones de hemicelulosa, celulosa y lignina exhibieron patrones típicos de degradación térmica en rangos de temperatura de 150-350 °C, 275-350 °C y 250-500 °C, respectivamente (Collazo-Bigliardi et al., 2018a, Collazo-Bigliardi et al., 2018b; Mansaray & Ghaly, 1998), pero otros estudios dan un rango de temperaturas más amplio para la degradación de la lignina (160-900 °C) con alta masa residual (Yang, et al., 2007). Por tanto, el segundo evento térmico observado entre 150 y 375 °C puede atribuirse mayoritariamente a la degradación de compuestos de menor peso molecular, como azúcares y oligómeros de la hemicelulosa extraída. Este evento ocurre con la máxima velocidad a menor temperatura para el extracto SWE-180, lo que sugiere una mayor proporción de azúcares y oligómeros de bajo peso molecular en este extracto. Los extractos SWE-160 y USHT parecen presentar un mayor contenido en hemicelulosas no hidrolizadas cuya degradación ocurriría en este intervalo de temperaturas (150-375 °C) con el pico a mayor temperatura.

El tercer evento térmico ocurre entre 400 y 700 °C y puede atribuirse mayoritariamente a la degradación de la lignina. Estos polímeros fenólicos exhiben un amplio rango de degradación térmica que comienza alrededor de los 220 °C y continúa por encima de los 400 °C (Monteiro et al., 2012). Por tanto, aunque parte de la lignina puede haber degradado en la segunda etapa por debajo de los 400 °C, la tercera etapa podría corresponder a la degradación térmica de la lignina residual y los productos de la fragmentación de su estructura orgánica (Requena et al., 2019; Theng et al., 2017). Este pico, también se ha encontrado en la fracción celulósica de la paja de arroz (El-Sakhawy & Hassan, 2007; Freitas et al., 2023b) después del blanqueado, lo que indica que los métodos utilizados son incapaces de eliminar completamente la lignina presente en la estructura interna de la matriz celulósica. El último pico de degradación a temperaturas mayores de 600 °C se atribuye a la degradación térmica de la lignina y sus productos de la fragmentación (Theng et al., 2017).

Por tanto, el diferente comportamiento térmico de los extractos revela sus diferencias composicionales, así como un mayor grado de hidrólisis del extracto SWE-180 por su menor estabilidad térmica (menor temperatura del primer pico de degradación). A su vez, el residuo másico obtenido a las temperaturas más altas se relaciona con el contenido en cenizas de los

diferentes extractos que, tal como se ha comentado fue menor en los extractos SWE que en el USHT.



**Figura 6.** Análisis termogravimétrico de los diferentes extractos: curvas de pérdida de peso (a) frente a la temperatura y su correspondiente curva derivada (b).

### 4.3. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos se evaluó a través de la capacidad para inactivar los radicales libres DPPH y ABTS. La tabla 3 presenta los valores de  $EC_{50}$  (cantidad de extracto por unidad de masa de DPPH necesario para inactivar el 50 % del radical), obtenidos según se

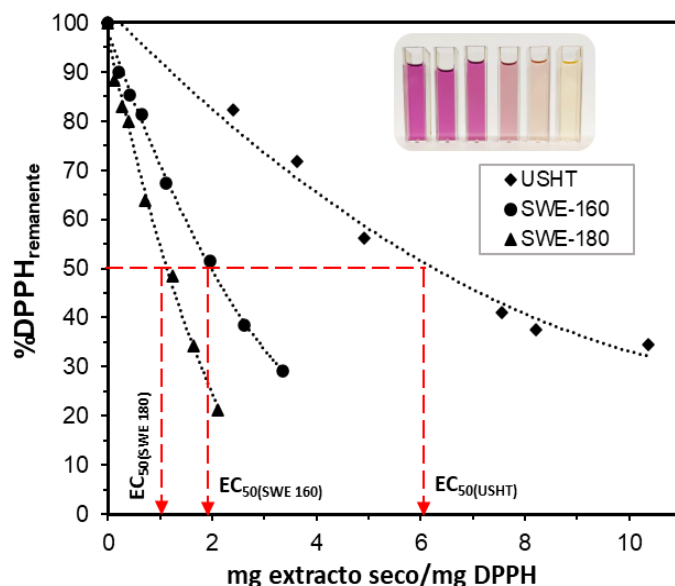
muestra en la Figura 7, así como los valores de TEAC (equivalentes de TROLOX) para inactivar el ABTS. Ambos parámetros reflejan una mayor capacidad antirradical libre de los extractos SWE, especialmente el obtenido a 180 °C que presenta el menor valor de EC<sub>50</sub> y el mayor valor de TEAC, en coherencia con su mayor contenido fenólico. El contenido fenólico total (TPC) de los extractos se correlacionó linealmente con su capacidad de inhibición del radical ABTS ( $r = 0,996$ ), pero se observó una menor correlación entre los valores EC<sub>50</sub> y el TPC ( $r = -0,827$ ) y los extractos de SWE mostraron una tendencia diferente al USHT. Esto sugiere que los compuestos fenólicos activos de los extractos SWE en el ensayo DPPH, no tienen el mismo perfil de composición que los del extracto USHT y presentan una capacidad de inhibición del radical DPPH diferente. En este sentido, otros compuestos antioxidantes neo-formados a través de las reacciones de Maillard y caramelización a las temperaturas más altas de la SWE también podrían contribuir a la capacidad antirradical, tal y como han descrito otros autores (Plaza et al., 2010). Estos autores estudiaron la formación de nuevos antioxidantes derivados de las reacciones de Maillard durante la SWE en sistemas de modelo en función de la temperatura, demostrando que el alcance de las reacciones de pardeamiento no enzimático era mayor cuando aumentaba la temperatura. Por lo tanto, los extractos SWE-180 podrían contener una mayor proporción de este tipo de compuestos, contribuyendo a su capacidad antioxidante. Otros autores también han propuesto la formación de antioxidantes durante las reacciones de Maillard y caramelización (Atrooz, 2008; Cämmerer & Kroh, 2006; Mesa et al., 2008).

**Tabla 3.** Capacidad antioxidante de los diferentes extractos evaluada a través de la capacidad para inhibir el radical DPPH (EC<sub>50</sub>: cantidad de extracto con relación a la de DPPH necesaria para reducir la concentración del radical al 50 %) y el radical ABTS (TEAC: expresada como equivalentes de TROLOX).

	USHT	SWE-160	SWE-180
EC <sub>50</sub> (mg extracto seco. mg <sup>-1</sup> DPPH)	6.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>c</sup>
TEAC (µmol Trolox.mg <sup>-1</sup> extracto seco)	0.59 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.67 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.94 ± 0.02 <sup>a</sup>



A efectos comparativos, los valores  $EC_{50}$  de compuestos antioxidantes potentes, como el ácido ascórbico o el  $\alpha$ -tocoferol, son de 0,12 y 0,26 mg/mg DPPH, respectivamente (Brand-Williams et al., 1995), lo que indica que los extractos de SWE, y especialmente el SWE180, mostraron una elevada capacidad de eliminación de radicales DPPH, cercana a la de los antioxidantes potentes.



**Figura 7.** Determinación de los valores de  $EC_{50}$  de los diferentes extractos frente al radical DPPH.

#### 4.4. Capacidad antimicrobiana

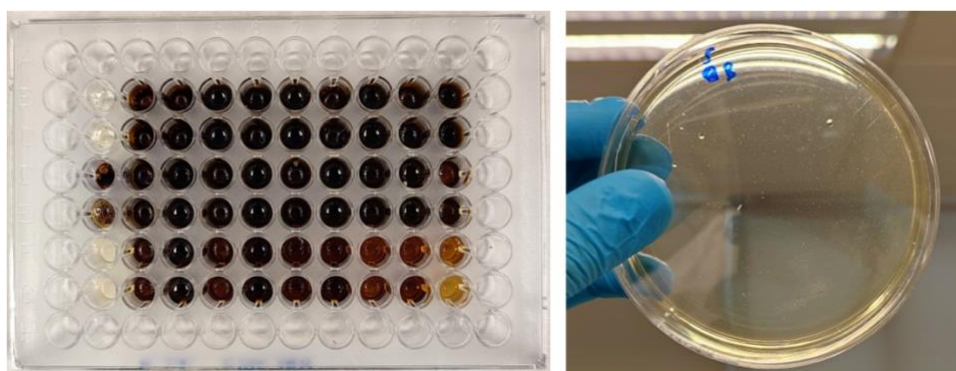
La capacidad antimicrobiana de los extractos se estudió a través de su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria grampositiva (*Listeria innocua*) y una bacteria gramnegativa (*Escherichia coli*), determinando los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada extracto, utilizando placas multipocillo inoculadas con la bacteria y diferentes concentraciones de los extractos, como muestra la Figura 8. En ambas bacterias, los resultados mostraron una mayor actividad antibacteriana de los extractos SWE, puesto que se obtuvieron valores de MIC más bajos para estos extractos, en el rango de concentraciones ensayado, tal como muestra la tabla 4.

**Tabla 4.** Concentración mínima inhibitoria de los diferentes extractos frente a *Listeria innocua* y *Escherichia coli*.

	USHT	SWE-160	SWE-180
MIC <i>L. innocua</i> (mg.mL <sup>-1</sup> )	>200	50 ± 3 <sup>a</sup>	30 ± 3 <sup>b</sup>
MIC <i>E. coli</i> (mg.mL <sup>-1</sup> )	>200	>200	182 ± 3

En el caso de los extractos USHT, no se alcanzaron los valores de la MIC con la concentración máxima utilizada (200 mg/mL<sup>-1</sup>). Sin embargo, los extractos SWE alcanzaron el valor de la MIC de *L. innocua* a 30 y 50 mg/mL<sup>-1</sup> para los extractos SWE160 y SWE180, respectivamente. En cuanto a *E. coli*, esta bacteria fue menos sensible a estos extractos, mostrando valores de MIC más elevados, superiores a 200 mg/mL<sup>-1</sup> para el extracto SWE160, y de 182 mg/mL<sup>-1</sup> para el extracto obtenido a mayor temperatura, SWE-180.

Estudios previos (Ordoñez et al., 2021) han mostrado la eficacia antimicrobiana, especialmente frente a *Listeria*, de los ácidos fenólicos, como el ácido ferúlico, que es uno de los principales compuestos de los extractos acuosos de la paja de arroz (Menzel et al., 2020). En este sentido, los extractos obtenidos también fueron más efectivos contra *L. innocua* que contra *E. coli*, tal como han observado también otros autores para los ácidos fenólicos (Takahashi et al. 2013; Andrade et al., 2022). La razón radica en que las bacterias gramnegativas, como *E. coli*, son más resistentes, debido a que su membrana externa de mayor grosor limita en mayor medida el paso de moléculas pequeñas (Liu et al., 2020).



**Figura 8.** Placa multipocillos inoculados con la bacteria con las diferentes concentraciones de los extractos para determinar su concentración mínima inhibitoria (MIC).

## 5. CONCLUSIONES

Los extractos acuosos de la paja de arroz, utilizando calentamiento a reflujo con pretratamiento de ultrasonidos (USHT), o extracción en condiciones de agua subcrítica (SWE) a 160 y 180 °C mostraron alta concentración de lignina y cenizas, así como de compuestos fenólicos, que les confirió actividad antioxidante y antibacteriana. Por tanto, podrían utilizarse como ingrediente en alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos o para la obtención de materiales activos para el envasado de alimentos, tras los controles toxicológicos correspondientes. De esta forma, podrían contribuir a la valorización del subproducto, cuyo residuo de extracción podría también utilizarse como una fuente de celulosa, dada la riqueza del material en este componente, potenciando su aprovechamiento integral.

La extracción con agua subcrítica fue la más efectiva para la obtención de compuestos fenólicos y, por tanto, proporciona extractos con mayor bioactividad. La extracción a mayor temperatura (180 °C) dio lugar a una alta capacidad antioxidante, próxima a la de los antioxidantes típicos, como tocoferol o ácido ascórbico, y una mayor capacidad antibacteriana. La formación de compuestos de Maillard o caramelización durante el proceso de extracción podría haber contribuido a su mayor bioactividad. Son necesarios más estudios para garantizar la inocuidad de estos extractos e, incluso, sus propiedades de beneficio potencial para la salud, en base a su riqueza fenólica.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abedinifar, S., Karimi, K., Khanahmadi, M., & Taherzadeh, M. (2009). Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. *Biomass and bioenergy*, 33(5), 828-833. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.01.003>
- Abril, D., Navarro, E., & Alejandro, A. (2009). La paja de arroz. Consecuencias de su manejo y alternativas de aprovechamiento. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 17, 69-79.
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200-214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Atrooz, O. M. (2008). The effects of Maillard reaction products on apple and potato polyphenoloxidase and their antioxidant activity. *International journal of food science & technology*, 43(3), 490-494. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01478.x>
- Bangar, S. P., Whiteside, W. S., Kajla, P., & Tavassoli, M. (2023). Value addition of rice straw cellulose fibers as a reinforcer in packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125320. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125320>
- Barbano, D. M., Clark, J. L., Dunham, C. E., & Flemin, R. J. (1990). Kjeldahl Method for Determination of Total Nitrogen Content of Milk: Collaborative Study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 73(6), 849-859. <https://doi.org/10.1093/jaoac/73.6.849>
- Barroso, C. M. (2010). Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el mercado de una biorrefinería.
- Basak, S., & Annapure, U. S. (2022). Trends in “green” and novel methods of pectin modification- A review. *Carbohydrate Polymers*, 278, 118967. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118967>
- Binod, P., Sindhu, R., Singhanía, R. R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., ... & Pandey, A. (2010). Bioethanol production from rice straw: an overview. *Bioresource technology*, 101(13), 4767-4774. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.079>
- Blay, V., Roselló, J., Quiñones, P.-P. A., & Canet, R. (2018). Valorización mediante compostaje de los restos vegetales en el Mercado de Abastos de Valencia (Mercavalència). *Gestión integral de residuos orgánicos. Poniendo en marcha la economía circular en la sociedad*, 67-71. <http://hdl.handle.net/20.500.11939/6909>
- Boonterm, M., Sunyadeth, S., Dedpakdee, S., Athichalinthorn, P., Patcharaphun, S., Mungkung, R., & Techapiesanchaorenkij, R. (2016). Characterization and comparison of cellulose fiber extraction from rice straw by chemical treatment and thermal steam explosion. *Journal of Cleaner Production*, 134, 592-599. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.09.084>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

- Cämmerer, B., & Kroh, L. W. (2006). Obtenido de Antioxidant activity of coffee brews. *European Food Research and Technology*, 223, 469-474. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0226-4>
- Castro-Puyana, M., Herrero, M., Mendiola, J., & Ibáñez, E. (2013). Subcritical water extraction of bioactive components from algae. In *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals* (pp. 534-560). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857098689.3.534>
- CEPAL. (2015). Obtenido de Balances de Abastecimiento y Utilización de Granos Básicos : mercado del arroz: una aproximación con el uso de balances. [https://www.cepal.org/sites/default/files/courses/files/02\\_3\\_uso\\_analisis\\_de\\_mercado.pdf](https://www.cepal.org/sites/default/files/courses/files/02_3_uso_analisis_de_mercado.pdf)
- Chen, X., Yu, J., Zhang, Z., & Lu, C. (2011). Study on structure and thermal stability properties of cellulose fibers from rice straw. *Carbohydrate polymers*, 85(1), 245-250. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.02.022>
- Cheung, Y.-C., & Wu, J.-Y. (2013). Kinetic models and process parameters for ultrasound-assisted extraction of water-soluble components and polysaccharides from a medicinal fungus. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.08.009>
- Collazo-Bigliardi, S., Ortega-Toro, R., & Chiralt Boix, A. (2018a). Isolation and characterisation of microcrystalline cellulose and cellulose nanocrystals from coffee husk and comparative study with rice husk. *Carbohydrate polymers*, 191, 205-215. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.022>
- Collazo-Bigliardi, S., Ortega-Toro, R., & Chiralt Boix, A. (2018b). Reinforcement of Thermoplastic Starch Films with Cellulose Fibres Obtained from Rice and Coffee Husks. *Journal of Renewable Materials*, 6(6), 599-610. <https://doi.org/10.32604/JRM.2018.00127>
- El-Sakhawy, M., & Hassan, M. L. (2007). Physical and mechanical properties of microcrystalline cellulose prepared from agricultural residues. *Carbohydrate polymers*, 67(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.04.009>
- European Commission. (2022). European Commission. [https://agriculture.ec.europa.eu/common-agricultural-policy/cap-overview/transitional-regulation\\_en](https://agriculture.ec.europa.eu/common-agricultural-policy/cap-overview/transitional-regulation_en)
- European Commission. (2004). Demonstration Plant for composting municipal sewage sludges and rice straw, and evaluation the agronomic quality of the produced compost. [https://webgate.ec.europa.eu/life/publicWebsite/index.cfm?fuseaction=search.dspPage&n\\_proj\\_id=1913](https://webgate.ec.europa.eu/life/publicWebsite/index.cfm?fuseaction=search.dspPage&n_proj_id=1913)
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2015). Compostaje: vamos a devolver algo al suelo. <https://www.fao.org/home/es>
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2017). <https://www.fao.org/3/i7964s/i7964s.pdf>
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2021). Situación Alimentaria Mundial. <https://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>

- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2021). <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QV>
- Farhoosh, R., Johnny, S., Maryam, A., Molaahmadibahraseaman, N., & Sharif, A. (2016). Structure–antioxidant activity relationships of o-hydroxyl, o-methoxy, and alkyl ester derivatives of p-hydroxybenzoic acid. *Food chemistry*, *194*, 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.003>
- Freitas, P. A., Chiralt, B. M., & González, M. M. (2022a). *Valorisation of rice straw by obtaining active compounds and cellulosic materials for the development of biodegradable food packaging systems* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València). <https://doi.org/10251/191380>
- Freitas, P. A., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2022b). Applying ultrasound-assisted processing to obtain cellulose fibres from rice straw to be used as reinforcing agents. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *76*, 102932. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.102932>
- Freitas, P. A., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2023a). Antioxidant starch composite films containing rice straw extract and cellulose fibres. *Food Chemistry*, *400*, 134073. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134073>
- Freitas, P. A., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2023b). Influence of the cellulose purification process on the properties of aerogels obtained from rice straw. *Carbohydrate Polymers*, *312*, 120805. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120805>
- Furcal, B. P., & Herrera, B. A. (2013). Efecto del silicio y plaguicidas en la fertilidad del suelo y rendimiento del arroz. *Agronomía mesoamericana*, *24*(2), 357-364. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43729228013>
- ICTA. Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. (2011). Investigadores de la Politècnica de València realizan un estudio comparativo sobre las emisiones de metano que generan el fangueo y la quema de la paja del arroz. <http://www.upv.es/noticias-upv/noticia-4482-emisiones-de-me-es.html>
- Ismail, B. B., Guo, M., Pu, Y., Wang, W., Ye, X., & Liu, D. (2019). Valorisation of baobab (*Adansonia digitata*) seeds by ultrasound assisted extraction of polyphenolics. Optimisation and comparison with conventional methods. *Ultrasonics Sonochemistry*, *52*, 257-267. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.11.023>
- Jain, N., Bhatia, A., & Pathak, H. (2013). Emission of air pollutants from crop residue burning in India, *Aerosol Air Qual. Res.*, *14*, 422–430. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2013.01.0031>
- Jordán, A., Zavala, L. M., & Gil, J. (2010). Effects of mulching on soil physical properties and runoff under semi-arid conditions in southern Spain. *Catena*, *81*(1), 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2010.01.007>
- Kaur, D., Bhardwaj Kant, N., & Lohchab Kumar, R. (2017). Prospects of rice straw as a raw material for paper making. *Waste Management*, *60*, 127-139. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.08.001>
- Kongchum, M. (2005). Effect of plant residue and water management practices on soil redox chemistry, methane emission, and rice productivity. Louisiana State University and

- Le, D. M., Sørensen, H. R., Knudsen, N. O., & Meyer, A. S. (2015). Implications of silica on biorefineries—interactions with organic material and mineral elements in grasses. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *9*(1), 109-121. <https://doi.org/10.1002/bbb.1511>
- Luque-García, J., & Luque de Castro, M. (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *22*(1), 41-47. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00102-X](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00102-X)
- Machado, I., Faccio, R., & Pistón, M. (2019). Characterization of the effects involved in ultrasound-assisted extraction of trace elements from artichoke leaves and soybean seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, *59*, 104752. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104752>
- Mansaray, K., & Ghaly, A. (1998). Thermal degradation of rice husks in nitrogen atmosphere. *Bioresource technology*, *65*(1-2), 13-20. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00031-5)
- MAPA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2017). [https://www.mapa.gob.es/en/agricultura/temas/producciones-agricolas/distribsuperf\\_prodarroznespanaporccaa\\_tcm38-135393.pdf](https://www.mapa.gob.es/en/agricultura/temas/producciones-agricolas/distribsuperf_prodarroznespanaporccaa_tcm38-135393.pdf)
- Menzel, C., González-Martínez, C., Vilaplana, F., Diretto, G., & Chiralt, A. (2020). Incorporation of natural antioxidants from rice straw into renewable starch films. *International Journal of Biological Macromolecules*, *146*, 976-986. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.222>
- Mesa, M. D., Silván, J. M., Olza, J., Gil, Á., & del Castillo, M. D. (2008). Antioxidant properties of soy protein–fructooligosaccharide glycation systems and its hydrolyzates. *Food research international*, *41*(6), 606-615. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.03.010>
- Milano, J., Ong, H. C., Masjuki, H. H., Silitonga, A. S., Chen, W. H., Kusumo, F., ... & Sebayang, A. H. (2018). Optimization of biodiesel production by microwave irradiation-assisted transesterification for waste cooking oil-Calophyllum inophyllum oil via response surface methodology. *Energy conversion and management*, *158*, 400-415. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.12.027>
- Mochidzuki, K., Sakoda, A., Suzuki, M., Izumi, J., & Tomonaga, N. (2001). Structural behavior of rice husk silica in pressurized hot-water treatment processes. *Industrial & engineering chemistry research*, *40*(24), 5705-5709. <https://doi.org/10.1021/ie0100683>
- Monteiro, S. N., Calado, V., Margem, F. M., & Rodriguez, R. J. (2012). Thermogravimetric stability behavior of less common lignocellulosic fibers—a review. *Journal of Materials Research and Technology*, *1*(3), 189-199. [https://doi.org/10.1016/S2238-7854\(12\)70032-7](https://doi.org/10.1016/S2238-7854(12)70032-7)
- Moreno, O., Gil, À., Atarés, L., & Chiralt, A. (2017). Active starch-gelatin films for shelf-life extension of marinated salmon. *Lwt*, *84*, 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.005>

- Mousavi, S. M., Hosseini, S. Z., Resalati, H., Mahdavi, S., & Garmaroody, E. R. (2013). Papermaking potential of rapeseed straw, a new agricultural-based fiber source. *Journal of Cleaner Production*, *52*, 420-424. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.02.016>
- Mulumba, L. N., & Lal, R. (2008). Mulching effects on selected soil physical properties. *Soil and Tillage Research*, *98*(1), 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.still.2007.10.011>
- Ong, E. S., Cheong, J. S., & Goh, D. (2006). Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *Journal of Chromatography A*, *1112*(1-2), 92-102. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.052>
- Panyakaew, S., & Fotios, S. (2011). New thermal insulation boards made from coconut husk and bagasse. *Energy and buildings*, *43*(7), 1732-1739. <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2011.03.015>
- Peanparkdee, M., & Iwamoto, S. (2019). Bioactive compounds from by-products of rice cultivation and rice processing: Extraction and application in the food and pharmaceutical industries. *Trends in Food Science & Technology*, *86*, 109-117. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.041>
- Plaza, M., Amigo-Benavent, M., del Castillo, M. D., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2010). Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Research International*, *43*(10), 2341-2348. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.036>
- Ponnamperuma, F. (1984). Effects of flooding on soils. *Flooding and plant growth*, *10*, 45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-424120-6.50007-9>
- Quero, E. (2008). Quero, E. 2008. Silicio en la producción de chile. La biosilificación proceso biológico fundamental en la productividad vegetal. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43729228013>
- Ramos, M., Laveriano, E., San Sebastián, L., Perez, M., Jiménez, A., Lamuela-Raventos, R. M., ... & Queralt, A. V. (2022). Rice straw as a valuable source of cellulose and polyphenols: Applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224422004563>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, *26*(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Requena, R., Vargas, M., & Chiralt, A. (2019a). Study of the potential synergistic antibacterial activity of essential oil components using the thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay. *Lwt*, *101*, 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.093>
- Requena, R., Jiménez-Quero, A., Vargas, M., Moriana, R., Chiralt, A., & Vilaplana, F. (2019b). Integral fractionation of rice husks into bioactive arabinoxylans, cellulose nanocrystals, and silica particles. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *7*(6), 6275-6286. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b06692>
- Ribó, M., Albiach, R., Pomares, F., & Canet, R. (2017). Alternativas de gestión de la paja de arroz en la Albufera de Valencia. *Vida rural*, (430), 56-60.



[https://redivia.gva.es/bitstream/handle/20.500.11939/5895/2017\\_Ribó\\_Alternativas.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://redivia.gva.es/bitstream/handle/20.500.11939/5895/2017_Ribó_Alternativas.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- Robinson, D. W. (1988). Mulches and herbicides in ornamental plantings. *HortScience*, 23(3), 547-552. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.23.3.547>
- Sadh, P. K., Chawla, P., Bhandari, L., & S., D. J. (2017). Bio-enrichment of functional properties of peanut oil cakes by solid state fermentation using *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 622-633. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9675-2>
- Sluiter, A., Hames, B., R., R., Scarlata, C., J., S., Templeton, D., & Crocker, D. (2008). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure*, 1617(1), 1-16. [https://www.researchgate.net/publication/285273316\\_Determination\\_of\\_structural\\_carbohydrates\\_and\\_lignin\\_in\\_biomass\\_in\\_Laboratory\\_Analytical\\_Procedure\\_LAP](https://www.researchgate.net/publication/285273316_Determination_of_structural_carbohydrates_and_lignin_in_biomass_in_Laboratory_Analytical_Procedure_LAP)
- Sticklen, M. B. (2008). Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature reviews genetics*, 9(6), 433-443. <https://doi.org/10.1038/nrg2336>
- Theng, D., Arbat, G., Delgado-Aguilar, M., Ngo, B., Labonne, L., Evon, P., & Mutjé, P. (2017). Comparison between two different pretreatment technologies of rice straw fibers prior to fiberboard manufacturing: Twin-screw extrusion and digestion plus defibrillation. *Industrial Crops and Products*, 107, 184-197. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.049>
- Torres-Valenzuela, L. S., Ballesteros-Gómez, A. M., & Rubio, S. (2020). Green solvents for the extraction of high added-value compounds from agri-food waste. *Food Engineering Reviews*, 12, 83-100. <https://doi.org/10.1007/s12393-019-09206-y>
- Tripathi, B. (2013). Knowledge management tools of rice technology in Nepal. *Agronomy Journal of Nepal*, 2, 24-30. <https://doi.org/10.3126/ajn.v2i0.7518>
- Turney, J., & Menge, J. (1994). *Root Health--Mulching to Control Root Disease in Avocado and Citrus. The California Avocado Society. Circ. No. CAS-94/2.* [http://www.avocadosource.com/papers/research\\_articles/turneyjerrold1994.pdf](http://www.avocadosource.com/papers/research_articles/turneyjerrold1994.pdf)
- Valencia Huancas, M. J. (2018). Utilización de la paja de arroz en la técnica del compost, en el periodo Alfa Geme-Caserío Alto de la Cruz-Distrito de la Arena-Provincia de Piura. <https://repositorio.uap.edu.pe/xmlui/handle/20.500.12990/5620>
- Visconti, F., Peiró, E., Nájera, I., Baixauli, C., Romero, P., & de Paz, J. (2021). Beneficios del acolchado con paja de arroz para la fertilidad del suelo y el secuestro de carbono en plantaciones de cítricos. *Levante Agrícola*, (456), 73-80. <http://hdl.handle.net/20.500.11939/7575>
- Wang, Y., Juliani, H. R., Simon, J. E., & Ho, C. T. (2009). Amino acid-dependent formation pathways of 2-acetylfuran and 2, 5-dimethyl-4-hydroxy-3 [2H]-furanone in the Maillard reaction. *Food chemistry*, 115(1), 233-237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.014>

- Wu, C. H., & Yen, G. C. (2005). Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(8), 3167-3173. <https://doi.org/10.1021/jf048550u>
- Wu, Q., Yao, F., Xu, X., Mei, C., & Zhou, D. (2013). Thermal degradation of rice straw fibers: global kinetic modeling with isothermal thermogravimetric analysis. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19(2), 670-676. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2012.10.026>
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H., & Zheng, C. (2007). Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 86(12-13), 1781-1788. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.12.013>
- Yunus, R., Salleh, S. F., Abdullah, N., & Biak, D. R. (2010). Effect of ultrasonic pre-treatment on low temperature acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch. *Bioresource technology*, 101(24), 9792-9796. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.074>
- Zhang, H., He, Z., & Ni, Y. (2011). Improvement of high-yield pulp properties by using a small amount of bleached wheat straw pulp. *Bioresource technology*, 102(3), 2829-2833. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.053>
- Zhao, X., Tian, R., Zhou, J., & Liu, Y. (2022). Multifunctional chitosan/grape seed extract/silver nanoparticle composite for food packaging application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 207, 152-160. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.180>