



**UNIVERSIDAD
DE BURGOS**

Facultad de Ciencias



UNIVERSIDAD DE BURGOS
FACULTAD DE CIENCIAS
GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
TRABAJO DE FIN DE GRADO
Curso 2021-2022

**ESTUDIO DE RECUPERACIÓN DE ÁCIDO
GALACTURÓNICO DE RESIDUOS DE PIEL DE
CEBOLLA MEDIANTE UN PROCESO COMBINADO DE
EXTRACCIÓN CON AGUA SUBCRÍTICA Y
DIAFILTRACIÓN**

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos

Área de Ingeniería Química

Tutoras: María Olga Ruiz Pérez y Óscar Benito Román

Laura Inés Tejera Ramos

Julio 2022



UNIVERSIDAD
DE BURGOS

Facultad de Ciencias

VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL
TRABAJO FIN DE GRADO ⁽¹⁾

GRADO EN: CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
CURSO: 2021-2022

Dña. María Olga Ruíz Pérez y D. Óscar Benito Román, Tutores Académicos, informan de que el alumno Dña. Laura Inés Tejera Ramos, ha realizado el Trabajo Fin de Grado que lleva por título "Estudio de recuperación de ácido galacturónico de residuos de piel de cebolla mediante un proceso combinado de extracción con agua subcrítica y diafiltración"

bajo su tutela y consideran que la memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO *

(* En caso negativo, indíquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 4 de julio de 2022

Firmado digitalmente
por RUIZ PEREZ MARIA
OLGA - 13130364D
Fecha: 2022.07.04
19:58:13 +02'00'

Fdo.: María Olga Ruíz Pérez

**BENITO
ROMAN
OSCAR -
71271700J**

Firmado
digitalmente por
BENITO ROMAN
OSCAR - 71271700J
Fecha: 2022.07.04
22:31:10 +02'00'

Fdo.: Óscar Benito Román

(1) Las memorias presentadas deberán contar con el visto bueno de los tutores. A tal efecto, **se incluirá en la contraportada este documento con la firma de los mismos**. (Regulación del reglamento interno de la facultad de ciencias para la gestión de la asignatura "Trabajo Fin de Grado" de la Facultad de Ciencias, aprobada en Junta de Facultad de 11 de febrero de 2022)

AGRADECIMIENTOS

El trabajo presentado en esta memoria de TFG ha sido desarrollado en el seno del Grupo de Investigación Biotecnología Industrial y Medioambiental, reconocido por la UBU (GIR-UBU BIOIND) y por la Junta de Castilla y León como Unidad de Investigación Consolidada UIC-128, en el marco de los siguientes proyectos de investigación:

PID2019-104950RB-I00 - Valorización de subproductos marinos mediante tecnologías de fluidos sub- y supercríticos para la obtención de biocompuestos valiosos, financiado por la Agencia Estatal de Investigación.

BU050P20 - Valorización de la fracción proteica de subproductos de la industria agroalimentaria de Castilla y León mediante tecnologías de fluidos presurizados, financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

PID2020-116716RJ-I00 - Tecnologías de fluidos presurizados para la valorización de subproductos de la industria agroalimentaria: recuperación de pectina y otros compuestos bioactivos de alto valor, financiado por la Agencia Estatal de Investigación.

ÍNDICE

ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Pectinas	2
1.2. Extracción con agua subcrítica	3
1.3. Separación con membranas	4
2. OBJECTIVES	6
3. PARTE EXPERIMENTAL	6
3.1. Materiales	6
3.2. Proceso de extracción con agua subcrítica (PLE)	7
3.3. Proceso de ultrafiltración y de diafiltración	8
3.3.1. <i>Experimentos a recirculación total</i>	10
3.3.2. <i>Experimentos de diafiltración</i>	10
3.4. Métodos analíticos	11
3.4.1. <i>Fracción de oligosacáridos y compuestos orgánicos de degradación</i>	11
3.4.2. <i>Determinación del pH</i>	11
3.5. Análisis estadístico	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4.1. Hidrolizado de agua subcrítica (SWH)	12
4.2. Efecto del tamaño del poro de la membrana en la ultrafiltración del SWH	14
4.2.1. <i>Estudio del flujo de permeado y del ensuciamiento</i>	14
4.2.2. <i>Estudio de la capacidad de retención de la membrana</i>	15
4.3. Efecto de la presión transmembrana en la ultrafiltración del SWH	17
4.4. Resultados del proceso de diafiltración del SWH	19
5. CONCLUSIONES	21
6. BIBLIOGRAFÍA	22

ABSTRACT

In this work the feasibility of a diafiltration process using tubular ceramic membranes for the recovery of galacturonic acid, extracted from onion skin wastes, has been studied.

In the first stage of the work, galacturonic acid (which is the main component of pectin) was extracted from onion skin wastes (OSW) using subcritical water. In each experiment, 15 g of OSW were mixed with 0,35 L of water in a high-pressure extractor and heated up to 145 °C and 40 bar for 45 min. The liquid extract was characterized in terms of composition by HPLC, in order to quantify the amount of galacturonic acid extracted (either in monomeric or oligomeric form) and the impurities co-extracted: free sugars (monosaccharides), organic acids (mainly formic and acetic) and other degradation products such as furfural and HMF formed from the degradation of the sugars present in the raw material.

In the second stage of this work the aim was to study the separation of the oligomeric galacturonic acid from these impurities. For that purpose, multichannel ceramic membranes (Tami Industries) with an active layer of TiO₂ and 132 cm² of effective area were used. The molecular weight cut off (MWCO) of the selected membranes were 1, 5 and 50 kDa. Feed flowrate was set at 15 L/h and transmembrane pressure (TMP, in the range from 0.2 to 1.25 bar) was adjusted to the desired values by using a valve placed after the membrane module. Permeate fluxes (J_p) were determined volumetrically under different operating conditions. The retention of galacturonic acid (either in monomeric or oligomeric form were calculated), as well as that of the impurities was calculated. All the experiments were carried out at 25 °C and in total recirculation mode.

It was found that the higher the MWCO, the higher the permeate flow rate, leading to a final flux of permeate constant due to the high degree of fouling observed on the membrane. It was also observed a dramatic decrease in the permeate flux when using the subcritical water extract (< 90 %) compared to that obtained when distilled water was used. This fact indicated an important membrane fouling due to the presence of colloidal matter. This fouling resulted to be reversible, since after chemical cleaning, the membrane recovered the full filtration capacity, evaluated in terms of permeate flux using water. All in all, a retention of oligomeric galacturonic acid higher than 70% was obtained when the MWCO was 1 kDa, which was reduced to 50 % when either the 5 or 50 kDa membranes were used.

Then, in order to complete the separation of the oligomeric galacturonic acid and the low molecular weight purities a diafiltration process using the 50 kDa membrane was carried out. After 480 min of experiment the complete removal of the impurities was obtained, leading to a retentate rich in oligomeric galacturonic acid.

Keywords: oligosaccharide fractionation; membrane fouling; solid byproduct valorisation; biorefinery.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se está produciendo un cambio en lo referente al consumo de alimentos más saludables, para lo cual es necesario que estén enriquecidos con ingredientes naturales. Es por ello, que se necesitan nuevas fuentes de ingredientes bioactivos que cumplan esa función. En paralelo, dentro del sector agroalimentario, una gran parte de los productos hortofrutícolas son desechados, terminando en vertederos, a pesar de ser ricos en compuestos bioactivos. Esto provoca la generación de grandes cantidades de materia contaminante que podría ser utilizada como subproductos potencialmente valorizables.

Teniendo en cuenta, la Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, sobre los residuos, establece que: “es importante favorecer la valorización de los residuos y la utilización de materiales valorizados a fin de preservar los recursos naturales”. Su desarrollo busca contribuir a la transformación de los países miembros de la UE en una “sociedad de reciclado”, evitándose así la generación de residuos y el uso de los mismos como un recurso valorizable [1], permitiendo esto transformar a los residuos en subproductos [2].

En este sentido, las de pieles de cebolla son residuos sólidos industriales con gran potencial, debido a que contienen compuestos bioactivos que podrían ser empleados en diferentes aplicaciones tanto en la industria alimentaria, como en la farmacéutica y en la química. Se destacan como compuestos bioactivos presentes en este residuo, los compuestos organosulfurados (OSC) principalmente tiosulfatos, la quercetina y otros compuestos fenólicos, los fructooligosacáridos (FOS), la pectina y otros componentes estructurales [3]. Por otra parte, la generación de este residuo es elevada debido a que un 10 % del peso de las cebollas corresponde a sus pieles, siendo los datos de producción anual de cebollas en 2020 en España de 1.319.800 toneladas, de 10.362.668 toneladas a nivel europeo y de 104.554.458 toneladas a nivel mundial [4]. Estas pieles se están tratado como un residuo ya que no se pueden emplear ni para fines agrícolas, como por ejemplo para abono, ni para alimentación animal, debido a la presencia de compuestos sulfurados. Es por ello que sería una buena alternativa revalorizar la piel de cebolla como un subproducto para la obtención de los compuestos bioactivos mencionados, entre los cuales se encuentra la fracción de pectina. Se requiere la búsqueda de nuevas fuentes y métodos de extracción para la producción de pectina a partir de productos naturales por la demanda existente, tanto por la industria alimentaria como por la industria farmacéutica, y se ha estimado que esta demanda alcance las 40.000 toneladas anuales, con un crecimiento anual de alrededor del 5 % [5]. Por esta razón, es interesante el empleo de la piel de cebolla como fuente natural para la obtención de pectina consiguiéndose además la revalorización del residuo, la cual va a contribuir a la sostenibilidad ambiental ya que transformaríamos la piel de cebolla en un subproducto.

1.1. Pectinas

La pectina es un heteropolisacárido formado por distintos dominios interrelacionados y que forma parte de la pared celular de las plantas. La cantidad relativa y la estructura de la pectina depende del origen botánico, los órganos y tipos de células consideradas, etapas de desarrollo celular, la ubicación en la pared celular y, de forma indirecta, el método de extracción empleado [6].

La pectina está constituida principalmente por ácido D-galacturónico, el cual se encuentra unido a diversos azúcares neutros como la ribosa, galactosa, arabinosa y sacarosa. Estructuralmente la pectina está formada por tres dominios que serán descritos a continuación [6-9].

- i. Homogalacturonano (HG): Es un homopolímero lineal de residuos ácido α -D-galacturónico unidos mediante enlaces glucosídicos α (1 \rightarrow 4). Este dominio es el más simple y abundante en la pectina, representando entre el 75 – 100 % de la pectina. Además, este dominio constituye la cadena principal de la pectina.
- ii. Ramnogalacturonano I (RG-I): Este dominio representa entre el 10 – 25 % de la pectina. Se encuentra en la región más ramificada, la cual contiene una alta cantidad de azúcares neutros (arabinosa, galactosa, manosa). Su columna vertebral está formada por la repetición del disacárido de ramnosa y ácido galacturónico.
- iii. Ramnogalacturonano II (RG-II): Es el dominio más conservado y extendido de las planta, además de ser la rama más compleja. Representa entre el 0 – 10 % de la pectina.

Los dominios RG-I y RG-II se denominan región peluda de la pectina, mientras que el dominio HG se denomina región lisa de la pectina [6-9].

Como se ha comentado anteriormente, las pectinas están constituidas principalmente por ácido galacturónico siendo este ácido y sus derivados de gran interés en diversas aplicaciones industriales. Un ejemplo es en la industria alimentaria como agente espesante, y otro ejemplo sería en la industria farmacéutica para la producción de vitamina C.

Hay que añadir que para poder emplear la pectina en diferentes aplicaciones alimentarias o farmacéuticas es necesario que la cantidad mínima de ácido galacturónico que contiene en su estructura sea del 65 %, ya que si esta cantidad de ácido es inferior no se considera que es una pectina como tal. La cantidad de ácido galacturónico que contienen las pectinas va a determinar el grado de pureza de éstas junto al grado de metilación para que sean destinadas para un uso u otro en las diferentes industrias que emplean las pectinas en la fabricación de diversos productos [10,11].

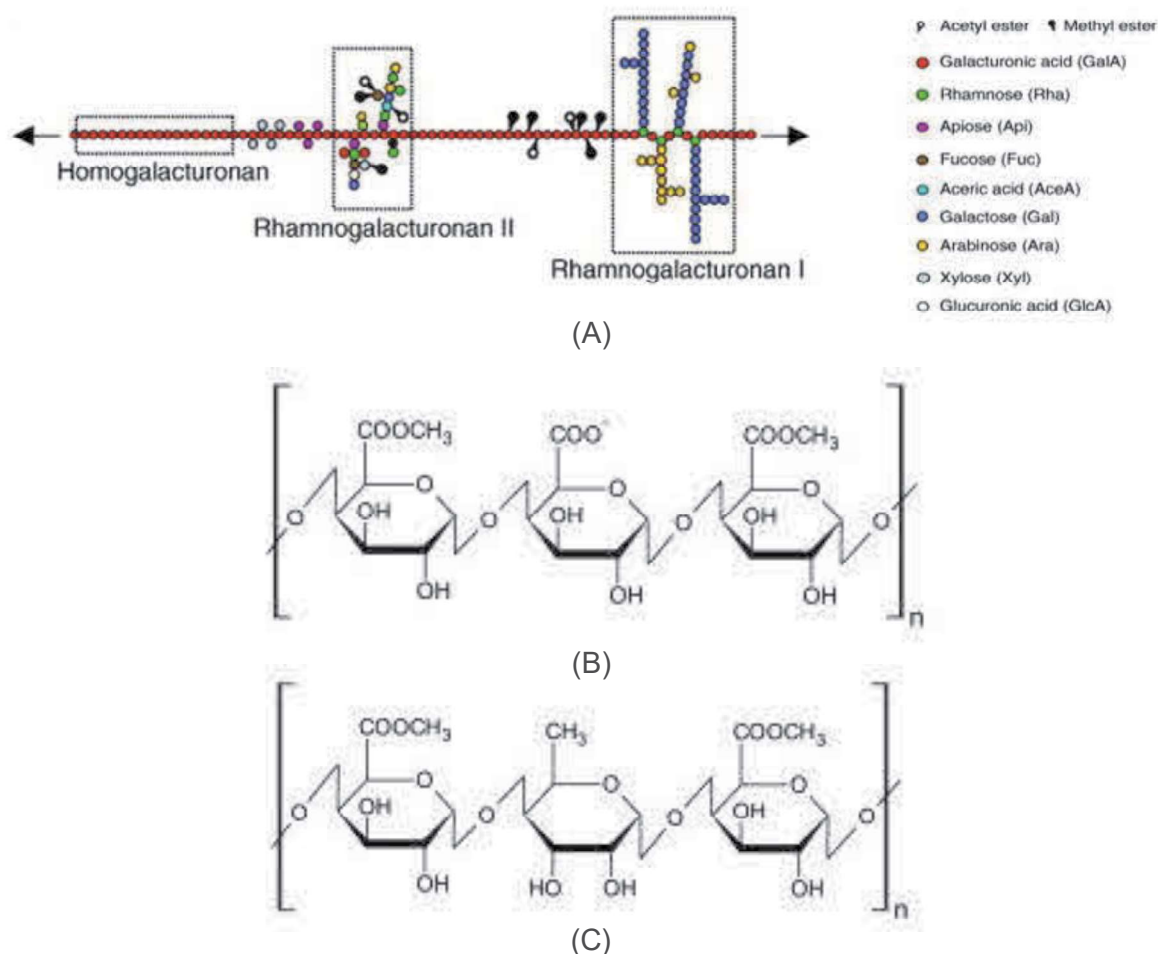


Figura 1. Representación de (A) la estructura de la pectina, (B) la estructura del homogalacturonano y (C) la estructura del rhamnogalacturonano.

De forma convencional, el proceso para la extracción de pectinas se basa en una extracción acuosa (a pH 2, conseguido mediante el empleo de un ácido inorgánico y a temperaturas en torno a 85 - 90 °C). Tras la extracción, las pectinas disueltas en el medio acuoso se precipitan mediante la adición de un alcohol. Este proceso a escala industrial genera gran cantidad de residuos (corrientes acuosas ácidas o mezclas etanol agua). Es por ello que se necesiten medios de extracción alternativos como microondas, ultrasonidos, agua subcrítica. Las principales ventajas que presentan los métodos de extracción novedosos, en comparación con los métodos de extracción convencionales son que se consigue una extracción más eficiente, son respetuosos con el medio ambiente y el tiempo de extracción se ve reducido [12-14].

1.2. Extracción con agua subcrítica

Entre todos los métodos de extracción de pectinas el agua subcrítica es muy prometedor, debido a sus propiedades. El agua subcrítica se define como agua que se encuentra en estado líquido a una temperatura superior a la de ebullición (100 °C) e inferior a la temperatura crítica (374 °C) mediante la aplicación de altas presiones [12,14]. En condiciones subcríticas las siguientes propiedades del agua se ven modificadas: la constante de ionización, la difusividad, la viscosidad, la polaridad, de la tensión superficial y de la densidad. La aplicación de altas temperaturas en combinación con las altas presiones permite al agua penetrar en la matriz de la muestra aumentado así su solubilidad y la transferencia de masa a la vez que se reduce la viscosidad del solvente y su tensión superficial [14]. Por esta razón, la extracción con agua subcrítica es una buena opción para la extracción de compuestos bioactivos presentes en

vegetales [12,13,15], además de favorecerse las reacciones de hidrólisis al aumentar el producto iónico del agua.

Además de las ventajas mencionadas anteriormente, la extracción con agua subcrítica permite la recuperación de compuestos bioactivos sin la necesidad de utilizar disolventes orgánicos y sin generar líquidos residuales, lo que hace que esta técnica de extracción este englobada dentro de las tecnologías verdes o respetuosas con el medio ambiente.

La extracción con agua subcrítica es una técnica que ya se ha empleado para la recuperación de las pectinas y de polisacáridos de diversas matrices vegetales. El rendimiento de extracción de la pectina con los métodos tradicionales se encuentra entorno al 2,4 - 21,7 %, mientras que con el agua subcrítica se encuentra alrededor de 0,72 - 4,88 % [12], con lo cual el rendimiento de extracción con agua subcrítica se encuentra dentro del rango de las técnicas convencionales, pero estas técnicas tradicionales como se ha comentado anteriormente suponen un tratamiento más agresivo en la extracción de la pectina y una mayor contaminación ambiental. Por ello, la extracción con agua subcrítica es una buena alternativa para obtener un buen rendimiento en la extracción de la pectina con una menor contaminación ambiental. Algunas de las investigaciones que han utilizado la extracción de pectina con agua subcrítica son las que han llevado a cabo Rincón et al. [13] con los residuos de poda de laurel determinaron que a 160 °C durante 5 min se consigue un polímero enriquecido con carbohidratos con un alto contenido en pectinas, que conservan los ácidos fenólicos que se encuentran adheridos a su estructura, Mohd Rasidek et al. [12] con la cáscara del plátano determinaron que el mejor rendimiento de extracción de la pectina se consigue a 140 °C cuando se somete la cáscara del plátano a esta temperatura durante 5 min, Zhang et al. [15] con pulpa de manzana determinaron que el mejor rendimiento de extracción de la pectina se consigue a 140 °C. Un inconveniente que se ha encontrado a la hora de realizar extracciones con agua subcrítica es la hidrólisis de la propia pectina y la formación de productos de degradación, tales como ácidos orgánicos, HMF o furfural. Estos productos de degradación deben ser eliminados para poder tener una pectina lo más pura posible, por ello se emplea como alternativa a la separación de dichos productos el uso de membranas, las cuales permitirán separar la pectina, en función de su peso molecular, de los productos de degradación.

1.3. Separación con membranas

La tecnología de separación con membranas está englobada dentro de las tecnologías limpias y respetuosa con el medio ambiente debido a que presenta un bajo consumo energético, no requiere del uso de disolventes orgánicos para la separación de los compuestos de interés, y produce una baja emisión de residuos [16]. Además, esta tecnología permite una separación en continuo, una fácil combinación con otras etapas del proceso productivo industrial y su inversión es baja en comparación con otras técnicas de separación [17]. Por estas razones, ha sido seleccionada en este trabajo como técnica de separación para estudiar el fraccionamiento de los hidrolizados de agua subcrítica (Subcritical Water Hydrolysate, SWH) obtenidos a partir de residuos de piel de cebolla, con el objetivo de evaluar la posibilidad de separar la fracción oligomérica del ácido galacturónico de mayor peso molecular, que es el principal constituyente de las pectinas, del resto de componentes presente en el hidrolizado. Entre todos los procesos de separación con membranas, los impulsados por una diferencia de presión, denominados como procesos de filtración con membranas, son ya ampliamente utilizados para diversas aplicaciones y su clasificación se muestra en la Figura 2. Un parámetro que se debe tener en cuenta a la hora de trabajar con la tecnología de filtración con membranas es el tamaño de poro de la membrana, que será seleccionado en función del peso molecular de los constituyentes del SWH. Las membranas de microfiltración permiten la separación de moléculas con un tamaño comprendido entre 0,05 - 10 μm (macromoléculas con un peso molecular > 200 kg/mol) y las de ultrafiltración permiten retener moléculas con un peso molecular entre 1 - 200 kg/mol, considerándose membranas de ultrafiltración fina aquellas que tienen un tamaño de poro inferior a 10 kDa. La membranas que se utilizan en la nanofiltración permiten separar moléculas con un diámetro inferior a 1 nm o lo que es lo mismo separa moléculas con un peso molecular inferior a 1 kg/mol. Por último, en los procesos de

ósmosis inversa se consiguen retener incluso sales disueltas [17]. En cuanto a las membranas, se dispone comercialmente de un gran abanico de tipos de membranas y configuraciones, siendo las membranas orgánicas en configuración plana o tubular las más utilizadas a nivel industrial. En la actualidad, debido a la vida útil limitada que presentan las membranas orgánicas, se están empezando diversos estudios para sustituir las membranas orgánicas por inorgánicas. En este sentido, es importante indicar que las membranas inorgánicas cerámicas son químicamente estables en medios ácidos y básicos ($1 < \text{pH} < 14$) y soportan altas temperaturas (150-180 °C) sin sufrir ningún cambio estructural. Estas características especiales de las membranas inorgánicas cerámicas hacen que puedan ser potencialmente aptas para acoplarse en continuo al reactor de extracción con agua subcrítica [18].

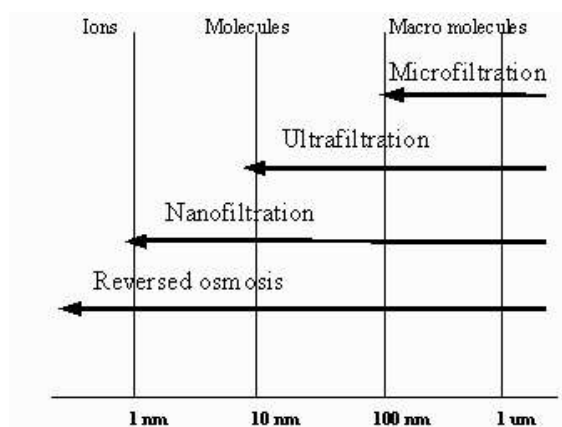


Figura 2. Representación gráfica de los diversos tipos de procesos de filtración con membrana en función del tamaño de poro.

La ultrafiltración (UF) ha resultado ser una técnica eficiente de separación en la recuperación de pectinas de extractos acuosos a partir de matrices vegetales, pero el corte molecular de la membrana que se ha utilizado ha sido muy diferente según la procedencia del extracto de pectinas. Neggaz et al. [19] consiguieron buenos resultados de retención empleando membranas con un corte molecular de 10 kDa y 50 kDa a partir de disoluciones sintéticas de pectina, Qiu et al. [20] utilizaron membranas con un corte molecular comprendido entre 5 – 300 kDa para conseguir una buena separación de los extractos de pectinas a partir de manzana, pero Gómez et al. [11] tuvieron que utilizar una membrana con un corte molecular de 1 kDa para las disoluciones de pectinas obtenidas a partir de residuos de cáscara de limón, sin embargo, Kang et al. [21] necesitaron una membrana con un corte molecular de 8 kDa para obtener una retención suficiente de la pectina procedente del girasol.

Un inconveniente para la aplicación de la UF en la separación de pectinas y oligosacáridos ha sido el ensuciamiento de la membrana [19]. Hay que destacar que en función del tamaño del poro, la membrana actuará de una forma u otra acarreando restricciones en los diversos tipos de filtración que se pueden llevar a cabo, siendo las restricciones debidas a la polarización de la concentración de polisacáridos, como es el caso de la pectina, provocando la formación de un gel en la membrana y aumentando así el ensuciamiento de ésta. Por este motivo, entre otros, antes de seleccionar una membrana hay que conocer cuáles son exactamente las características del producto que se quiere estudiar mediante la separación con membranas [17]. También hay que indicar que se requiere realizar una optimización de los parámetros de operación tales como, la presión transmembrana (PTM), la temperatura y la velocidad tangencial y así reducir los efectos de ensuciamiento y aumentar la densidad de flujo de permeado durante la UF. Un cambio en la temperatura y en la velocidad tangencial, en muchas ocasiones, no mejora sustancialmente el proceso de filtración cuando se trabaja en con disoluciones ricas en oligosacáridos [22]. Sin embargo, la PTM puede ser un parámetro que puede contribuir a mejorar la densidad de flujo de permeado de los extractos en estudio [19].

2. OBJECTIVES

The main purpose of this work has been to study the feasibility of a diafiltration process using tubular ceramic membranes for the recovery of galacturonic acid extracted from onion skin wastes using subcritical water.

In order to achieve this main goal, the work has been divided in the following partial objectives:

- i. Study of the extraction process of galacturonic acid using subcritical water (145 °C, 40 bar). For this partial objective, it has been necessary to learn how to handle a high pressure and temperature batch extractor.
- ii. Identify and quantify the main components present in the extract (galacturonic acid, either in monomeric or oligomeric form; and impurities) by HPLC.
- iii. Evaluate the separation efficiency between galacturonic acid and the impurities using the membrane technology, studying the effect of the main parameters: the membrane pore size and the transmembrane pressure, in a total recirculation mode experiments.
- iv. Evaluate the feasibility of diafiltration as a purification process in order to obtain a complete purification of the high molecular weight galacturonic acid oligomers.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales

El residuo utilizado como materia prima en este trabajo fue un triturado de pieles de cebolla, proporcionado por la empresa Embutidos Cardeña, después de un proceso de extracción de compuestos fenólicos. En la Tabla 1 se muestran los resultados de composición de dicho residuo, siendo éste el empleado para obtener el SWH.

Tabla 1. Composición del residuo de la piel de cebolla utilizada como materia prima para la obtención del SWH [23].

COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN (g / 100 g)
Glucano	33,3 ± 0,2
Arabinano	1,6 ± 0,1
Galactano	2,0 ± 0,2
Xilano	2,1 ± 0,1
Rhamnano	0,90 ± 0,03
Ácido glucurónico	0,16 ± 0,02
Ácido galacturónico	18,9 ± 0,3
Lignina total	16,3 ± 0,6
Lignina soluble	10,5 ± 0,4
Lignina insoluble	5,9 ± 0,2
Proteína total (PT)	3,2 ± 0,4
Carbono total (C)	40,3 ± 0,3
Hidrógeno total (H)	5,6 ± 0,1
Nitrógeno total (N)	0,7 ± 0,1
Oxígeno total (O)	44,8 ± 0,7
Ratio H/C	1,68 ± 0,04
Ratio O/C	0,80 ± 0,01
Cenizas total	8,5 ± 0,3

En la Figura 3, se muestran las fotografías de la piel de la cebolla y del triturado de piel de cebolla, el cual se empleó para obtener el SWH.

Los compuestos químicos utilizados a lo largo de la investigación han sido los siguientes: hidróxido de sodio (Labkem); Ácido fosfórico (Corfacas S.A. al 76 %); Ácido sulfúrico (VWR, BDH Chemicals al 72 %); Carbonato cálcico (VWR, BDH Chemicals). Estos compuestos químicos se han empleado tal y como los proporciona el fabricante, sin ser sometidos a un proceso de purificación durante el desarrollo de este trabajo.

Los materiales básicos de laboratorio que se han utilizado son probetas, vasos de precipitado, agitador, termómetro de mercurio, baño termostático Ultraterm (P. Selecta), matraz aforado, pipetas, balanza Radwag PS 1000/C/2 con error de ± 0,001 g y agua ultrapura.



(A)



(B)

Figura 3. Fotografías de la (A) piel de la cebolla y (B) triturado de piel de cebolla.

3.2. Proceso de extracción con agua subcrítica (PLE)

El equipo utilizado para la obtención del extracto del triturado de piel de cebolla mediante la extracción en condiciones subcríticas, está representado en la Figura 4. Además, hay que indicar que fue diseñado por el propio equipo de investigación BIOIND. Las características que presenta dicho equipo es que permite la extracción de compuestos bioactivos con líquidos presurizados en discontinuo, con un volumen de 0.5 L y fabricado en acero inoxidable. Permite trabajar a una temperatura máxima de 250 °C y a una presión máxima de 70 bar. Este equipo consta de una resistencia eléctrica como sistema de calentamiento, un manómetro, una válvula que permite la entrada de nitrógeno (empleado para presurizar el sistema a la presión de trabajo), una placa agitadora, una válvula de purga y una válvula de extracción por la cual se obtiene el extracto.



Figura 4. Fotografía del equipo de extracción con agua subcrítica utilizado para la obtención del hidrolizado de triturado de piel de cebolla.

Para la obtención del extracto se mezclaron 15 g de triturado de piel de cebolla (tamaño de partícula < 1 mm) con 0,35 L de agua destilada. Esta mezcla se sometió a las condiciones subcríticas, a una temperatura de 145 °C durante 45 min, con una presión de 40 bar. Estas condiciones de trabajo han sido definidas en investigaciones previas a la realización de este

trabajo. Benito Román et al. [23] demostraron que la extracción con agua subcrítica a 145 °C es la temperatura a la cual se consigue extraer aproximadamente el 50% del ácido galacturónico presente en el triturado de piel de cebolla y que el uso de temperaturas superiores a 145 °C no mejora la extracción de dicho compuesto.

Al finalizar el proceso de extracción, se dejó enfriar el reactor a temperatura ambiente y se procedió a su apertura. Posteriormente, se separó el extracto líquido del sólido agotado, mediante filtración con tela filtrante. El extracto líquido así obtenido se conservó a una temperatura de congelación, de -20 °C, y se dividió en frascos con una capacidad volumétrica de 0,2 L. De esta forma se evitó la degradación de los compuestos que se encuentran en el hidrolizado ya que la mayor parte de estos compuestos son azúcares, los cuales a temperatura ambiente pueden fermentar y, también, puede tener lugar la aparición de mohos. Este extracto líquido es el hidrolizado de agua subcrítico empleado como alimentación para el estudio de UF.

3.3. Proceso de ultrafiltración y de diafiltración

El equipo utilizado para la realización de los experimentos de fraccionamiento con membrana del SWH está representado en la Figura 5. Este equipo consta de un tanque de vidrio encamisado, de 0,5 L con la alimentación, el cual se conectó a un baño termostático que permitió mantener la alimentación a una temperatura constante. Esta alimentación fue impulsada con una bomba peristáltica (Masterflex L/S, modelo 77201-62) hasta el módulo de membrana. En el sistema se instalaron dos manómetros, uno a la entrada y otro a la salida del módulo de membrana, y una válvula que permitió regular la presión transmembrana. Todas las tuberías del equipo fueron de gomas de silicona (MasterFlex LS 15) con un diámetro interno de 4,8 mm.

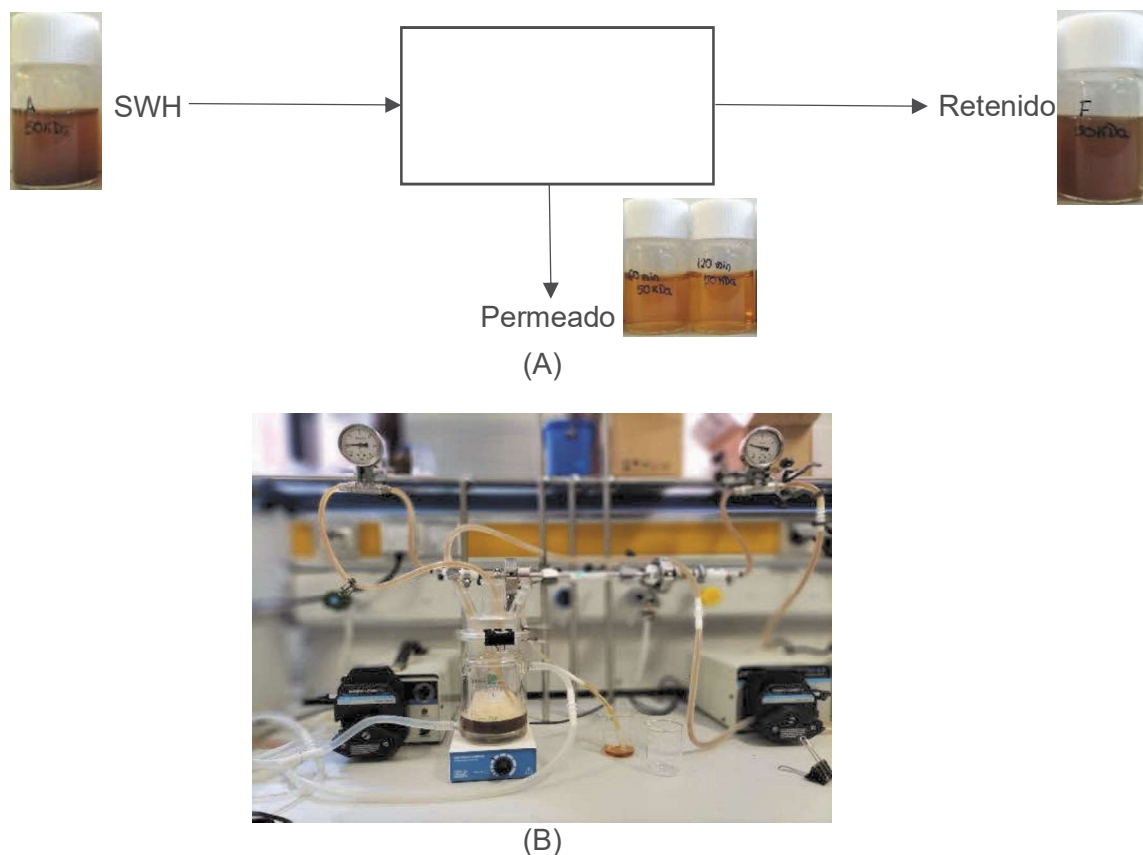


Figura 5. (A) Representación esquemática del diagrama de flujo de funcionamiento y (B) fotografía del equipo empleado en los experimentos UF y DF

Todos los experimentos de filtración se realizaron empleando membranas cerámicas inorgánicas ultraporosas de TiO₂, soportadas en titania (Tami, Francia). Se trata de membranas tubulares multicanal de siete canales, con un diámetro externo de 1 cm, de 0,2

cm de diámetro hidráulico cada canal, con un área de membrana de 132 cm² y una longitud de 25 cm. Las membranas utilizadas tuvieron un tamaño de poro comprendido entre 1 kDa y 50 kDa.



Figura 6. Fotografía de las membranas cerámicas de TiO₂ multicanal (7 canales) empleadas en los experimentos de UF y DF realizados durante este trabajo.

La PTM se determinó con la medida de la presión proporcionada por los manómetros instalados a la entrada y salida del módulo de membrana, utilizando la Ecuación 1.

$$PTM = \frac{P_E + P_S}{2} \quad (1)$$

donde, P_E es la presión medida con manómetro a la entrada del módulo de membrana, P_S es la presión medida con el manómetro a la salida del módulo de membrana.

La densidad de flujo permeado se midió por gravimetría (balanza electrónica Radwag PS 1000/C/2) en los tiempos establecidos. Para determinar la densidad del flujo de permeado (J_P) se calculó utilizando la Ecuación 2.

$$J_P = \frac{m_P}{A_m \cdot t} \quad (2)$$

donde, m_P es la masa del permeado (kg), A_m es el área de membrana (m²), t es el tiempo del proceso (h) [24].

El grado de ensuciamiento de la membrana durante el proceso de filtración se estudió utilizando el modelo de resistencias en series y la Ley de Darcy, con los valores experimentales de J_P y PTM [25,26]:

$$r_T = (r_m + r_f) = \frac{PTM}{\mu J_P} \quad (3)$$

donde, PTM es la presión transmembrana (Pa), μ es la viscosidad del extracto (Pa·s), r_T es la resistencia total que ofrece la membrana a la transición del extracto durante los procesos de UF y DF (m⁻¹), r_m es la resistencia hidráulica que ofrece la membrana a la transición del agua, Σr_f es el sumatorio de las resistencias secundarias generadas por la polarización por concentración y ensuciamiento de la membrana y se ha determinado realizando los experimentos de UF con agua destilada a PTM comprendidas entre 0,25 y 2,25 bar [25,26].

Para determinar la resistencia hidráulica de la membrana (r_m) se utilizó la Ecuación 3 y los datos experimentales de la densidad de flujo de permeado obtenidos en la ultrafiltración del agua ultrapura (J_W), siendo en este caso r_f = 0 y se cumple lo establecido en la Ecuación 4:

$$r_m = \frac{\Delta P}{J_W \mu} \quad (4)$$

Una vez determinado el valor de r_m, se calculó el valor de r_f a partir de la Ecuación 3. Por otra parte, se determinó el porcentaje de variación de las resistencias de ensuciamiento a partir de la Ecuación 5.

$$\%r_f = \frac{r_T - r_m}{R_m} * 100 \quad (5)$$

Al finalizar cada experimento de filtración se realizó la limpieza del equipo y de la membrana. Primero se limpiaron el equipo y la membrana con una solución de detergente y un aclarado con agua. Después se realizaron dos lavados químicos; primero un lavado ácido con una disolución de ácido fosfórico y, a continuación, un lavado ácido con hidróxido de sodio 0,2 M. Las condiciones de trabajo en ambos lavados fueron a temperatura ambiente y aplicando una PTM de 0,5 bar durante 60 min y tras cada lavado se realizó un aclarado con agua destilada aplicando la misma PTM que en los lavados para eliminar los compuestos químicos empleados. Tras el proceso de limpieza se midió la densidad del flujo de permeado de la

membrana con agua destilada para comprobar que la limpieza se realizó correctamente y, además, para conocer el grado de recuperación de la membrana.

3.3.1. Experimentos a recirculación total

En la Figura 7 se muestra el diagrama de flujo del proceso de UF a recirculación total utilizado en este estudio. Se utilizaron membranas de 1, 5 y 50 kDa. En estos experimentos, el tanque se cargó con 200 g (200 mL) de SWH y se impulsó al módulo de membrana con ayuda de la bomba peristáltica. Durante todo el experimento el permeado y el retenido se recircularon al tanque de alimentación. Se tomaron muestras de permeado a los 60 y 120 min para determinar el grado de retención de la membrana. Este grado de retención se calculó con la siguiente Ecuación:

$$R (\%) = \left(1 - \frac{C_p}{C_a}\right) * 100 \quad (6)$$

donde, C es la concentración de cada uno de los compuestos en estudio del SWH y los subíndices p y a hacen referencia al permeado y alimentación SWH, respectivamente.

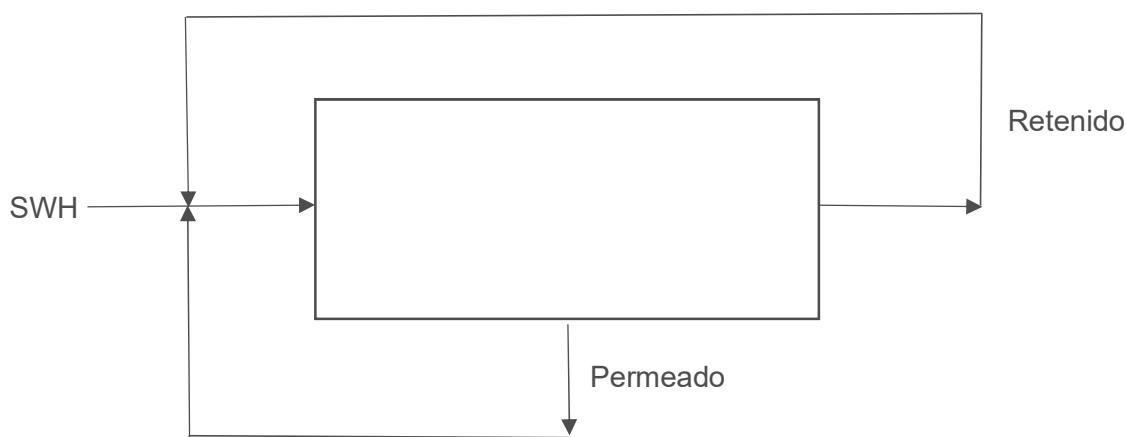


Figura 7. Representación del diagrama de flujo de UF a recirculación total.

3.3.2. Experimentos de diafiltración

En la Figura 8 se muestra el diagrama de flujo del proceso de DF empleado para el proceso de fraccionamiento/purificación del SWH. En estos experimentos, el tanque se cargó con 200 g (200 mL) de SWH que se impulsó al módulo de membrana con ayuda de la bomba peristáltica.

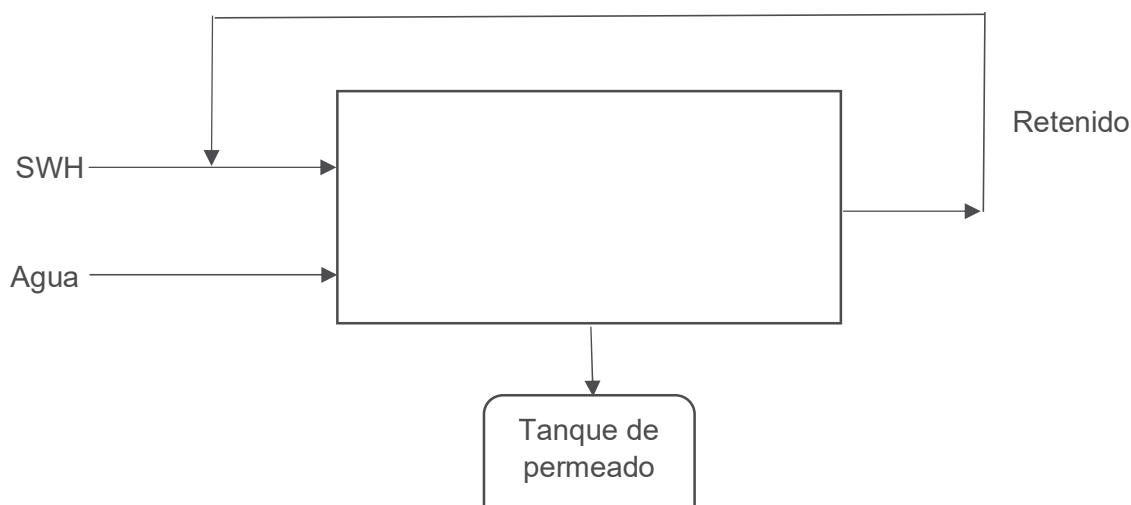


Figura 8. Representación del diagrama de flujo del proceso de DF.

Durante todo el experimento el retenido se recirculó al tanque de alimentación, el permeado se recogió de forma continua en el tanque de permeados y, para ello, se fue introduciendo agua ultrapura al tanque de alimentación para mantener un volumen constante. Se tomaron muestras de permeado, en intervalos de tiempo preestablecidos, a lo largo de todo el proceso de filtración para conocer el fraccionamiento del SWH.

3.4. Métodos analíticos

3.4.1. Fracción de oligosacáridos y compuestos orgánicos de degradación

Para cuantificar y determinar los azúcares, ácidos urónicos (glucurónico y galacturónico), los ácidos orgánicos (fórmico y acético) y los compuestos de degradación (HMF y furfural) formados durante la extracción a 145 °C del triturado de piel de cebolla con agua subcrítica se ha empleado un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), con una columna Biorad Aminex-HPX-87H, que tiene un detector de ultravioleta (VWD) que mide la absorbancia en el rango de ultravioleta de los ácidos, un detector de índice de refracción (RID) que mide la absorbancia en el rango infrarrojo, principalmente, de los azúcares y algunos ácidos. La fase móvil utilizada fue una disolución de ácido sulfúrico 0,005 M con agua miliQ. El equipo trabaja a 40 °C con un flujo de 0,6 mL/min para determinar la composición del extracto y la duración del análisis de cada muestra fue de 67 min [27]. Los azúcares libres, los ácidos orgánicos y los productos de degradación HMF y furfural fueron los productos considerados como impurezas, por ello, debían ser separados de la pectina.

Para determinar la fracción de pectina que se encontraba en forma oligomérica (y que no se ha degradado durante la extracción) se realizó una hidrólisis ácida al extracto líquido. Para realizar la hidrólisis ácida, siguiendo el protocolo NREL/TP-510-42623, a 5 mL de extracto (previamente diluido 2.5 veces) se le añadieron 174 µL de ácido sulfúrico al 72 %; a continuación, la disolución se mantuvo durante 1 hora a 120 °C en el autoclave. Cuando finalizó el tiempo de autoclave se sacó la disolución de este equipo, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se neutralizó con carbonato cálcico hasta alcanzar un pH entre 6 - 7 y se dejó reposar. Por último, la disolución se filtró y se analizó en el equipo HPLC en las condiciones mencionadas anteriormente [27].

De esta forma se determinó la cantidad total de ácido galacturónico de la muestra, y por diferencia con el ácido galacturónico libre determinado en el extracto líquido sin hidrolizar, permitió obtener el contenido en ácido galacturónico en forma oligomérica de la muestra.

Este procedimiento descrito se realizó con todas las muestras que se han obtenido en los procesos de filtración, siendo las muestras analizadas, las siguientes: la alimentación, los diferentes permeados obtenidos, el extracto que ha quedado al finalizar el proceso de la filtración y el agua de limpieza de la membrana al finalizar el experimento.

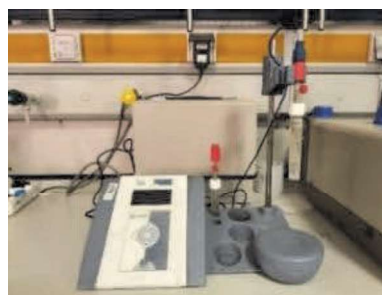
3.4.2. Determinación del pH

La determinación del pH de todas las muestras que se han obtenido a lo largo del experimento se ha realizado a temperatura ambiente con un pH-metro Crison GLP 22 que se ha calibrado previamente con las soluciones tampón apropiadas para este equipo.

En la Figura 9, se muestran las fotografías del equipo de HPLC y del pH-metro que fueron utilizados para analizar el SWH y los permeados que se obtuvieron durante los procesos de filtración.



(A)



(B)

Figura 9. Fotografía del (A) HPLC y (B) del pH-metro utilizados en este trabajo.

3.5. Análisis estadístico

Cada experimento de extracción se realizó al menos dos veces y todos los extractos se analizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como valor medio \pm la desviación estándar para poder evaluar el grado de dispersión de todos los experimentos que se han realizado bajo las mismas condiciones de operación y para validar los resultados. Se aplicó el método de diferencias significativas de Fisher, un valor de $p \leq 0,05$ confirman diferencias significativas entre los valores (Statgraphics Centurion 18).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el apartado 4.1. se muestran los resultados del hidrolizado de triturado de piel de cebolla con agua subcrítica (SWH), el cual se obtuvo como se ha descrito en el apartado 3.2. y analizado como se ha descrito en los apartados 3.4.1 y 3.4.2. Además, el SWH se empleó como alimentación en estudio en los procesos de ultrafiltración (UF) y de diafiltración (DF). A continuación, en el apartado 4.2. se muestran los resultados del proceso de UF a recirculación total que permitieron realizar la selección del tamaño de poro de membrana que, a posteriori, se empleó en el proceso de fraccionamiento/purificación de dicho hidrolizado. Después en el apartado 4.3. se muestran los resultados sobre el efecto que presentan diferentes presiones transmembranas (PTM) en los procesos de UF del SWH. Por último, el apartado 4.4. recoge los resultados que se obtuvieron en el proceso de purificación al aplicar un proceso de filtración, siendo éste una DF.

4.1. Hidrolizado de agua subcrítica (SWH)

En la Figura 10, se muestra la fotografía del hidrolizado obtenido con agua subcrítica. Se observó que el SWH presentaba un color marrón oscuro, siendo éste debido, por una parte, a la presencia de HMF y de furfural y, por otra parte, a la presencia de las melanoidinas que van a aportar al hidrolizado dicho color. La presencia de las melanoidinas fue debida a que en el proceso de extracción con agua subcrítica han tenido lugar las reacciones de Maillard ya que se expusieron los azúcares, que contiene el triturado de piel de cebolla, a altas temperaturas y, como resultado, dieron lugar a un SWH con un color marrón caramelizado. También, se observó la formación de espuma en el hidrolizado siendo debida a la presencia de materia coloidal, que además, limitó los procesos de filtración debido a que impidió trabajar con velocidades tangenciales elevadas (28).



Figura 10. Fotografía del hidrolizado del triturado de piel de cebolla con agua subcrítica.

La Tabla 2, muestra la composición del SWH de piel de cebolla. Éste presentó un pH ácido, $3,76 \pm 0,06$, y está formado por una fracción de polisacáridos y por compuestos orgánicos de degradación, representando un 89,06 % y un 10,94 %, respectivamente.

La fracción de oligosacáridos se encontraba formada por una fracción de oligómeros totales y por una fracción de monómeros totales, estas fracciones tuvieron una concentración, respectivamente, de 4187 mg/L y de 1088 mg/L.

Se observó que los oligómeros totales se encontraban formados, fundamentalmente, por un 98,7 % de ácido galacturónico y, en menor cantidad, por ácido glucurónico que representaba

un 1,3 %. En los monómeros totales, al igual que en los oligómeros, el componente que se encontró formado está fracción fue, principalmente, el ácido galacturónico, representando un 30 %, y, en menor proporción, por un 4 % de ácido glucurónico. En cuanto a los monosacáridos se observó que representan un 66 % de los monosacáridos totales. Los monosacáridos, presentes en el SWH, se encontraban formados por la glucosa, la xilosa, la galactosa y la arabinosa.

Los compuestos orgánicos de degradación presentaban una baja concentración en SWH (aproximadamente un total de 648,3 mg/L) y estaban formados por los ácidos carboxílicos, el HMF y el furfural, representando estos compuestos un 91,32 %, un 1,37 % y un 7,31 %, respectivamente.

Tabla 2. Composición química del SWH empleado como alimentación en los experimentos de UF y DF.

COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN (mg/L)
Ácido galacturónico (gT)	4133 ± 15
Oligomérico (gO)	3806 ± 7
Monomérico (gM)	327 ± 8
Ácido glucurónico (gluT)	98 ± 5
Oligomérico (gluO)	54 ± 3
Monomérico (gluM)	44 ± 2
Monosacáridos totales	717 ± 10
Glucosa	315 ± 1
Xilosa	88 ± 3
Galactosa	189 ± 1
Ramnosa	No Detectado
Arabinosa	125 ± 5
Ácidos carboxílicos	592 ± 37
Ác. fórmico	476 ± 20
Ác. acético	116 ± 17
HMF	8,9 ± 3
Furfural	47,4 ± 2

Al analizar los resultados obtenidos, más detalladamente, en la caracterización del hidrolizado destacó que la fracción de oligosacáridos es la mayoritaria y que los compuestos orgánicos de degradación eran minoritarios. Dentro de la fracción de oligosacáridos la fracción que predomina es la oligomérica sobre la monomérica. Además, el ácido galacturónico era el compuesto más representativo de la fracción de oligosacáridos tanto en la fracción oligomérica como monomérica. Al comparar la cantidad presente en estas dos fracciones hay que añadir que se encontraba en mayor cantidad en la oligomérica; que la cantidad de ácido galacturónico sea la mayoritaria era lo esperado ya que éste era el compuesto mayoritario en la estructura de la pectina. En la fracción del resto de monómeros, destacaba que el azúcar mayoritario era la glucosa y la ausencia de ramnosa. Que la ramnosa no se encontrará presente en la fracción monomérica no significa que no estuviera presente en el triturado de piel de cebolla debido a que la ramnosa se encuentra formando parte de la estructura de la pectina; para ser más concretos, forma parte de los dominios ramnogalacturonano I y ramnogalacturonano II.

En lo que respecta a los compuestos de degradación se analizaran por separado los resultados que se obtuvieron. Primero se comentarán los ácidos carboxílicos y, a continuación, el HMF y el furfural. Antes de proceder a un análisis más detallado de dichos compuestos hay que indicar que estos se encuentran formados, principalmente, por los ácidos carboxílicos.

Los ácidos carboxílicos se encontraron constituidos, mayoritariamente, por el ácido fórmico y, en menor cantidad, por el ácido acético. La presencia de estos ácidos orgánicos fue debida a la degradación de los grupos carboxílicos que presentan los carbohidratos, que forman parte de la estructura del ácido galacturónico, cuando se sometió la piel de cebolla a las condiciones de agua subcrítica [29,30].

En lo referente al furfural se observó que su presencia fue debida al proceso de deshidratación de la xilosa, la cual se generó a partir de los ácidos urónicos durante el proceso de extracción con agua subcrítica, debido a que tuvieron lugar reacciones secundarias que incrementaron, a priori, la presencia de la xilosa y, como consecuencia, dio lugar a la formación del furfural [30,31].

Por último, hay que indicar que durante el proceso de extracción con agua subcrítica se observó que se favoreció la deshidratación de la fructosa debido a que ésta sufrió un proceso de hidrólisis y, como consecuencia, tuvo lugar la pérdida de tres moléculas de agua. Como la cantidad de fructosa que presentó la piel de cebolla fue baja en el SWH se obtuvo una pequeña concentración de HMF [32].

4.2. Efecto del tamaño del poro de la membrana en la ultrafiltración del SWH

Los experimentos de UF se realizaron a recirculación total, con membranas de distintos tamaños de poro para determinar el grado de retención de la fracción oligomérica del SWH y el ensuciamiento de la membrana. Además, se han realizado experimentos de UF para estudiar el efecto de la PTM y poder mejorar la filtrabilidad del hidrolizado. Todos los experimentos se realizaron a una temperatura de 25 °C para evitar sobrecalentamiento y evitar efectos de hidrólisis.

4.2.1. Estudio del flujo de permeado y del ensuciamiento

Para estudiar el efecto del diámetro de poro en el fraccionamiento del SWH se ha establecido trabajar con membranas de 1, 5 y 50 kDa, con una PTM constante de 1 bar y a 25 °C. En la Figura 11 se representan los resultados experimentales de la densidad de flujo de permeado del SWH utilizando membranas con un tamaño de poro de 1, 5 y 50 kDa.

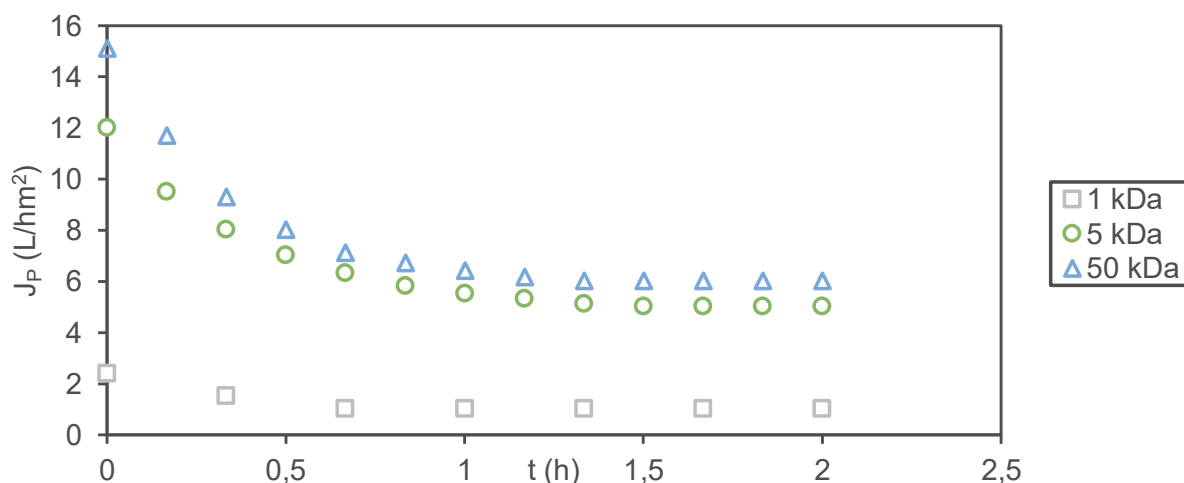


Figura 11. Representación del flujo de permeado obtenido en los procesos de UF en las membranas estudiadas

En la Figura 11 se observa que J_P disminuyó, con el tiempo, en todas las membranas estudiadas. Esta disminución es causada por el ensuciamiento, siendo la principal contribución de éste la resistencia que presentó el SWH. Es decir, se observó que la disminución de la densidad de flujo de permeado es proporcional a la disminución del corte molecular de la membrana. Esto fue debido al ensuciamiento que se generó es fundamentalmente por la formación de la capa de torta. Estos resultados han sido similares a los ya publicados que indican que al ultrafiltrar disoluciones concentradas de pectinas, la densidad de flujo de permeado disminuyó debido a que el modelo de polarización ha gobernado los procesos de ultrafiltración [19].

Al analizar con detenimiento los resultados que se muestran en la Figura 11 se puede decir que durante los primeros 30 min de trabajo es donde se produjo una mayor disminución del J_P por el ensuciamiento inicial provocado por el SWH. En la membrana de 5 y 50 kDa esta disminución es paulatina ya que inicialmente el flujo es, respectivamente, de 12 y 15 L/(hm²) y trascurrido 30 min el J_P alcanza un valor de 7 y 8 L/(hm²), respectivamente. Mientras que en la membrana de 1 kDa destaca que la disminución del J_P , en comparación con las otras

membranas, debido a que el flujo disminuye bruscamente ya que se partió de un flujo de 2 L/(hm²) y tras los primeros 30 min éste tiene un valor aproximadamente de 1 L/(hm²). Se consigue un J_P constante a partir de los 30, los 90 y los 80 min, respectivamente, en las membranas de 1, 5 y 50 kDa, siendo el valor de éste de 1, 7 y 8 L/(hm²), respectivamente.

4.2.2. Estudio de la capacidad de retención de la membrana

En este apartado se muestran los valores de retención de la membrana para los mismos experimentos del apartado 4.2.1. Para la evaluación de los resultados que se encuentran representados en la Figura 12, en la Figura 13 y en la Figura 14 se empleó el método de diferencias significativas de Fisher que fue el empleado para el análisis estadístico de la varianza, obteniendo un p-valor ≤ 0,05 para confirmar las diferencias significativas entre los resultados experimentales. Los resultados experimentales se expresaron como valor medio con un valor de ± desviación estándar para poder evaluar el grado de dispersión de los experimentos realizados con las mismas condiciones de operaciones y para validar los datos obtenidos.

En la Figura 12 se observa que la retención del ácido galacturónico oligomérico a lo largo del tiempo fue mayor que la retención del monómero, suponiendo estas retenciones un 92,1 ± 1,5 % y un 7,9 ± 2,1 %, respectivamente. Al realizar un análisis estadístico de la varianza se obtuvo un p-valor > 0,05 lo cual nos indica que no existen diferencias significativas, y de esta forma se puede concluir que la retención del ácido galacturónico monomérico es igual a lo largo del tiempo en las membranas estudiadas. Mientras que la retención del oligómero no presentaba diferencias significativas, a lo largo del tiempo, entre las membranas de 5 y 50 kDa, es decir, que presenta una retención del oligómero igual, y en lo que respecta a la membrana de 1 kDa la retención del oligómero en el tiempo es igual; sin embargo, en esta membrana los resultados son significativamente diferentes a los obtenidos en las membranas de 5 y 50 kDa. La existencia de diferencias significativas entre las membranas fue debido a que en la membrana de 1 kDa fue donde mayor retención existe del ácido galacturónico oligomérico. Estas retenciones del ácido galacturónico oligomérico suponen aproximadamente entre un 48 - 52 % en las membranas de 5 y 50 kDa, mientras que en la membrana de 1 kDa dicha retención se aproxima al 80 %. Que los resultados en la retención sean iguales a lo largo del tiempo es debido a que el J_P, tal y como se puede observar en la Figura 11, es constante cuando se alcanza la hora del experimento.

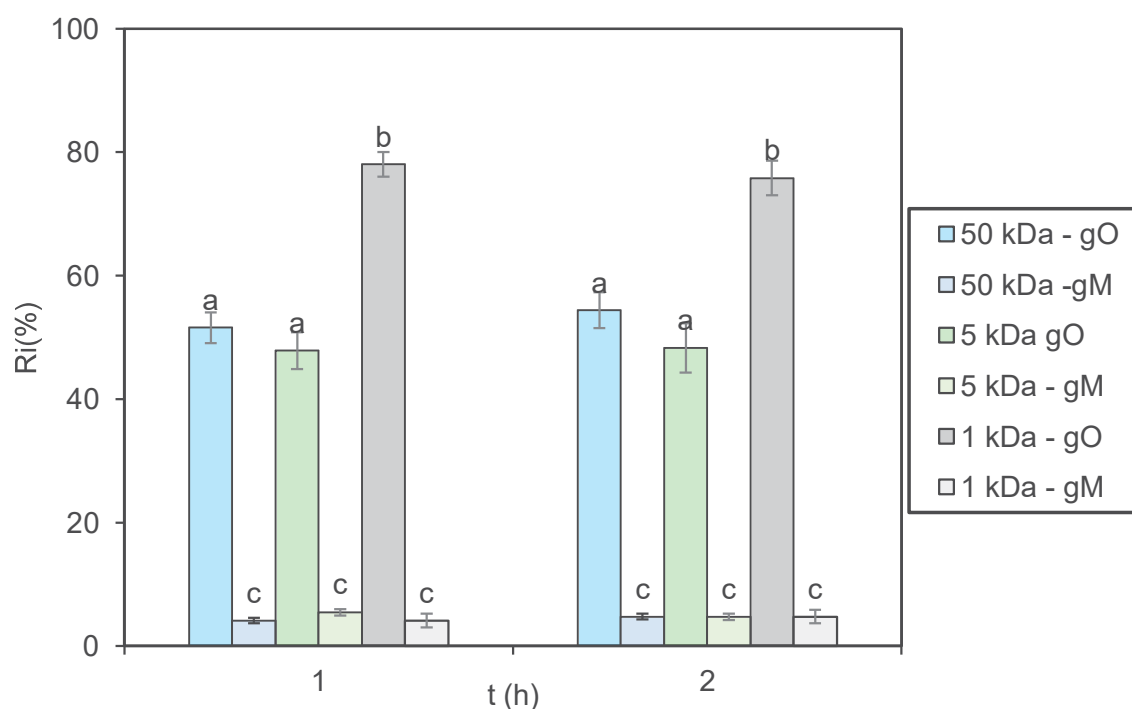


Figura 12. Representación de la retención del ácido galacturónico oligomérico (gO) y monomérico (gM).

En la Figura 13 se observa que la retención del ácido glucurónico oligomérico a lo largo del tiempo, como pasa con el ácido galacturónico, fue mayor que la retención del monómero, suponiendo estas retenciones un 55,1 % y 44,9 %, respectivamente. Al realizar un análisis estadístico de la varianza, los resultados del p valor al ser mayores a 0,05 nos indicaron que no existían diferencias significativas, concluyendo que los resultados obtenidos en el ácido glucurónico oligomérico a lo largo del tiempo en las membranas estudiadas son iguales, mientras que en la forma monomérica los resultados de retención en las membranas de 5 y 50 kDa fueron iguales entre sí y a lo largo del tiempo, pero donde mayor retención del monómero existe es en la membrana de 1 kDa, en comparación con las otras membranas estudiadas, a lo largo del tiempo.

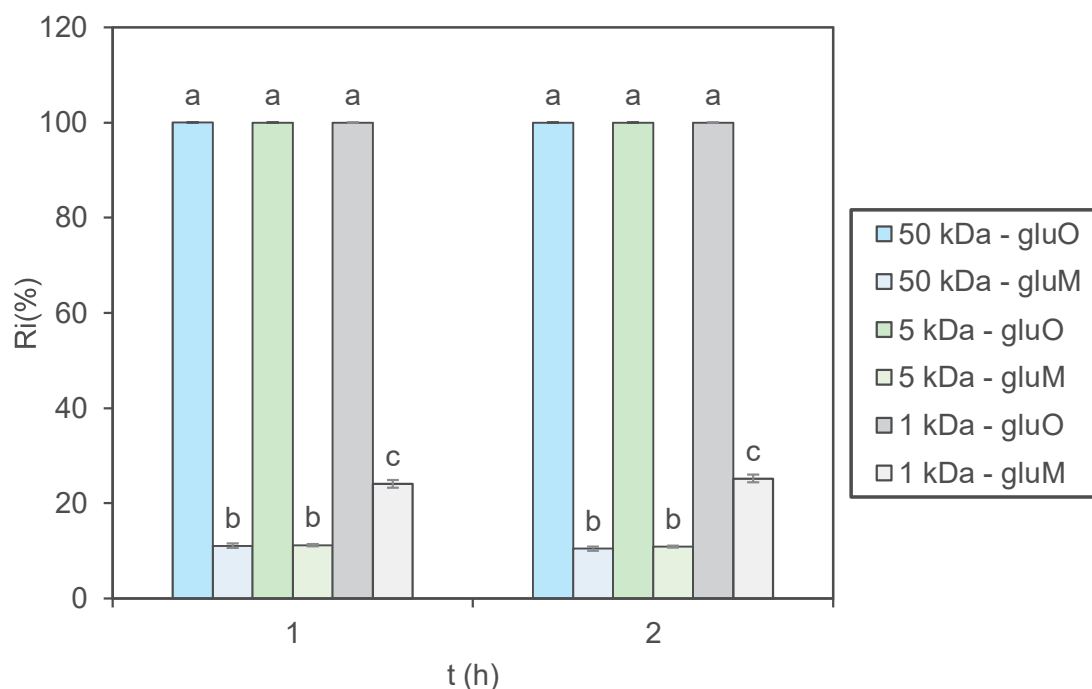


Figura 13. Representación de la retención del ácido glucurónico oligomérico (gluO) y monomérico (gluM).

Al comparar las retenciones del ácido galacturónico y del ácido glucurónico, a priori se concluiría que existe mayor retención del ácido glucurónico, pero esto no es cierto debido a que al analizar los resultados de retención total de los ácidos urónicos, se observaba que el ácido galacturónico supone un 97,6 %, mientras que el ácido glucurónico suponía un 2,4 %. Estos resultados indicaban que la proporción mayoritaria de los ácidos urónicos estaba representada por el ácido galacturónico y que la proporción del ácido glucurónico era prácticamente despreciable.

En la Figura 14 se puede observar que los compuestos de degradación que presentaban una mayor retención en las membranas estudiadas son los monosacáridos, mientras que el resto de los productos de degradación presentaban una retención inferior al 5 %. La retención de los monosacáridos en las membranas de 5 y 50 kDa era inferior al 5 % y entre éstas no existían diferencias significativas, ya que el p-valor > 0,05; esto significaba que la retención es la misma, pero la retención en la membrana de 1 kDa es aproximadamente del 20 %, presentando la retención de los monosacáridos al realizar el análisis estadístico de la varianza un p-valor ≤ 0,05 concluyendo que los resultados de la membrana de 1 kDa presentaba diferencias significativas con respecto a las otras membranas.

En la retención del HMF, a priori hay que decir que existían diferencias significativas en las membranas de 1 y 50 kDa pero entre éstas y la membrana de 5 kDa no existían diferencias significativas ya que el p-valor era superior a 0,05 con lo cual se puede concluir que la retención del HMF en dichas membranas era igual. En lo que respecta al furfural se observó que la retención es mayor en la membrana de 1 kDa siendo ésta significativamente diferente a la que presentaban las membranas de 5 y 50 kDa debido a que presentaba un p-valor ≤

0,05, pero entre éstas últimas la retención era igual ya que el resultados del análisis estadístico indica que el p-valor era mayor a 0,05.

En lo referente a los ácido carboxílicos, siendo estos el ácido fórmico y el ácido acético, se observó que su retención fue similar en las membranas estudiadas, ya que no existían diferencias significativas entre las membranas de 1 y 5 kDa, pero sí que existían dichas diferencias significativas entre éstas y la membrana de 50 kDa. Al comparar la retención, en la membrana de 50 kDa, del ácido fórmico y del acético se observó que la retención de este último ácido era aproximadamente del $0,05 \pm 0,10$ %, mientras que la retención del ácido fórmico era aproximadamente del $0,75 \pm 0,11$ %.

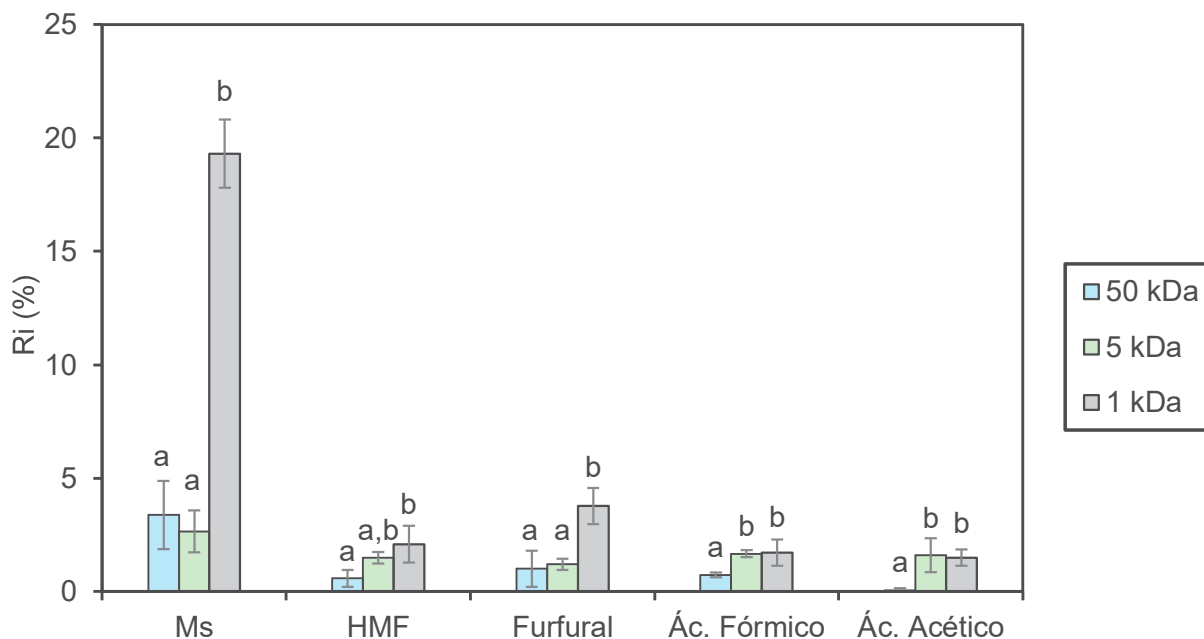


Figura 14. Representación de la retención de los compuestos de degradación en las membranas estudiadas. Donde Ms son los monosacáridos.

Con estos resultados de retención de los productos de degradación se puede concluir que al suponer menos de un 5 % en todas las membranas, exceptuando los monosacáridos en la membrana de 1 kDa que suponían menos de un 20 %, que estos compuestos no participaron en el ensuciamiento de la membranas a lo largo del proceso de separación por UF.

Estos resultados obtenidos en la ultrafiltración al comparar los resultados de retención con la bibliografía consultada indican que hay una diferencia importante en el peso molecular de las pectinas según su origen y tipo de extracción. En este trabajo se determinó que la membrana que presenta una mayor capacidad de retención de ácido galacturónico oligomérico, procedente de la piel de cebolla, es la de 1 kDa debido a que dicha retención fue, aproximadamente, del 80 %. Mientras que en las membranas que fueron empleadas en la bibliografía consultada para lograr una buena retención de ácido galacturónico oligomérico, procedente de cáscara de limón y de manzana, presentaban un corte molecular comprendido entre 1 y 300 kDa [11,20].

4.3. Efecto de la presión transmembrana en la ultrafiltración del SWH

Los experimentos de UF se iniciaron con agua destilada a 25 °C a empleando PTM comprendidas desde 0,25 a 1,25 bar. Esto fue debido al grado de ensuciamiento que se observó anteriormente.

El flujo de permeado de agua (J_w) aumentó linealmente al aumentar la PTM, presentando valores del coeficiente de correlación superiores a 0,95. En la Tabla 3 se muestran los resultados del coeficiente de permeabilidad (L_p) de la resistencia de la membrana y el coeficiente de correlación. Para la calcular los resultados expuestos en la Tabla 3 se han empleado la ecuación (2) y la ecuación (4).

Tabla 3. Resultados experimentales de la ecuación de ajuste de los datos de densidad del flujo de agua pura (J_w) con la presión transmembrana (PTM), del coeficiente de permeabilidad ($L_p = \frac{1}{\mu r_T}$, calculado a partir de la Ecuación 3) y de la resistencia hidráulica de la membrana. R^2 coeficiente de correlación.

Membrana	$J_w = L_p \cdot PTM$ (L/hm ²)	R^2	L_p (10 ⁻¹⁰ m/sPa)	r_m (10 ¹² m ⁻¹)
1 kDa	$J_w = 0,6 \cdot 10^{-10} \cdot PTM$	0,997	0,6	16,7
5 kDa	$J_w = 1,0 \cdot 10^{-10} \cdot PTM$	0,998	1,0	10,0
50 kDa	$J_w = 2,0 \cdot 10^{-10} \cdot PTM$	0,999	2,0	5,0

A continuación, se realizaron experimentos de UF con el SWH utilizando diferentes PTM a una temperatura de 25 °C, para determinar las condiciones de trabajo de los experimentos de UF a 25 °C y con un único valor de PTM.

En la Figura 15 se observa que en todas las membranas el aumento del flujo de permeado es proporcional al de la PTM hasta que ésta alcanzó un valor máximo de 1 bar. A una PTM de 1 bar el flujo de permeado alcanzó unos valores límites de 6,5, 4,1 y 1 L/(hm²), respectivamente, en las membranas con un corte molecular de 50, 5 y 1 kDa. Estos resultados fueron los esperados al trabajar con sustancias con elevado contenido en materia coloidal y con una elevada viscosidad, por ello, no es recomendable trabajar con una elevada PTM ya que tiene lugar la formación de tortas más compactas y poco porosas en la superficie de la membrana, la cual va a impedir la separación correcta de los diversos compuestos presentes en el SWH, encontrándose la mayoría de estos compuestos en el retenido ya que solo serán capaces de llegar a atravesar la torta los compuestos con un peso molecular inferior al corte molecular que presenta la membrana que se está utilizando en el experimento.

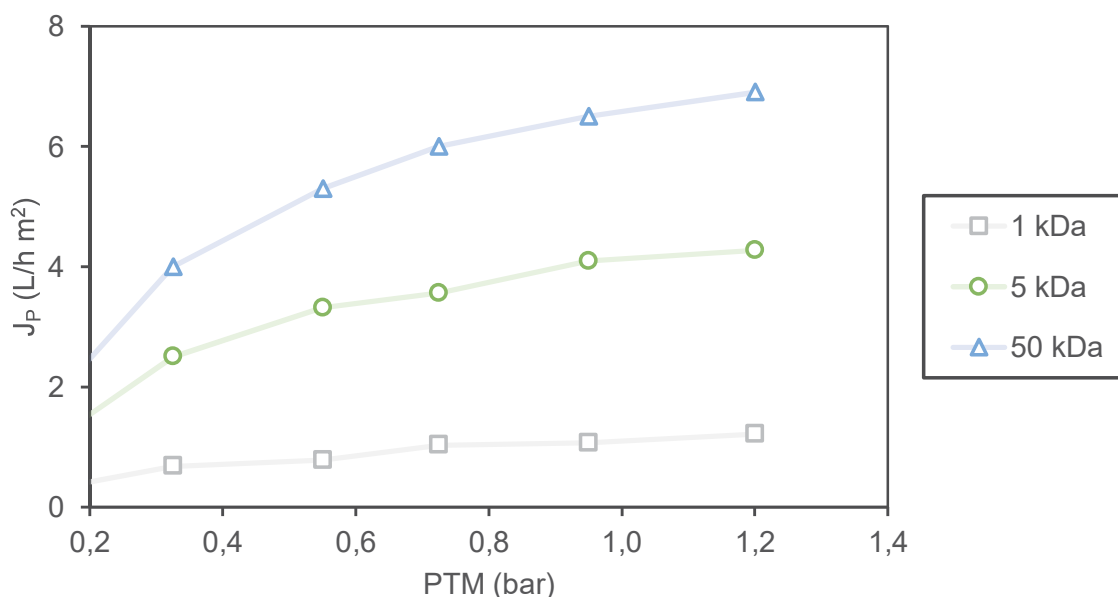


Figura 15. Representación gráfica del efecto de la PTM sobre el SWH.

Al comparar los flujos de permeados del agua con los del SWH se observó que era inferior en este último en todas las membranas y PTM ensayadas. Esto significó que el ensuciamiento que presenta el SWH frente al agua era superior en todas las membranas, pudiendo ser esto debido a la presencia de materia coloidal y la propia viscosidad del SWH.

En la Figura 16 se observa que la tendencia general de la r_T aumentaba con la PTM en todas las membranas, siendo esta resistencia mayor al disminuir el tamaño del poro de la membrana obteniéndose en la membrana de 1 kDa un valor de $3,21 \cdot 10^{14} \text{ m}^{-1}$, mientras que en la membrana de 50 kDa el valor fue de $5,26 \cdot 10^{13} \text{ m}^{-1}$. En cualquier caso, la pérdida del flujo de permeado era similar en todas las membranas, siendo esta superior al 90 % e indicando que la contribución de r_T es debida al ensuciamiento producido por el SWH.

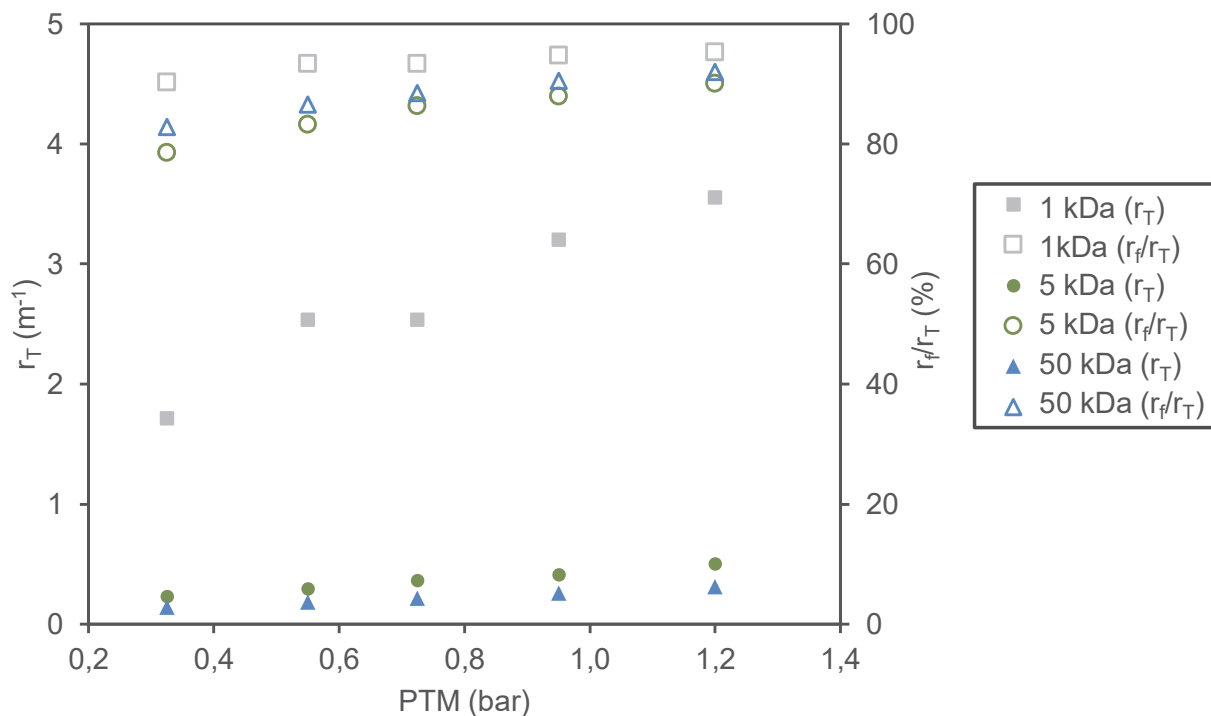


Figura 16. Representación gráfica ensuciamiento de las membranas estudiadas. Donde r_T es la resistencia de total y r_f/r_T es el ensuciamiento generado por el SWH.

4.4. Resultados del proceso de diafiltración del SWH

Los resultados obtenidos en experimentos a recirculación total indicaron que las membranas de 5 y 50 kDa presentan el mismo porcentaje de retención. Se descartó la membrana de 5 kDa debido a que presenta un tamaño de poro pequeño lo que se tradujo en un menor flujo de permeado, por ello se seleccionó la membrana de 50 kDa ya que permitió trabajar con un mayor flujo de permeado al presentar un mayor tamaño de poro y el grado de ensuciamiento que presentó durante los procesos de UF fue menor.

Los experimentos de diafiltración se han realizado aplicando una PTM de 1 bar, un temperatura de 25 °C añadiéndose un volumen de agua destilada igual al volumen de permeado que se ha ido obteniendo a lo largo del experimento. Para realizar este proceso se han utilizado membranas con un corte molecular de 50 kDa.

En la Figura 17, se muestra el diagrama de flujo del proceso de DF en la membrana de 50 kDa, la cual se empleó para lograr la purificación del ácido galacturónico oligomérico.

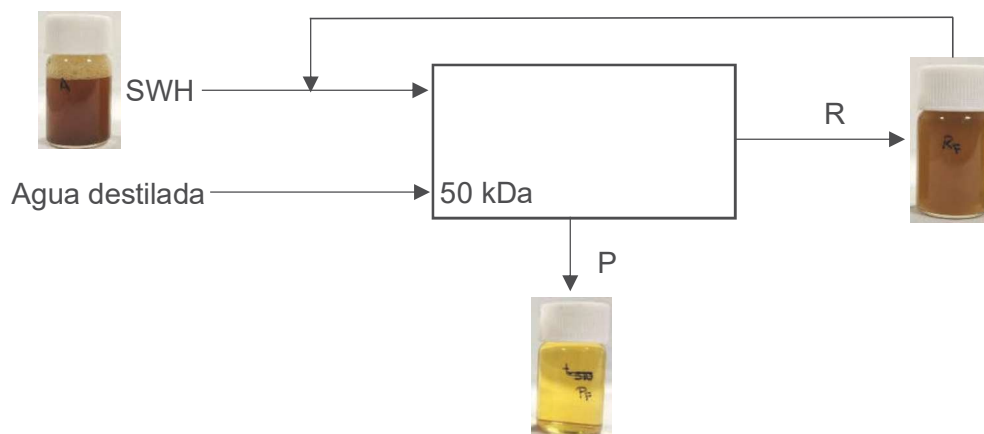


Figura 17. Representación del diagrama de flujo del proceso de DF en la membrana estudiada, donde R es el retenido y P es el permeado.

En la Figura 18, se observa que J_p disminuye debido a que se partió de un flujo de 15,6 L/(hm²) hasta un flujo final de 6,8 L/(hm²), siendo la causa de esta disminución, como se ha comentado anteriormente, el ensuciamiento que se produce durante el proceso de DF. Hay que añadir que durante este proceso el ensuciamiento fue menor, debido al empleo de agua destilada la cual permitió eliminar los compuestos de degradación, el ácido galacturónico monomérico y el ácido glucurónico monomérico y oligomérico, consiguiéndose con este proceso de DF la purificación del ácido galacturónico oligomérico.

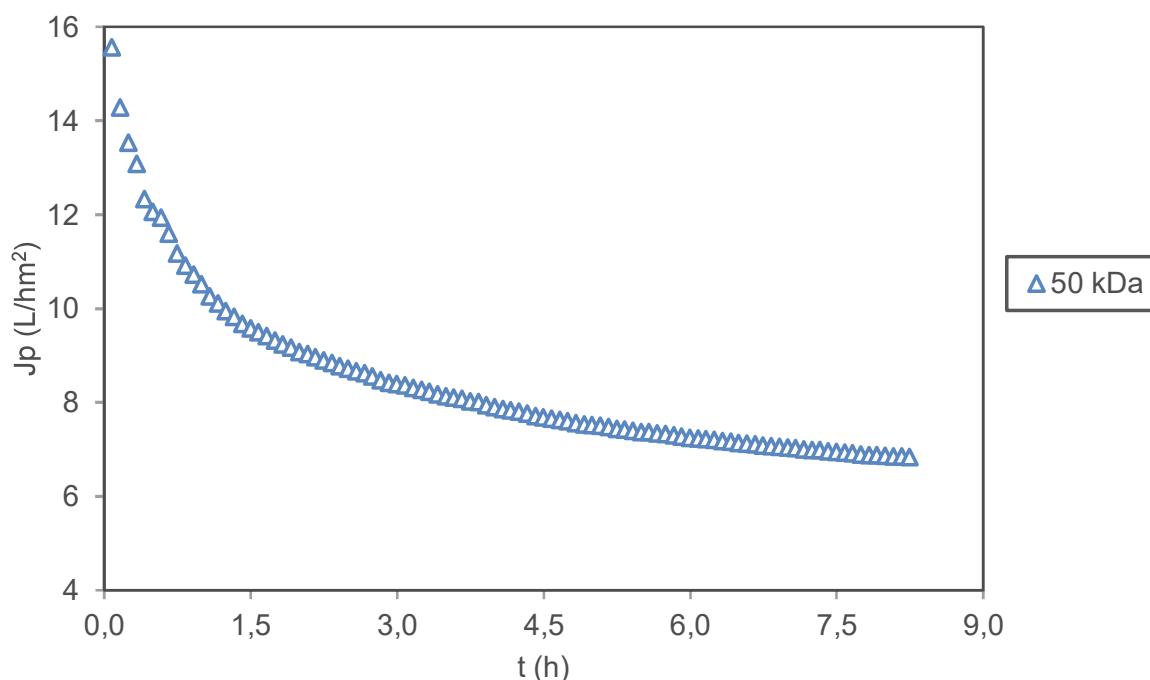


Figura 18. Representación del flujo de permeado obtenido en los procesos de DF en la membrana de 50 kDa.

A continuación, en la Tabla 4 se muestran los resultados que fueron obtenidos en el proceso de diafiltración en la membrana de 50 kDa. Se observó que, principalmente, el compuesto que se encuentra en el retenido es el ácido galacturónico oligomérico, siendo esto debido a que, como demostraron los resultados de UF, más de un 50 % de este compuesto presentó un peso molecular superior al tamaño de poro de la membrana, y sólo una pequeña parte del oligómero de ácido galacturónico se encontró en el permeado significando esta fracción presenta un peso molecular inferior al tamaño de poro de la membrana de 50 kDa.

Tabla 4. Resultados diafiltración en la membrana de 50 kDa, donde R es el retenido, P es el permeado y % R es el porcentaje de retención.

COMPUESTOS	SWH (mg/L)	R (mg/L)	P (mg/L)	% R
Ácido galacturónico (gT)	4133	1075	641	35
Oligomérico (gO)	3806	1056	554	38,31
Monomérico (gM)	327	19	97	5,7
Ácido glucurónico (gluT)	98	54	12	100
Oligomérico (gluO)	54	52	0	100
Monomérico (gluM)	44	2	12	4,65
Monosacáridos	717	44	244	5,1
Ác. carboxílicos	592	26	215	3,5
HMF	8,9	1	3	4,9
Furfural	47,4	3	18	4

En la Figura 19, se muestran los resultados que fueron obtenidos en proceso de purificación del SWH con la membrana de 50 kDa. Se observó que el proceso de purificación el compuesto que presentó mayor velocidad de eliminación, desde el inicio del experimento hasta el final de

éste, es el furfural, mientras que el resto de los compuestos presentan la misma velocidad de eliminación.

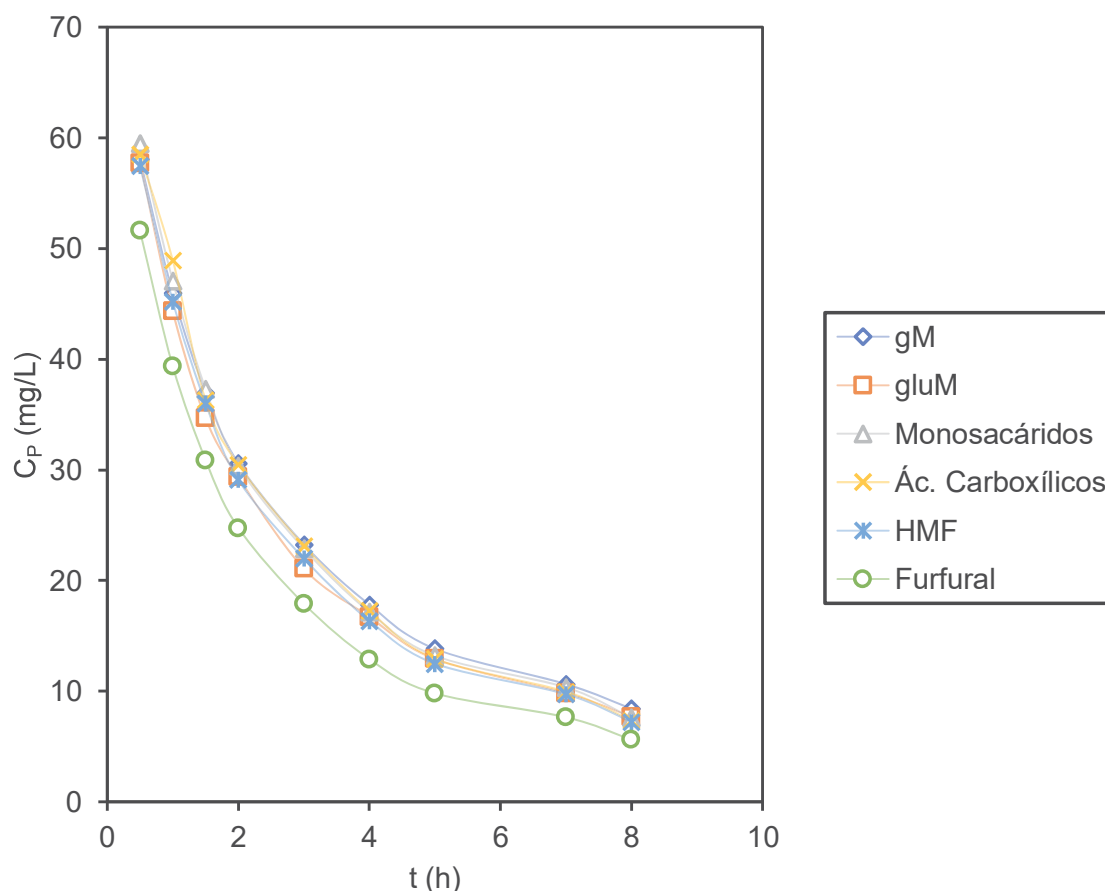


Figura 19. Representación de la eliminación durante el proceso de diafiltración de los compuestos en la membrana de 50 kDa. Donde gM es el ácido galacturónico monomérico y gluM es el ácido glucurónico monomérico.

Estos resultados mostraron que el proceso de diafiltración tendría que haber sido superior a las 8 h de trabajo para conseguir una purificación completa del ácido galacturónico oligomérico que presenta un peso molecular superior al tamaño del poro de la membrana de 50 kDa, debido a que la retención que se obtuvo de ácido galacturónico oligomérico fue del 35 % y se sabe por los resultados obtenidos en el proceso de UF que la retención del oligómero fue, aproximadamente, del 52 %. Como se observa en la Tabla 4, la mayor concentración de los diversos compuestos, que constituyen las impurezas, se encontró en el permeado lo cual indicó que con la diafiltración se consiguió eliminarlos, pero que la duración del proceso de DF tendría que ser superior para su completa eliminación. Además, habría que realizar un proceso de purificación en el permeado obtenido con una membrana con un tamaño de poro inferior al que se empleó en el trabajo para la recuperación y purificación del ácido galacturónico oligomérico que presenta un peso molecular inferior al de la membrana que fue empleada durante este trabajo.

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo se ha realizado para evaluar la viabilidad de la **extracción** de ácido galacturónico a partir de residuos de piel de cebolla empleando agua subcrítica y su **separación** de otras impurezas generadas durante el proceso de extracción, mediante tecnologías de membrana. Las principales conclusiones que se pueden extraer de este trabajo son las siguientes:

- i. La tecnología de extracción basada en agua subcrítica permite obtener extractos ricos en ácido galacturónico a temperaturas de 145 °C. Como consecuencia de dichas

- condiciones de extracción que favorecen reacciones de hidrólisis, el ácido galacturónico puede encontrarse en forma monomérica u oligomérica (parcialmente hidrolizado). Además, en el extracto líquido obtenido aparecen otras impurezas formadas durante el proceso de extracción: azúcares libres (formados por la hidrólisis de componentes estructurales de la piel de la cebolla), ácidos orgánicos (principalmente fórmico y acético) y otros productos de degradación como el HMF y furfural.
- ii. La tecnología de membranas ha demostrado la posibilidad de separar de estas impurezas del ácido galacturónico, existiendo un efecto importante de ensuciamiento de la membrana: se ha demostrado que el flujo de permeado usando el extracto de piel de cebolla es inferior al que se obtendría usando agua pura en las mismas condiciones. Esto significa que el extracto de piel de cebolla genera un elevado ensuciamiento en las membranas debido a la presencia de materia coloidal.
 - iii. Los resultados experimentales obtenidos en los procesos de UF en modo recirculación total demuestran que no hay efecto del poro de membrana en la separación entre 5 y 50 kDa, resultando el grado de retención del 50% en ambas membranas. Sin embargo, la retención de ácido galacturónico oligomérico fue mayor del 70% en el caso de utilización de la membrana de 1 kDa pero flujo de permeado se redujo de forma muy significativa imposibilitando su utilización para la filtración de este tipo de extracto. Estos resultados indican que una membrana de 50 kDa permite separar la fracción oligomérica de ácido galacturónico de mayor peso molecular, con un buen flujo de permeado durante toda la filtración.
 - iv. El estudio de la presión transmembrana ha demostrado la imposibilidad de trabajar a presiones superiores a 1 bar debido a que se promueve el ensuciamiento sobre la superficie de la membrana.
 - v. La diafiltración permite la recuperación de la fracción oligomérica de ácido galacturónico de mayor peso molecular libre de las impurezas presentes en el extracto.
 - vi. La combinación de las tecnologías limpias de extracción con agua subcrítica presentadas en este trabajo presenta gran potencial para ser empleadas en la valorización de residuos de la piel de cebolla como fuente de pectina o ácido galacturónico.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] *Directiva (CE) 2008/98 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas*. Diario Oficial de la Unión Europea, L312, de 5 de julio de 2018. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2008/98/oj>
- [2] *Ley 7/2022, de 8 de abril, de residuos y suelos contaminados para una economía circular*. Boletín Oficial del Estado, 85, de 8 de abril de 2022. <https://www.boe.es/eli/es/l/2022/04/08/7/con>
- [3] Sagar N.A., Pareek S., Benkeblia N., Xiao J. (2022). *Onion (Allium cepa L.) bioactives: Chemistry, pharmacotherapeutic functions, and industrial applications*. Food Frontiers, 15(6); pp. 1-33. doi.org/10.1002/fft2.135
- [4] FAO. (s.f.). *FAOSTAT. Crops and livestock products*. Recuperado 8 de Mayo de 2022, de <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- [5] Lu Z., Wang J., Gao R., Ye F., Zhao G, (2019). *Sustainable valorisation of tomato pomace: A comprehensive review*. Trends in Food Science & Technology; 86; pp.172–87. doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.020
- [6] Ropartz D., Ralet M.C. (2020). *Pectin Structure*. Pectin: Technological and Physiological Properties; Volume 1, pp. 17–36. V. Kontogiorgos (Ed.). Springer Cham, Estados Unidos.
- [7] Yang Y., Anderson C.T. (2020). *Biosynthesis, Localisation, and Function of Pectins in Plants*. Pectin: Technological and Physiological Properties Volume 1, pp. 1–15. V. Kontogiorgos (Ed.). Springer Cham, Estados Unidos.
- [8] Dranca F., Oroian M. (2018). *Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications*. Food Research International; 113; pp. 327–50. doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.065

- [9] Shrestha S., Rahman Md.S, Qin W. (2021). *New insights in pectinase production development and industrial applications*. Applied Microbiology and Biotechnology. 105(24); pp. 9069 - 9087. doi.org/10.1007/s00253-021-11705-0
- [10] Willats W.G.T., Knox J.P., Mikkelsen J.D. (2006). *Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel*. Trends in Food Science & Technology. 17(3); pp. 97–104. doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.008
- [11] Gómez B., Gullón B., Yáñez R., Parajó J.C., Alonso J.L. (2013). *Pectic Oligosaccharides from Lemon Peel Wastes: Production, Purification, and Chemical Characterization*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 61(42); pp.10043–10053. doi.org/10.1021/jf402559p
- [12] Mohd Rasidek N.A., Mad Nordin M.F., Tokuyama H., Nagatsu Y., Mili N., Zaini A.S., Idham Z., Chen Yunus M.A. (2021). *Subcritical water-based pectin from banana peels (Musa Paradisiaca Cv.Tanduk) as a natural gelation agent*. Materials Today: Proceedings. 47; pp. 1329–1335. doi.org/10.1016/j.matpr.2021.02.815
- [13] Rincón E., Espinosa E., García-Domínguez M.T., Balu A.M., Vilaplana F., Serrano L., Jiménez-Quero A. (2021). *Bioactive pectic polysaccharides from bay tree pruning waste: Sequential subcritical water extraction and application in active food packaging*. Carbohydrate Polymers. 272; 118477. doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118477
- [14] Morris G.A., Binhamad H.A.S. (2020). *Isolation and Characterisation of Pectin*. Pectin: Technological and Physiological Properties. Volume 1, pp. 1–15. V. Kontogiorgos (Ed.). Springer Cham, Estados Unidos.
- [15] Zhang F., Zhang L., Chen J., Du X., Lu Z., Wang X., Yi Y., Shan Y., Liu B., Zhou Y., Wang X., Lü X. (2022). *Systematic evaluation of a series of pectic polysaccharides extracted from apple pomace by regulation of subcritical water conditions*. Food Chemistry. 368; 130833. doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130833
- [16] Solís Carvajal C.A., Vélez Pasos C.A., Ramírez-Navas J.S. (2018). *Tecnología de membranas: Ultrafiltración*. Entre ciencia e ingeniería. 11(22); pp. 26-36. C.A. Solís Carvajal, C.A. Vélez Pasos, J.S. Ramírez-Navas (Eds.). Universidad Católica de Pereira, Colombia.
- [17] Galanakis C.M. (2015). *Separation of functional macromolecules and micromolecules: From ultrafiltration to the border of nanofiltration*. Trends in Food Science & Technology. 42(1); pp. 44–63. doi.org/10.1016/j.tifs.2014.11.005
- [18] Baker R.W. (2012). *Chapter 3 - Membranes and Modules*. Membrane Technology and Applications. Volume 1, 3, pp. 97-178. R.W. Baker (Ed.). John Wiley & Sons, Ltd, Reino Unido.
- [19] Neggaz Y., Vargas M.L., Dris A.O., Riera F., Alvarez R. (2007). *A combination of serial resistances and concentration polarization models along the membrane in ultrafiltration of pectin and albumin solutions*. Separation and Purification Technology 54(1), pp. 18–27. doi.org/10.1016/j.seppur.2006.08.017
- [20] Qiu N., Tian Y., Qiao S., Deng H. (2009). *Apple Pectin Behavior Separated by Ultrafiltration*. Agricultural Sciences in China. 8(10); pp. 1193–1202. [doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60329-6](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60329-6)
- [21] Kang J., Hua X., Yang R., Chen Y., Yang H. (2015). *Characterization of natural low-methoxyl pectin from sunflower head extracted by sodium citrate and purified by ultrafiltration*. Food Chemistry. 180; pp. 98–105. doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.037
- [22] Qi T., Chen X., Shi W., Wang T., Qiu M., Da X., Wen J., Yiqun V. (2021). *Fouling behavior of nanoporous ceramic membranes in the filtration of oligosaccharides at different temperatures*. Separation and Purification Technology. 278; 119589. doi.org/10.1016/j.seppur.2021.119589
- [23] Benito-Román Ó., Alonso-Riaño P., Díaz de Cerio E., Sanz M.T., Beltrán S. (2022). *Semi-continuous hydrolysis of onion skin wastes with subcritical water: Pectin recovery and oligomers identification*. Journal of Environmental Chemical Engineering. 10(3); 107439. doi.org/10.1016/j.jece.2022.107439
- [24] Benito J.M., Conesa A., Rodríguez M.A. (2004). *Membranas cerámicas. Tipos, métodos de obtención y caracterización*. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio. 43(5); pp. 829–42. doi.org/10.3989/cyv.2004.v43.i5.410

- [25] Krawczyk H, Arkell A, Jönsson AS. (2011). *Membrane performance during ultrafiltration of a high-viscosity solution containing hemicelluloses from wheat bran*. Separation and Purification Technology. 83; pp. 144–50. doi.org/10.1016/j.seppur.2011.09.028
- [26] Doan N.T.T., Lai Q.D. (2021). *Ultrafiltration for recovery of rice protein: Fouling analysis and technical assessment*. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 70; 102692. doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102692
- [27] Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D. (2006, 12 agosto). *Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples*. National Renewable Energy Laboratory. Recuperado 15 de Abril de 2022, de <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42623.pdf>
- [28] Echavarría AP, Pagan J, Ibarz A. (2013). *Optimization of Maillard reaction products isolated from sugar-amino acid model system and their antioxidant activity*. Afinidad. 70(562), pp. 86-92. https://www.academia.edu/31462120/Optimization_of_Maillard_reaction_products_isolated_from_sugar_amino_acid_model_system_and_their_antioxidant_activity
- [29] Salak F., Daneshvar S., Abedi J., Furukawa K. (2013). *Adding value to onion (Allium cepa L.) waste by subcritical water treatment*. Fuel Processing Technology. 112; pp. 86–92. doi.org/10.1016/j.fuproc.2013.03.001
- [30] Pińkowska H., Krzywonos M., Wolak P., Złocińska A. (2019). *Production of uronic acids by hydrothermolysis of pectin as a model substance for plant biomass waste*. Green Processing and Synthesis. 8(1); pp. 683–90. doi.org/10.1515/gps-2019-0039
- [31] Eseyin A.E., Steele P.H. (2015). *An overview of the applications of furfural and its derivatives*. International Journal of Advanced Chemistry. 3(2); pp. 42-47. doi.org/10.14419/ijac.v3i2.5048
- [32] Rosatella A.A., Simeonov S.P., Frade R.F.M., Afonso C.A.M. (2011). *5-Hydroxymethylfurfural (HMF) as a building block platform: Biological properties, synthesis and synthetic applications*. Green Chemistry. 13(4); pp. 754-793. doi.org/10.1039/C0GC00401D