

UNIVERSIDAD DE BURGOS | Facultad de Ciencias

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Curso 2025-2026



**VALORIZACIÓN DEL RASTROJO DE
MAÍZ MEDIANTE AGUA SUBCRÍTICA:
ESTUDIO DEL EFECTO DEL EMPLEO
DE MODIFICADORES VERDES EN LA
HIDRÓLISIS DE LA MATRIZ
LIGNOCELULÓSICA**

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos

Área de Ingeniería Química

Tutores: Óscar Benito Román y María Teresa Sanz Díez

Silvia García Medina



ANEXO DE SOSTENIBILIZACIÓN CURRICULAR (1)

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

CURSO 2025-2026

Dña. Silvia García Medina, estudiante matriculada en el Trabajo Fin de Grado del Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

REFLEXIÓN SOBRE LAS COMPETENCIAS DE SOSTENIBILIDAD DESARROLLADAS EN EL TRABAJO FIN DE GRADO (entre 600 y 800 palabras):

Este Trabajo de Fin de Grado se ha centrado en la valorización del rastrojo de maíz mediante el empleo de disolventes verdes, lo que representa un claro ejemplo de cómo la investigación científica puede alinearse con las competencias de sostenibilidad y con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). A lo largo del desarrollo del proyecto se integran conocimientos técnicos, conciencia ambiental y responsabilidad social, consiguiendo un aprendizaje orientado en la búsqueda de soluciones reales a problemas globales.

En primer lugar, el trabajo se ha relacionado directamente con el ODS 4: Educación de calidad, ya que implica obtener competencias científicas, metodológicas y éticas asociadas a la sostenibilidad. La elaboración del proyecto ha necesitado un análisis crítico de la bibliografía, aplicando protocolos experimentales y evaluación de resultados con una perspectiva ambiental. Este proceso no solo ha fortalecido mi formación técnica, sino que también ha fomentado una educación relacionada con el desarrollo sostenible, comprendiendo que la ciencia es una herramienta para mejorar el entorno.

La investigación también se vincula con el ODS 7: Energía asequible y no contaminante, al estudiar alternativas a procesos industriales convencionales que suelen implicar altos consumos energéticos y el uso de disolventes contaminantes. El empleo de agua subcrítica y modificadores verdes como el etanol o NADES supone una aproximación a tecnologías más limpias y eficientes, reduciendo el impacto ambiental y promoviendo modelos de producción energética más responsables. Además, el análisis del poder calorífico del residuo sólido abre la posibilidad de su uso como biocombustible, contribuyendo al aprovechamiento integral de recursos renovables.

En relación con el ODS 8: Trabajo decente y crecimiento económico, este proyecto pone de manifiesto el potencial económico de la valorización de residuos agrícolas. Transformar subproductos como el rastrojo de maíz en compuestos de valor añadido puede generar nuevas oportunidades de empleo en sectores como la biotecnología, bioeconomía e industria alimentaria sostenible. De esta forma, se promueve un crecimiento económico basado en la innovación y en la eficiencia de recursos, alejándose de modelos de economía lineal.

El ODS 9: Industria, innovación e infraestructura se ve reflejado en el enfoque tecnológico del trabajo. El diseño experimental, el uso de reactores específicos y el análisis instrumental avanzado son de gran importancia en la innovación científica para el desarrollo de procesos industriales más sostenibles. La investigación impulsa la modernización de infraestructuras productivas y fomenta la transferencia de conocimiento del ámbito académico hacia aplicaciones industriales reales.

(1) Las memorias presentadas deberán contar con el Anexo de Sostenibilización Curricular. A tal efecto, **se incluirá tras el documento con el visto bueno de los tutores del trabajo.** (Reglamento interno de la Facultad de Ciencias para la gestión de la asignatura "Trabajo Fin de Grado" de la Facultad de Ciencias, aprobado en Junta de Facultad de 11 de febrero de 2022, modificado en Junta de Facultad el 7 de junio de 2023)



Por su parte, el ODS 11: Ciudades y comunidades sostenibles se relaciona con la gestión responsable de residuos. La quema o eliminación inadecuada de restos agrícolas genera contaminación atmosférica y problemas ambientales locales. Al proponer la valorización de esta biomasa, el proyecto contribuye indirectamente a reducir la huella ecológica de comunidades rurales y urbanas, favoreciendo entornos más saludables y sostenibles.

El ODS 12: Producción y consumo responsables es uno de los objetivos más directamente implicado. El núcleo de trabajo está en convertir un residuo en recurso, aplicando principios de economía circular. La reducción del desperdicio, el uso de disolventes menos agresivos y la optimización de procesos experimentales reflejan una conciencia sobre la necesidad de producir de manera eficiente y responsable, minimizando impactos negativos.

En cuanto al ODS 13: Acción por el clima, la investigación contribuye a la reducción del cambio climático al proponer alternativas que disminuyen emisiones asociadas a la quema de residuos agrícolas y al uso de combustibles fósiles. La valorización de biomasa favorece un balance de carbono más equilibrado y promueve prácticas en contra del calentamiento global.

El ODS 15: Vida de ecosistemas terrestres también se ve beneficiado, ya que una gestión adecuada de residuos agrícolas evita la degradación del suelo y la contaminación de ecosistemas. La valorización del rastrojo reduce la presión sobre recursos naturales y fomenta una relación más respetuosa con el medio terrestre.

Finalmente, el ODS 17: Alianzas para lograr objetivos se refleja en la colaboración entre la universidad, grupos de investigación y potenciales aplicaciones industriales. La sostenibilidad requiere cooperación, y este trabajo demuestra cómo la unión de conocimientos puede generar soluciones integrales.

En conjunto, en este trabajo he desarrollado tanto competencias técnicas como una visión ética global de la sostenibilidad. Considero que he adquirido la capacidad de analizar problemas desde varias perspectivas, comprendiendo que la innovación científica debe ir acompañada de responsabilidad social y ambiental. Este enfoque integral me parece esencial para una contribución activa hacia un futuro más sostenible.

Burgos, a 12 de marzo de 2026

Fdo.: Silvia García Medina

(1) Las memorias presentadas deberán contar con el Anexo de Sostenibilización Curricular. A tal efecto, **se incluirá tras el documento con el visto bueno de los tutores del trabajo.** (Reglamento interno de la Facultad de Ciencias para la gestión de la asignatura "Trabajo Fin de Grado" de la Facultad de Ciencias, aprobado en Junta de Facultad de 11 de febrero de 2022, modificado en Junta de Facultad el 7 de junio de 2023)

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJECTIVES	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1. MATERIA PRIMA Y REACTIVOS	5
3.2. EQUIPOS EMPLEADOS	5
3.2.1. Equipo empleado para la hidrólisis con agua subcrítica	5
3.2.2. Equipos empleados para el análisis	6
3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	7
3.3.1. Caracterización de muestras líquidas	7
3.3.2. Caracterización de muestras sólidas	8
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
4.1. COMPOSICIÓN DE LA MATERIA PRIMA	9
4.2. HIDRÓLISIS EN MEDIO SUBCRÍTICO	10
4.2.1. Gradiente de temperatura y energía consumida	10
4.2.2. Caracterización de líquidos	10
4.2.3. Caracterización de sólidos	19
5. CONCLUSIONES	20
6. BIBLIOGRAFÍA	21

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado la valorización del rastrojo de maíz empleando agua subcrítica (SW – subcritical water) como medio de reacción, evaluando el efecto de la adición de modificadores verdes. Los experimentos se realizaron en un reactor discontinuo a 175 °C y 50 bar durante 1 h, empleándose como modificadores etanol (al 20 y 40%, v/v) y un disolvente eutéctico natural profundo (NADES, por sus siglas en inglés) hidrófobo formado por mentol y ácido láurico (relación molar 2:1), al 5% (v/v). Los resultados se compararon con los obtenidos tras el tratamiento con SW, analizando las muestras líquidas y sólidas obtenidas.

En la fracción líquida se observó mayor solubilización de hemicelulosa que de celulosa, con una concentración oligomérica de xilosa cinco veces superior a la de glucosa. La adición de etanol favoreció la hidrólisis y promovió la degradación específica de la lignina, evidenciada por el incremento de compuestos fenólicos, destacando el ácido ferúlico y el ácido p-cumárico, que alcanzaron máximos de 129.3 mg/mL y 18.9 mg/mL, respectivamente. La liberación de estos ácidos confirmó el inicio de la deslignificación.

El análisis del residuo sólido mostró diferencias según el modificador empleado. Con el etanol al 40 % (v/v) se registró una reducción significativa de lignina (33.3 % insoluble y 4.3 % soluble) y con el empleo de SW o etanol al 40 % se produjo un enriquecimiento de celulosa del 15 %. En cambio, el uso de NADES presentó menor eficacia en la extracción de compuestos de interés (como derivados de la lignina) y dificultades en las etapas de separación y recuperación debido a su carácter hidrofóbico.

Los resultados desvelan el potencial del agua subcrítica (junto con la adición de modificadores como el etanol) como medida para favorecer la hidrólisis del rastrojo de maíz, convirtiéndose en una estrategia sostenible para solucionar el problema de la recalcitrancia de la biomasa lignocelulósica, que limita la recuperación de compuestos de interés.

ABSTRACT

In this study, the valorization of corn stover was investigated using subcritical water (SW) as the reaction medium, evaluating the effect of adding green modifiers. The experiments were carried out in a batch reactor at 175 °C and 50 bar for 1 h, using ethanol (at 20 and 40%, v/v) and a hydrophobic natural deep eutectic solvent (NADES) composed of menthol and lauric acid (2:1 molar ratio) at 5% (v/v) as modifiers. The results were compared with those obtained after treatment with SW, analyzing the liquid and solid samples generated.

In the liquid fraction, greater solubilization of hemicellulose than cellulose was observed, with an oligomeric xylose concentration five times higher than that of glucose. The addition of ethanol enhanced hydrolysis and promoted selective lignin degradation, as evidenced by the increase in polyphenolic compounds, particularly ferulic acid and p-coumaric acid, which reached maximum values of 129.3 mg/mL and 18.9 mg/mL, respectively. The release of these acids confirmed the onset of delignification.

Analysis of the solid residue revealed differences depending on the modifier used. With 40% (v/v) ethanol, a significant reduction in lignin content (33.3% insoluble and 4.3% soluble lignin) was observed, and with the use of SW or 40 % ethanol led to a 15% enrichment in cellulose. In contrast, the use of NADES showed lower efficiency in extracting compounds of interest (such as derivatives of lignin) and presented difficulties during the separation and recovery stages due to its hydrophobic nature.

These results highlight the potential of subcritical water as a strategy to enhance corn stover hydrolysis, representing a sustainable approach to overcome the recalcitrance of lignocellulosic biomass, which limits the recovery of valuable compounds.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el elevado consumo energético y la progresiva escasez de recursos naturales han generado una urgente necesidad global de desarrollar fuentes de energía sostenibles [1]. En este contexto, el concepto de desarrollo sostenible y el respeto por el medio ambiente han adquirido un papel prioritario en la investigación científica y tecnológica [2]. Como alternativa a la dependencia de los combustibles fósiles tradicionales [1], las estrategias actuales se orientan hacia la valorización de recursos renovables, especialmente de la biomasa disponible en la naturaleza.

La biomasa se define como la fracción orgánica biodegradable procedente de residuos de origen vegetal, entre los que destacan los residuos agrícolas. Estos se generan a gran velocidad y, cuando no se gestionan adecuadamente, su eliminación o quema produce impactos negativos sobre el entorno, incrementando los niveles de contaminación. Por ello, su conversión y valorización se presentan como medidas imprescindibles para minimizar sus efectos nocivos y transformarlos en recursos de interés [2].

En el caso del maíz, únicamente alrededor del 20 % de la masa total corresponde a la parte comestible, mientras que el resto se considera residuo [3]. Estudios recientes identifican el rastrojo de maíz como una de las fuentes lignocelulósicas más prometedoras, donde el residuo puede representar cerca del 50 % de la planta [4]. Según datos publicados por la FAO, la producción mundial de maíz en el 2024 alcanzó 1218 millones de toneladas y en el caso de España superó los 3.5 millones de toneladas en un área cosechada cerca de 290 mil hectáreas. Debido a su elevada proporción de residuo y a su composición química, el rastrojo de maíz se considera una materia prima adecuada para su valorización, ya que evita la competencia con la producción alimentaria y responde a criterios de sostenibilidad [5].

La valorización de este tipo de residuos se aborda mediante el concepto de biorrefinería de biomasa lignocelulósica, cuyo objetivo es fraccionar sus tres componentes estructurales principales: celulosa, hemicelulosa y lignina [6]. La celulosa es un polisacárido constituido por cadenas lineales de glucosa unidas mediante enlaces β -1 \rightarrow 4 [7] y presenta una estructura semicristalina formada por regiones ordenadas y desordenadas. Las primeras aportan rigidez y resistencia, mientras que las segundas confieren flexibilidad y tenacidad [8]; sin embargo, esta misma organización estructural dificulta su hidrólisis [9]. Por su parte, la hemicelulosa es un heteropolisacárido compuesto principalmente por azúcares de cinco carbonos como xilosa y arabinosa [10]. Dentro de este grupo, los arabinoxilanos, habituales en cereales, están formados por cadenas de xilosa con ramificaciones de arabinosa y pueden presentar ácido ferúlico esterificado, lo que favorece el entrecruzamiento de cadenas y amplía sus posibles aplicaciones [11]. Finalmente, la lignina es un polímero natural complejo, amorfo y tridimensional presente en las paredes celulares vegetales, constituido principalmente por monolignoles aromáticos como los alcoholes p-cumarílico, coniferílico y sinapílico, precursores de las unidades H (p-hidroxifenilo), G (guayacilo) y S (siringilo), respectivamente. Además, poseen hidroxicinamatos como los ácidos p-cumárico y ferúlico, el primero esterificado a las unidades S de la lignina y el segundo esterificado a arabinoxilanos, actuando como enlace entre la hemicelulosa y la lignina [12].

El aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica presenta diversas ventajas, entre ellas su renovabilidad, biodisponibilidad, bajo coste, así como su alto contenido en celulosa, que incrementa el valor global de la materia prima y la rentabilidad del proceso [2]. La eliminación de la hemicelulosa y lignina puede resultar en un producto sólido enriquecido en celulosa, pudiendo ser transformado en nanomateriales. Sin embargo, la fuerte unión entre sus componentes genera una estructura recalcitrante, es decir, una resistencia a la separación de los tres polímeros estructurales, que dificulta su descomposición eficiente y hace necesaria una etapa previa de pretratamiento [13]. Los métodos convencionales suelen implicar el uso de productos químicos agresivos, elevados requerimientos energéticos y una separación incompleta de los componentes, lo que conlleva importantes impactos medioambientales [1].

Como alternativa a estos procedimientos, se plantea el desarrollo de tecnologías verdes orientadas a reducir el impacto ambiental y mejorar la eficiencia de los procesos [6]. Entre ellas destaca el uso de agua subcrítica (SW, por sus siglas en inglés), definida como agua líquida sobrecalentada sometida a presiones elevadas que permiten aumentar su temperatura

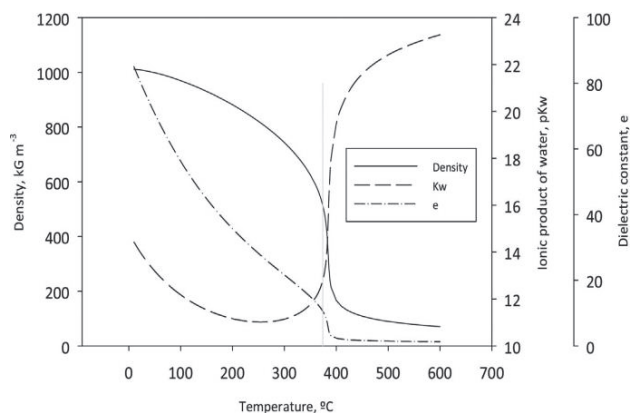


Figura 1. Diagrama que muestra el cambio de las propiedades físicas del agua en condiciones subcríticas [17].

por encima del punto de ebullición sin alcanzar el punto crítico, evitando así su evaporación [14]. En estas condiciones se producen cambios significativos en sus propiedades fisicoquímicas (representados en la Fig. 1), como la disminución de la constante dieléctrica, la viscosidad y la tensión superficial, así como el aumento de la difusividad, adquiriendo un comportamiento similar al de los disolventes orgánicos, pero sin los problemas asociados a su purificación por tratarse de agua [15], [16]. Además, el incremento de la temperatura provoca una mayor ionización del agua y, en consecuencia, un aumento de la concentración de

protones y grupos OH⁻, pasando de 10⁻¹⁴ a 10⁻¹¹, lo que favorece las reacciones de hidrólisis y la despolimerización de polisacáridos en oligómeros y monómeros [18].

La hidrólisis con agua subcrítica ha demostrado ser una tecnología eficiente para el fraccionamiento de biomasa lignocelulósica [6] y la recuperación de compuestos bioactivos mediante el control de temperatura y presión [16]. Asimismo, se considera un método económico y respetuoso con el medioambiente, con mayor eficacia de despolimerización que los tratamientos en condiciones atmosféricas [18]. Sin embargo, tal y como se representa en la Fig. 2, la selección adecuada de las condiciones de operación (temperatura y tiempo de operación, principalmente) es fundamental para evitar la degradación excesiva de los compuestos disueltos en medio subcrítico y la formación de productos indeseados [18].

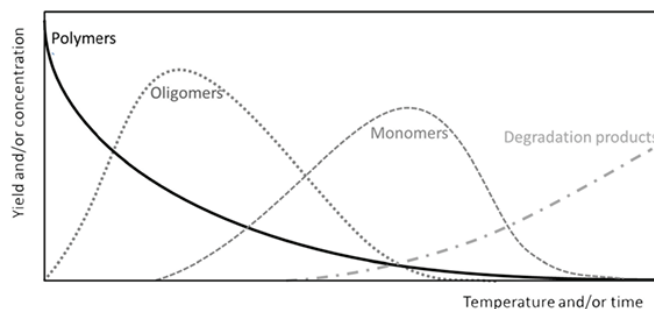


Figura 2. Esquema general simplificado de la secuencia de reacciones que conducen a la hidrólisis de polímeros en oligómeros, monómeros y productos de degradación [18].

Con el objetivo de mejorar el rendimiento y la selectividad del agua subcrítica en la hidrólisis de la biomasa, se plantea la incorporación de modificadores verdes en diferentes proporciones. Entre ellos, se ha estudiado la adición de etanol, que favorece la disolución de lignina y hemicelulosa y facilita la separación de la celulosa [1], así como el empleo de disolventes eutécticos profundos naturales (NADES, por sus siglas en inglés).

El uso del etanol como modificador se ajusta a los principios de la química verde debido a su capacidad de recuperación y reciclaje, aspecto fundamental en los procesos de valorización

de biomasa lignocelulósica [1]. Su aplicación favorece la deslignificación del material vegetal y permite obtener un residuo sólido enriquecido en celulosa, susceptible de transformarse posteriormente en nanofibras. Además, el etanol se considera un disolvente idóneo por su bajo coste, reducida toxicidad y facilidad de recuperación. Entre sus principales ventajas destacan su capacidad de penetrar con facilidad en la estructura de la biomasa y su efecto en la disminución de la tensión superficial del medio líquido [19].

De acuerdo con la bibliografía, variables como la concentración de etanol en el disolvente, la temperatura y el tiempo de extracción influyen de forma significativa en el rendimiento del proceso [20]. Se han descrito máximos rendimientos en la extracción de carbohidratos y compuestos fenólicos en paja de cebada y canola empleando etanol acuoso presurizado al 20 %, a 180 °C, 50 bar y durante 40 min [6]. La selección del disolvente está directamente relacionada con la naturaleza del analito que se pretende extraer; cuando se utilizan mezclas binarias, se busca que uno de los componentes incremente la solubilidad del compuesto objetivo mientras el otro facilite su liberación. En el caso de los compuestos fenólicos, son habituales las mezclas acuosas de alcoholes [20], lo que puede contribuir adicionalmente a la deslignificación de la biomasa.

Por otro lado, los disolventes eutécticos profundos naturales o NADES (por sus siglas en inglés) se definen como combinaciones de moléculas de origen natural —como azúcares, ácidos orgánicos o aminoácidos— que, al mezclarse, presentan un punto de fusión considerablemente inferior al de sus componentes individuales. En estas mezclas, uno de los compuestos actúa como donante de enlaces de hidrógeno (HBD) y el otro como aceptor (HBA) [21]. En términos generales, un sistema eutéctico corresponde a una mezcla cuyas proporciones específicas permiten alcanzar el punto de fusión más bajo posible, siendo sus propiedades finales dependientes de la selección de los componentes, su relación molar y las condiciones operativas aplicadas [22]. Se caracterizan por su biodegradabilidad y biocompatibilidad, lo que los posiciona como alternativas a los disolventes orgánicos convencionales, ya que reducen el impacto ambiental y pueden mejorar la solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad de compuestos activos [23]. Sin embargo, su elevada viscosidad constituye una de sus principales limitaciones frente a los disolventes tradicionales [21].

De acuerdo con bibliografía, se ha demostrado que la combinación de mentol como HBA y ácido láurico como HBD en una relación molar de 2:1 se comporta como un disolvente hidrófobo capaz de promover la hidrólisis de polisacáridos y generar extractos con rendimientos superiores al 30 % definido como g de carbohidrato por 100 g de materia prima inicial [24]. Además, los extractos obtenidos demostraron alta capacidad antioxidante. Por lo tanto, esta mezcla también se ha considerado en este trabajo para evaluar el fraccionamiento de los biopolímeros del rastrojo de maíz.

En este contexto, el presente trabajo se centra en el estudio de la hidrólisis del rastrojo de maíz mediante agua subcrítica y la adición de modificadores del medio. Se analizará la composición de la fracción líquida obtenida, identificando los compuestos disueltos, así como la composición del residuo sólido resultante, estudiando los cambios estructurales producidos y el efecto global del tratamiento.

2. OBJECTIVES

The main objective of this work is to study the hydrolysis of corn stover for the recovery of valuable compounds. To this end, subcritical water and different green modifiers, such as ethanol and NADES, will be used. The following partial objectives have been set:

- I. To study and evaluate the effect of the type of modifier and the amount added as a method of separating the structural components of corn lignocellulosic biomass.
- II. Identify and characterize the components dissolved in the liquid extract obtained from hydrolysis with subcritical water.

- III. Analyze the dissolved phenolic compounds to determine the extent of delignification.
- IV. Identify and characterize the components of the solid resulting from pretreatment with the subcritical medium.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIA PRIMA Y REACTIVOS

Se ha utilizado como materia prima una mezcla de tallos y hojas de maíz (*Zea mays*) proporcionada por un agricultor local de Saldaña (Palencia, España). Esta se trituró con un molino Retsch SM100, consiguiendo un tamaño de partícula inferior a 0.5 mm.

Los reactivos empleados como modificadores han sido etanol absoluto a dos concentraciones diferentes (20 % y 40 %, v/v) suministrado por VWR Chemicals y un NADES 5 % (v/v) con relación molar de 2:1 formado por mentol (99 %) provisto por Sigma-Aldrich, y ácido láurico (para síntesis, 99 %) proporcionado por Merck Schuchardt OHG (Hohenbrunn, Alemania).

Otros reactivos empleados en las analíticas llevadas a cabo fueron los siguientes: ácido sulfúrico (H_2SO_4) empleado para la hidrólisis ácida (98 % de pureza, Labbox, España) y para la fase móvil del HPLC (96 % de pureza, Suprapur-Merck KGaA-Darmstadt, Alemania). También se empleó carbonato cálcico (99 % VWR, BDH Chemicals), acetato amónico (para HPLC, 98 % VWR Chemicals, agua mili-Q (ultrapura) y agua destilada.

Como patrones de peso molecular se utilizaron estándares de pululano de un rango de 0,342–400 kDa proporcionados por PSS Polymer Standards Service GmbH (Mainz, Alemania). Como patrones comerciales de azúcares y productos de degradación se utilizaron los siguientes: glucosa (Glu, 99.5 %), xilosa (Xyl, 99 %), arabinosa (Ara, 99 %) y furfural (99 %) que fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA); 5-hidroxiacetilfurfural (HMF, 97 %) proporcionado por Biosynth Ltd. (Reino Unido); ácido levulínico (para síntesis, 98 %) y ácido láctico (DL) 90 %, proporcionados por Merck KGaA (Darmstadt, Alemania); ácido acético (98 %) suministrado por VWR Chemicals y ácido fórmico (98 %) por Panreac AppliChem.

3.2. EQUIPOS EMPLEADOS

3.2.1. Equipo empleado para la hidrólisis con agua subcrítica

Para el proceso de hidrólisis en agua subcrítica, se utilizó un reactor discontinuo de tanque agitado, tal y como se muestra en la Fig. 2 (a y b), diseñado y montado por el propio grupo BIOIND. Este reactor, fabricado en acero inoxidable, tiene una capacidad máxima de 0.5 L, siendo la presión y temperatura de operación máximas 60 bar y 250 °C, respectivamente. Se rodeó con una camisa de calentamiento de cerámica (230 V, 4000 W, \varnothing 95 mm, 160 mm de altura) para alcanzar la temperatura deseada y mantenerla constante. Además, contaba con un plato agitador magnético, un manómetro, tres válvulas (de muestreo, de purga y de entrada de nitrógeno), y un sensor de temperatura Pt100 colocado dentro del reactor conectado a un sistema PID para regular y registrar la temperatura durante todo el proceso [5].

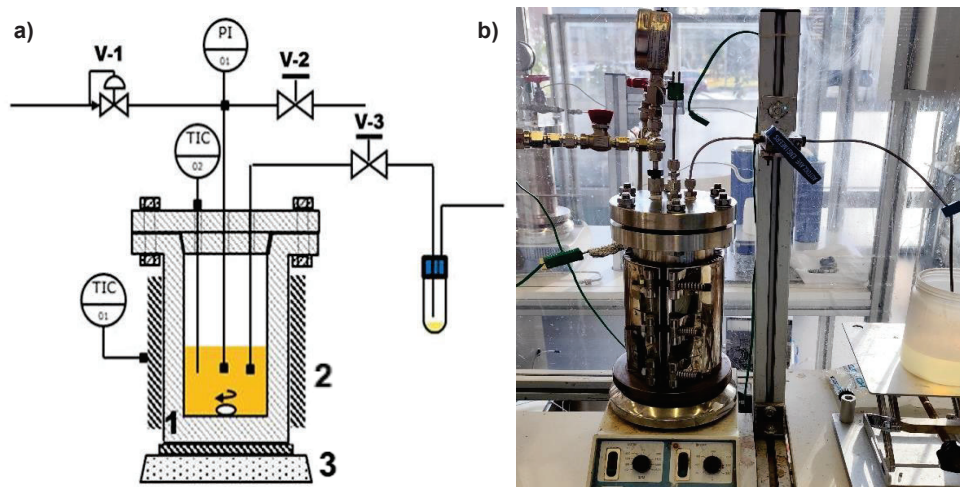


Figura 3 (a y b). Reactor discontinuo de agua subcrítica diseñado por nuestro equipo de investigación BIOIND: (1) Reactor de acero; (2) camisa calefactora; (3) plato agitador magnético; V-1: válvula de entrada de gas nitrógeno (N_2); V-2: válvula de purga de presión; V-3: válvula de muestreo; TIC-01: control de temperatura externo; TIC-02: control de temperatura de extracción; PI-01: manómetro [25].

Las condiciones de trabajo elegidas fueron 175 °C de temperatura y 50 bar de presión gracias a la presurización con nitrógeno, ya que temperaturas en torno a 170–180 °C han demostrado ser suficientes para lograr la hidrólisis de la fracción hemicelulósica en medio subcrítico sin adición de ningún modificador [17]. Para su uso, lo primero fue introducir en el reactor 10 g de la materia prima con 200 mL de disolvente, cuya composición fue variando en función del experimento (agua, 20 % etanol/agua (v/v), 40 % etanol/agua (v/v) y 5 % NADES/agua (v/v)). Después se añadió un agitador magnético para favorecer la uniformidad de la mezcla, fijando la velocidad de agitación a 500 rpm.

A través de una válvula se obtuvieron las muestras periódicamente, cada 10 minutos, incluyendo una muestra a tiempo 0, justo al alcanzar la temperatura de operación y comenzar el periodo isoterma de 1 h, tras lo cual se retiró la camisa, se dejó enfriar el equipo y se despresurizó cuando la temperatura fue inferior a 90 °C. Se anotó la energía consumida durante el periodo de calentamiento y la fase isotérmica y se midió el pH de las muestras obtenidas.

Por último, se hizo una filtración a vacío del residuo final para separar la parte sólida de la líquida. El residuo sólido obtenido se lavó, se secó a 105 °C, se pesó y guardó para su posterior caracterización.

3.2.2. Equipos empleados para el análisis

3.2.2.1. HPLC para la determinación de azúcares

Para la determinación de azúcares, se utilizó el equipo de cromatografía de líquidos (Infinity II 1260 de Agilent Technologies). Este equipo emplea una columna Bio-rad Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm, Bio-Rad) con la correspondiente precolumna Micro-Guard Cation H^+ (Bio-Rad) y con 2 detectores (de longitud de onda variable (VWD) y de índice de refracción (RID)).

Como fase móvil se empleó ácido sulfúrico 0.005 M con un flujo de bomba de 0.6 mL/min. Por otro lado, la temperatura de la columna y del detector fueron de 40 °C y la duración de cada inyección fue de 60 min siendo el volumen de inyección de 20 μ L (para la caracterización de la fracción líquida) y de 10 μ L (para la caracterización de la fracción sólida), tal y como se detallará más adelante. Los patrones utilizados para el análisis fueron los mencionados en el apartado 3.1.

3.2.2.2. HPLC para la determinación de polifenoles

Para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se empleó un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD 1100 de Agilent Technologies) equipado con una columna Kinetex Biphenyl (5 μm , 100 \AA , 250 \times 4.6 mm). La detección se llevó a cabo a 280 nm y 330 nm, longitudes de onda seleccionadas por corresponder a los máximos de absorbancia característicos de los compuestos fenólicos.

La fase móvil A estuvo constituida por acetato amónico 5 mm en agua con un 1 % de ácido acético, mientras que la fase móvil B consistió en acetato amónico 5 mm en acetonitrilo con un 1 % de ácido acético. La separación se realizó mediante un gradiente de elución descrito en [26] seguido de un tiempo de acondicionamiento de 10 min. El flujo total de la fase móvil fue de 0.8 mL/min y la temperatura de la columna se mantuvo constante a 25 °C. Las muestras se filtraron previamente al análisis por HPLC mediante filtros de jeringa de celulosa regenerada con un tamaño de poro de 0.22 μm .

La cuantificación de los compuestos fenólicos presentes se llevó a cabo a partir de curvas de calibrado elaboradas con cada uno de los patrones comerciales correspondientes y la identificación de estos se hizo comparando los tiempos de retención y espectros de los patrones.

3.2.2.3. GPC

Para la determinación de la distribución de pesos moleculares se utilizó la técnica analítica de GPC o cromatografía de exclusión por tamaño, cuyo principio es la separación por tamaños, asociando a cada tiempo de elución un peso molecular.

El sistema cromatográfico empleado fue el HPLC Infinity II 1260 de Agilent Technologies, acoplado a una precolumna PL Aquagel-OH (7.5 mm \times 50 mm, 8 μm) y dos columnas unidas en serie (PL Aquagel-OH 30, PL Aquagel-OH 40, 300 mm \times 7.5 mm, 8 μm) de Agilent Technologies unido a un detector de índice de refracción (RID).

Como fase móvil se utilizó acetato de amonio 0.01 M con un flujo de bomba de 0.7 mL/min. Como se ha indicado anteriormente, para realizar la calibración del peso molecular se dispusieron como patrones un conjunto de estándares de pululano. En el tratamiento de los datos se estudiaron las fracciones de peso molecular superiores a 5 kDa, entre 1 y 5 kDa e inferiores de 1 kDa, analizados con el software Agilent OpenLab Data Analysis 2.5.

En la preparación de las muestras líquidas para efectuar la distribución de pesos moleculares, se utilizó un evaporador concentrador Stuart de la marca Cole-Parmer. Su función fue evaporar el solvente de la muestra sin necesidad de utilizar calor, empleando una corriente de gas nitrógeno para eliminar por completo la parte líquida de la muestra. De esta forma, se pudieron redissolver las muestras en la fase móvil del GPC evitando posibles problemas en el análisis.

3.2.2.4. Otros equipos

Para la determinación del pH, se utilizó un pH-metro Crison GLP 22 calibrado con las respectivas soluciones tampón. Por otra parte, se utilizó el espectrofotómetro Hitachi U-2000 UV-Visible.

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1. Caracterización de muestras líquidas

La caracterización de las muestras líquidas tuvo dos etapas. En primer lugar, las muestras obtenidas del tratamiento con agua subcrítica (con o sin modificadores) se inyectaron directamente en el HPLC tras una centrifugación (Thermo Scientific Sorvall ST16R) a 5000 rpm durante 5–10 min y filtración (0.22 μm), lo que permitió la cuantificación de azúcares libres monoméricos, ácidos orgánicos y productos de degradación formados durante el tratamiento con agua subcrítica. Posteriormente, una alícuota de 1 mL de cada muestra

tomada se sometió a una hidrólisis ácida con H_2SO_4 en autoclave a 121 °C, según el protocolo NREL/TP-510-42623 [27], lo que permitió romper los oligómeros y cuantificar los azúcares totales disueltos durante el tratamiento con agua subcrítica. Las muestras hidrolizadas con H_2SO_4 se han de neutralizar con carbonato cálcico hasta alcanzar un pH de 5-6 antes de su inyección en la columna de HPLC.

A continuación, se muestra la Eq. (1), donde los azúcares totales corresponden a los azúcares obtenidos tras la hidrólisis ácida y los azúcares monoméricos a los obtenidos de forma libre en el extracto líquido tras el tratamiento con SW.

$$\text{Azúcares oligoméricos} = \text{Azúcares totales} - \text{Azúcares monoméricos} \quad (1)$$

Se va a calcular el rendimiento de la hidrólisis para la glucosa, xilosa y arabinosa, el cual se define como la medida para averiguar qué parte del azúcar estructural presente en la biomasa se ha liberado al medio líquido tras el tratamiento con SW. Este valor se va a expresar respecto a la cantidad inicial de materia prima cargada al reactor.

$$\text{Rendimiento}(\%) = \frac{\text{Concentración azúcar} \times \text{Volumen líquido}}{\text{masa materia prima} \times \text{fracción polímero} \times \text{factor anhidro}} \times 100 \quad (2)$$

De acuerdo a la Eq. (2), la concentración de azúcar se refiere a la concentración determinada en el líquido después de la hidrólisis, el volumen del líquido es el volumen de disolvente colocado en el reactor, la masa de la materia prima corresponde a la cantidad de biomasa colocada en el reactor, la fracción de polímero pertenece a la composición del sólido y el factor anhidro equivale al coeficiente que se utiliza para relacionar la masa de un polímero presente en la biomasa con la masa del monómero que se obtiene tras la hidrólisis.

La caracterización de la fase líquida generada tras tratamiento con SW se completó determinando la distribución de pesos moleculares de los oligómeros disueltos mediante GPC (equipo descrito en la sección 3.2.2.3), así como la determinación de polifenoles y compuestos derivados de la lignina, empleando el sistema cromatográfico descrito en la sección 3.2.2.2.

3.3.2. Caracterización de muestras sólidas

Se realizaron dos tipos de análisis a las muestras sólidas (materia prima y sólido generado tras el tratamiento con agua subcrítica (con y sin modificadores)). Por una parte, se realizó su análisis elemental (C, H, N y S) utilizando un analizador elemental FLASH 2000 (Thermo Scientific, EE.UU.), situado en el Parque Científico Tecnológico (PCT) de la Universidad de Burgos. El contenido de oxígeno de las muestras se determinó por diferencia, teniendo en cuenta el contenido de cenizas de la muestra. El análisis elemental permitió la evaluación del poder calorífico superior (HHV – higher heating value), un indicador de la entalpía de la combustión completa de un combustible [28] utilizando la Eq. (3).

$$\text{HHV} \left(\frac{MJ}{kg} \right) = [151.2C + 499.7H + 45.0S + 47.7O + 27.0N] \times (2.326 \times 10^{-3}) \quad (3)$$

Por otra parte, para la determinación de los carbohidratos estructurales, cenizas, humedad y lignina se siguió el protocolo NREL/TP-510-42618 [29]. A continuación, se detallan los pasos seguidos en el desarrollo de este último protocolo:

- Determinación de la humedad

El porcentaje de humedad se determinó por diferencia entre el peso inicial de la muestra y el peso de la muestra tras la estufa a 105 °C durante 24 h, respecto al peso inicial de la muestra. Todos los valores finales de la Tabla 1, en la que se presenta la composición química de la materia prima y de sólidos generados tras los diferentes tratamientos, se han expresado en base seca.

- Determinación de las cenizas

Los crisoles con las muestras por duplicado sacadas de la estufa se metieron a la mufla a 575 °C durante mínimo 4 h. Las cenizas se determinaron por diferencia entre el peso del crisol

con la muestra tras la mufla y el peso del crisol vacío, respecto al peso inicial de la muestra y expresadas en porcentaje.

- Hidrólisis

La hidrólisis de las muestras se llevó a cabo en dos etapas. Se colocaron aproximadamente 300 mg de muestra (se anotó el peso exacto empleado) en un tubo roscado de vidrio al que se añadieron 3 mL de H₂SO₄ (72 %, v/v). A continuación, se incubó la muestra en un baño termostático a 30 °C durante 1 h con agitación periódica cada 10 min. Una vez finalizada esta primera etapa de hidrólisis, se sacaron los tubos y se transfirió su contenido a botellas de vidrio y se añadieron 84 mL de agua destilada para reducir la concentración del H₂SO₄ hasta el 4 % (v/v). Las botellas se transfirieron al autoclave, donde se llevó a cabo la segunda etapa de la hidrólisis (a 121 °C durante 1 h), en la que los compuestos que están parcialmente hidrolizados terminan de hidrolizarse por completo, obteniendo los monómeros.

Las botellas se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. Una vez enfriados, se realizó una filtración a vacío para separar el residuo insoluble en ácido que se lavará con agua y se llevará a estufa hasta sequedad. Este sólido contiene la lignina insoluble y cenizas. La posterior determinación de cenizas en el sólido insoluble en ácido en mufla a 575 °C durante 4 h permitió la determinación de la fracción de la lignina insoluble en ácido.

El líquido filtrado a vacío tras la hidrólisis ácida en autoclave contiene la lignina soluble y los azúcares liberados de la hidrolisis de los carbohidratos estructurales.

A partir del líquido obtenido de la filtración, para la determinación de lignina soluble en ácido, se tomaron 8 mL en un vial para medir la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda de 240 nm. Fue necesario hacer una dilución con agua destilada para que la absorbancia estuviera en el rango de 0.7–1.0, anotando el factor de dilución utilizado.

Después, se tomaron 5 mL de muestra situándolos en tubos roscados y se neutralizó con carbonato cálcico hasta conseguir un pH de 5–6, dejando un tiempo de espera para su decantación. Por último, se procesó a través de un filtro de 0.22 µm para el análisis de azúcares en HPLC.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La caracterización de los sólidos se realizó por duplicado (dos réplicas) y los resultados obtenidos se expresaron como el valor medio ± desviación estándar. Se realizó una comparación de las medias mediante el software Statgraphics 19–X64 para comprobar si estadísticamente había diferencias significativas cuando se varía la composición del medio.

La significancia de las diferencias entre los resultados de las muestras se determinó basándose en un análisis de la varianza (ANOVA) con la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un valor $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. COMPOSICIÓN DE LA MATERIA PRIMA

La biomasa empleada como materia prima ha sido el rastrojo de maíz, cuya composición se presenta en la Tabla 1.

El componente mayoritario corresponde a la celulosa con un 40 %, seguido de la lignina y la hemicelulosa. La composición de carbohidratos estructurales en la biomasa inicial corresponde a un 64 %, mientras que, la lignina ha constituido el 27 %, siendo la insoluble la predominante. Esta distribución es coherente con lo descrito previamente en la literatura para residuos lignocelulósicos de maíz [30], [31], lo que confirma la idoneidad del material para estudios de valorización de la fracción de carbohidratos.

Tabla 1. Composición de la materia prima y los sólidos obtenidos tras el tratamiento en medio subcrítico a 175 °C, 50 bar durante 1 h (con agua solo o con modificadores, NADES (5%, v/v), etanol (20 y 40%, v/v)) los sólidos según el medio modificado empleado junto con su desviación estándar y el análisis estadístico (todos los datos están expresados en base seca).

Componentes (%)	Rastrojo de maíz	Productos sólidos tras tratamiento con SW			
		Sin modificador	NADES (5%)	EtOH (20%)	EtOH (40%)
Cenizas	10.6 ± 0.3 ^{bc}	8.1 ± 1.3 ^{ab}	8.8 ± 0.9 ^{ab}	11.3 ± 0.8 ^c	6.6 ± 1.3 ^a
Lignina soluble	7.2 ± 0.0 ^d	3.2 ± 0.1 ^b	2.0 ± 0.3 ^a	5.1 ± 0.4 ^c	4.8 ± 0.1 ^c
Lignina insoluble	20.3 ± 0.3 ^a	24.6 ± 0.3 ^b	24.8 ± 0.9 ^b	21.4 ± 1.5 ^a	19.3 ± 0.5 ^a
Celulosa (glucanos)	40.4 ± 0.2 ^a	54.8 ± 1.1 ^b	38.9 ± 3.2 ^a	54.9 ± 1.9 ^b	54.8 ± 0.7 ^b
Xilanos	20.0 ± 0.1 ^d	11.8 ± 0.1 ^b	6.5 ± 0.3 ^a	12.6 ± 0.8 ^b	15.7 ± 1.2 ^c
Arabinanos	4.0 ± 0.0 ^d	0.8 ± 0.1 ^b	0.4 ± 0.0 ^a	1.0 ± 0.8 ^b	1.1 ± 0.1 ^c
C (%)	44.2 ± 0.7 ^a	48.2 ± 0.1 ^b	54.1 ± 0.4 ^c	47.4 ± 0.1 ^b	45.2 ± 1.0 ^a
H (%)	5.9 ± 0.1 ^a	6.1 ± 0.1 ^b	7.8 ± 0.0 ^c	6.1 ± 0.1 ^b	6.0 ± 0.2 ^{ab}
N (%)	0.7 ± 0.0 ^a	1.5 ± 0.3 ^c	1.0 ± 0.1 ^b	0.7 ± 0.1 ^a	0.7 ± 0.0 ^a
O (%)	37.9 ± 0.7 ^d	35.8 ± 0.6 ^c	28.6 ± 0.3 ^a	34.5 ± 0.1 ^b	40.7 ± 1.2 ^e
HHV (MJ/kg)	18.2 ± 0.4 ^a	20.2 ± 0.3 ^b	25.0 ± 0.1 ^c	19.9 ± 0.0 ^b	18.4 ± 0.7 ^a

4.2. HIDRÓLISIS EN MEDIO SUBCRÍTICO

La hidrólisis de la biomasa en agua subcrítica se ha llevado a cabo a 175 °C y 50 bar de presión durante 1 h, empleando cuatro medios de reacción: agua (medio de referencia que corresponde al SW), agua con etanol al 20 % y 40 % (v/v) (modificador) y agua con NADES al 5 % (v/v) (modificador). El objetivo ha sido evaluar la influencia del modificador sobre la liberación de compuestos estructurales y la evolución de productos de degradación tanto en la fase líquida como sólida.

Se ha registrado la temperatura en el proceso de calentamiento y durante el tratamiento, así como la energía consumida en cada uno de los experimentos. Después, se han caracterizado los líquidos y sólidos obtenidos tras los experimentos, según se ha detallado anteriormente. Así se ha logrado comparar cómo varía el contenido total en función del medio empleado.

4.2.1. Gradiente de temperatura y energía consumida

El calentamiento ha mostrado gradientes de temperatura similares entre experimentos, oscilando entre 6.9 °C/min en SW y 7.9 °C/min para el sistema con NADES, con rampas de calentamiento intermedias para las mezclas hidroalcohólicas. El tiempo medio necesario para alcanzar la temperatura de operación ha sido cercano a 22 min.

En cuanto al consumo energético durante el periodo isoterma del proceso, se han registrado valores muy similares, comprendidos entre 0.205 kWh en SW y 0.241 kWh en el experimento con etanol 40 % (v/v), con un consumo medio estimado de 0.223 kWh. Mientras que, el consumo medio del tratamiento total, incluyendo el periodo isoterma y no isoterma, fue de 0.607 kWh.

4.2.2. Caracterización de líquidos

A continuación, se presentan los resultados del análisis del líquido obtenido tras la hidrólisis en los diferentes medios para comparar la liberación/hidrólisis de los componentes

estructurales de la materia prima como consecuencia de los tratamientos. El objetivo es determinar si la adición de modificadores al SW ha acelerado o modificado el proceso de degradación de los componentes estructurales.

4.2.2.1. Fracción de hemicelulosas

Se van a representar las concentraciones de xilosa (Fig. 4 (a)) y arabinosa (Fig. 5 (a)) extraídas a cada tiempo durante el pretratamiento en agua subcrítica, demostrando la presencia de hemicelulosa en la disolución y la hidrólisis de esta. Además, se han calculado los rendimientos obtenidos para cada fracción a tiempo final.

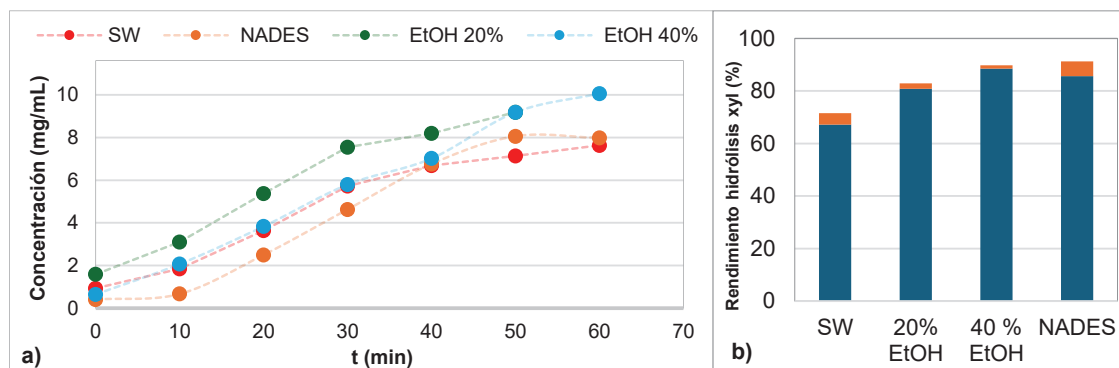


Figura 4. (a) Concentración de xilosa oligomérica frente al tiempo. (b) Rendimiento de la hidrólisis en forma monomérica (■) y oligomérica (■) de la xilosa.

En la Fig. 4 (a) se refleja cómo la solubilización de la xilosa oligomérica sigue una tendencia ascendente similar en todos los tratamientos. El estudio de los rendimientos de obtención de xilosa ha demostrado que las condiciones óptimas han sido 175 °C y 50 min.

En la fig. 4 (b) se muestran los rendimientos obtenidos en cada uno de los medios empleados (SW o SW con modificadores). En esta figura se puede ver que la xilosa extraída en todos los casos ha sido en forma oligomérica mayoritariamente, mientras que la xilosa recuperada en forma monomérica es mínima (inferior al 5% en todos los casos). Más específicamente, en el caso de la fracción oligomérica, cuando se emplea SW se alcanza un rendimiento del 67 % que se incrementa a 80 % y 88 % con el uso de etanol como modificador del medio y a 85 % cuando se trabaja con NADES (5%). En el caso de la fracción monomérica, el empleo de SW logra una solubilización de hasta 4 %, alcanzando valores inferiores para los medios hidroalcohólicos, y consiguiendo hasta un 5 % con la aplicación de NADES. Por tanto, la adición de modificadores ha permitido incrementar el rendimiento de la fracción oligomérica de la xilosa recuperada.

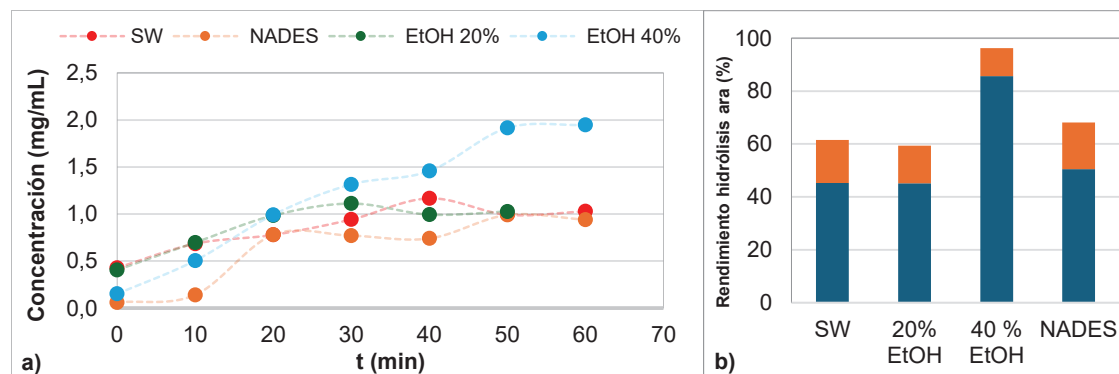


Figura 5. (a) Concentración de arabinosa oligomérica frente al tiempo. (b) Rendimiento de la hidrólisis en forma monomérica (■) y oligomérica (■) de la arabinosa.

Como se aprecia en la Fig. 5 (a), la concentración de arabinosa recuperada tiende a ascender según avanza el tiempo en todos los experimentos. Sin embargo, la cantidad disuelta es muy inferior a la detectada para la xilosa.

Analizando la Fig. 5 (b) se detecta que un alto porcentaje de arabinosa monomérica se ha solubilizado con el tratamiento en medio subcrítico, consiguiendo valores superiores a los obtenidos de xilosa monomérica. Estos resultados tienen sentido ya que la estructura de la hemicelulosa consiste en cadenas principales de xilosa con ramificaciones de arabinosa, estando esta última más expuesta a las reacciones de hidrólisis.

La detección de xilosa y arabinosa en forma oligomérica en el líquido extraído confirma la solubilización parcial de la hemicelulosa. Gracias a la comparación de las Figuras 4 y 5 se puede observar que el azúcar mayoritario es la xilosa oligomérica, alcanzando una concentración máxima de 10 mg/mL en el medio con etanol 40 % (v/v), mientras que la arabinosa presenta valores hasta cinco veces inferiores, con un máximo de 1.95 mg/mL en el mismo experimento.

A partir de los resultados, se ha comprobado que los NADES tienen un efecto comparable al del SW, encontrando que su empleo no aporta una mejoría notable al tratamiento. Por tanto, se puede determinar que el medio hidroalcohólico ha favorecido la extracción selectiva de las fracciones hemicelulósicas, sobre todo de arabinanos al emplear la mayor concentración de etanol.

4.2.2.2. Celulosa

En este apartado se van a analizar las concentraciones de glucosa disuelta en la fracción líquida de cada experimento tras la extracción con SW.

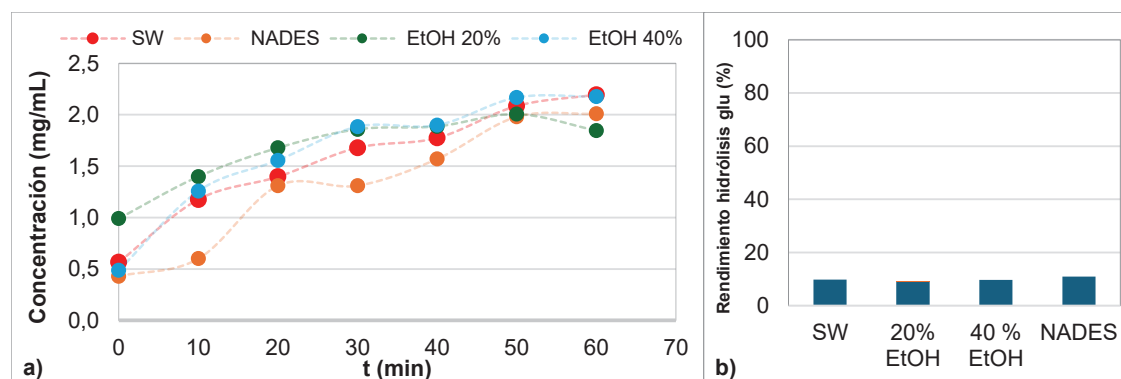


Figura 6. (a) Concentración de glucosa oligomérica frente al tiempo. (b) Rendimiento de la hidrólisis monomérica (■) y oligomérica (■) de la glucosa.

La detección de glucosa en la fase líquida evidencia el inicio de la hidrólisis de la celulosa. No obstante, las concentraciones obtenidas (representadas en la Fig. 6 (a)) son considerablemente inferiores a las registradas para las pentosas de la fracción de hemicelulosas (Figuras 4 y 5), alcanzando un máximo de 2 mg/mL en el medio SW, aproximadamente cinco veces menor que la xilosa oligomérica.

El comportamiento de los medios con SW y etanólico al 40 % (v/v) ha sido similar, al igual que el del medio con NADES, que muestra una tendencia creciente de extracción a lo largo del tiempo. La escasa diferencia del efecto entre los modificadores se puede atribuir a la elevada resistencia estructural de la celulosa, cuya hidrólisis requiere temperaturas superiores, pero sin sobrepasar los 200 °C para evitar degradaciones completas de los polímeros [25].

Cabe mencionar que en el experimento con NADES se ha obtenido un rendimiento máximo de oligómeros en torno al 11 %, siendo por tanto el tratamiento que más glucosa oligomérica ha solubilizado. Por otro lado, el medio hidroalcohólico al 20 % ha presentado la mayor

solubilización de glucosa monomérica, aunque la solubilización de ambas fracciones de este azúcar ha sido mínima.

4.2.2.3. Lignina

En la Tabla 2 se muestra el contenido de compuestos fenólicos y otros compuestos derivados de la lignina para estudiar cómo la presencia de alguno de estos revela la deslignificación de la estructura.

El análisis realizado solamente en SW e hidroalcohólico al 40 % (v/v) revela que el segundo medio ha resultado ser significativamente más eficiente en la recuperación de este tipo de compuestos bioactivos que el primero. Se han determinado un máximo de 80 ± 2 y 276 ± 12 g de compuestos fenólicos individuales por mL en el caso del tratamiento con SW a 30 min y del 40 % etanol a los 20 min de tratamiento, respectivamente. Además, la comparación de los datos evidencia que la adición de etanol incrementa notablemente la concentración de los ácidos hidroxicinámicos mayoritarios como el ácido p-cumárico y ácido ferúlico. El ácido p-cumárico es el mayoritario tanto en SW como en etanol al 40 %, suponiendo un 62 % de los compuestos fenólicos individuales determinados en el caso del agua (evaluado a los 20 min) y un 39 % en el caso del tratamiento con 40 % de etanol, también evaluado a los 20 min. Asimismo, este ácido presenta un máximo temprano (10–20 min) seguido de un descenso, lo que indica una rápida liberación por la hidrólisis de enlaces éster seguida de una degradación térmica, mientras que el ácido ferúlico muestra una tendencia creciente en el tiempo, lo que sugiere una liberación progresiva de hemicelulosa.

De acuerdo con Zhang et al. [32], estos hidroxicinamatos se encuentran principalmente esterificados en la pared celular, actuando como enlaces entre hemicelulosa y lignina. Las condiciones subcríticas favorecen la ruptura de estos enlaces [33], pero la presencia de etanol facilita la solubilización de fracciones hidrofóbicas inaccesibles para el agua.

Esto se confirma mediante la recuperación de marcadores de unidades guayacilo (G), como la vainillina y el ácido vanilínico, y de unidades siringilo (S), como el aldehído siringico. Destaca especialmente la presencia exclusiva de alcohol sinapílico en el extracto etanólico (~28 mg/mL), un monolignol primario cuya detección sugiere que el etanol no solo extrae, sino que además estabiliza estos monómeros evitando su repolimerización, un fenómeno frecuente en procesos acuosos.

Por último, solamente en el medio etanólico se ha revelado la presencia de 4-vinilguayacol y etil ferulato, lo que sugiere transformaciones químicas simultáneas a la extracción, tales como descarboxilaciones térmicas [34] y reacciones de esterificación in situ entre el ácido ferúlico libre y el etanol del solvente, respectivamente.

Tabla 2. Resultados de los polifenoles medidos en agua y etanol 40 % (v/v).

Compuesto (mg/mL)	Medio	tiempo (min)						
		0	10	20	30	40	50	60
Ácido p-Cumárico	Agua	16.6±0.1	53.9±0.6	48.9±0.8	46±0.6	30.9±1.0	27.1±1.5	24.7±1.2
	EtOH 40%	39.7±1.0	129.3±2.6	106.6±2.1	92.4±3.2	89.3±1.9	93.1±1.2	87.3±3.8
Ácido Ferúlico	Agua	3.7±0.2	8.7±0.5	8.9±0.4	10.1±0.3	8.2±0.2	8.2±0.3	8.5±0.4
	EtOH 40%	6.8±0.3	14.2±0.5	13.4±0.2	14.1±0.7	15.8±0.9	18.9±1.3	17.5±0.6
Vanillina	Agua	ND	8.8±0.2	10.9±0.1	12.7±0.4	13.1±0.1	13.7±0.2	13.9±0.6
	EtOH 40%	8.4±0.1	27.4±0.5	33.2±1.3	29.5±0.4	29.3±0.8	31±2	32.7±0.9
Ácido Vanilínico	Agua	0.6±0.06	0.8±0.09	3.0±0.6	3.1±0.3	2.7±0.2	2.2±0.04	1.9±0.05
	EtOH 40%	3.1±0.19	4.2±0.8	4.4±0.4	5.1±0.3	4.9±0.6	5.4±0.8	5.9±0.3
Alcohol Sinapílico	Agua	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	EtOH 40%	6.0±0.5	26.6±3.2	28.5±3.9	26±4	24.3±3.4	23.7±2.8	19.8±2.2
Aldehído Siringico	Agua	0.0	1.7±0.16	2.5±0.2	2.9±0.2	3.5±0.13	4.5±0.12	4.8±0.17
	EtOH 40%	4.1±0.3	8.8±0.5	9.1±0.8	9.9±0.2	10.3±0.7	10.8±0.9	11.6±0.4
Ácido Siringico	Agua	1.1±0.2	1.8±0.03	2.1±0.02	2.3±0.08	2.5±0.13	2.2±0.08	2.4±0.14
	EtOH 40%	1.7±0.1	3.9±0.3	4.1±0.1	4.6±0.1	4.9±0.2	5.2±0.2	5.5±0.3
Ácido Cinámico	Agua	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	EtOH 40%	0.2±0.0	2.3±0.4	4.2±0.7	4.8±0.7	5.1±0.2	6.0±0.3	5.6±0.2
Aldehído Conifenilo	Agua	ND	ND	2.3±0.7	3.3±0.5	2.5±0.12	3.8±0.1	4.3±0.6
	EtOH 40%	ND	ND	ND	ND	5.6±0.1	5.2±0.2	5.2±0.3
Vinilguayacol	Agua	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	EtOH 40%	3.2±0.3	38.1±3.3	66.9±2.3	57.7±3.8	50.9±4.5	48.6±6.5	40.4±2.8
Etil ferulato	Agua	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	EtOH 40%	1.1±0.03	4.4±0.3	5.2±0.1	8.8±0.6	6.0±0.2	6.0±0.6	3.1±0.4
Total (mg/mL)	Agua	22±1	76±2	79±3	80±2	63±2	62±2	61±3
	EtOH 40%	74±3	259±12	276±12	253±14	246±14	254±17	235±12

4.2.2.4. Otros productos formados

Como consecuencia de la liberación de los monómeros que se han ido formando y su posterior exposición al medio de reacción, se ha comprobado que, mediante rutas de reacción complejas se forman otro tipo de compuestos como ácidos orgánicos o productos de deshidratación de azúcares. Específicamente, en los experimentos realizados se han determinado ácidos carboxílicos, como el ácido acético y ácido fórmico, y productos de degradación como el furfural (producto de deshidratación de azúcares C5) y 5- hidroximetilfurfural (5-HMF) (producto de deshidratación de azúcares C6).

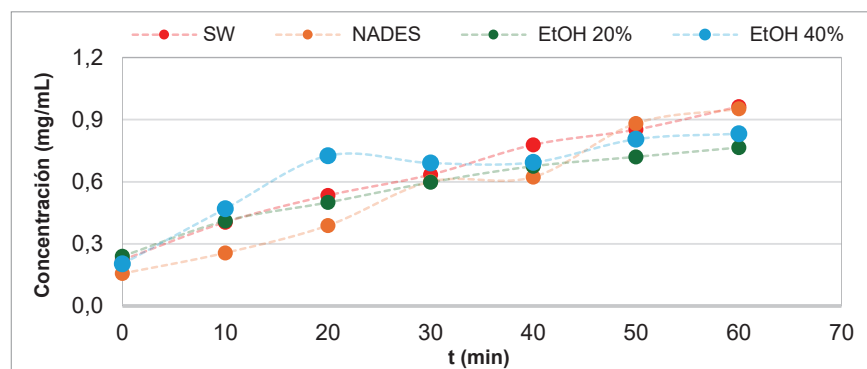


Figura 7. Concentración del ácido acético frente al tiempo con el empleo de diferentes medios modificados.

En las Figuras 7 y 8 se muestra el perfil de concentraciones de los ácidos orgánicos mayoritarios encontrados en el medio de reacción, acético y fórmico, respectivamente. Al comparar los resultados, se observa un aumento de la cantidad de ácidos orgánicos a medida que avanza el proceso de extracción. Como se observa en la Fig. 7, el ácido acético es el ácido orgánico mayoritario, procedente de la solubilización de la hemicelulosa, en la que los grupos acetilo se degradan según el grado de solubilización de esta, por lo que no es un producto de degradación como tal.

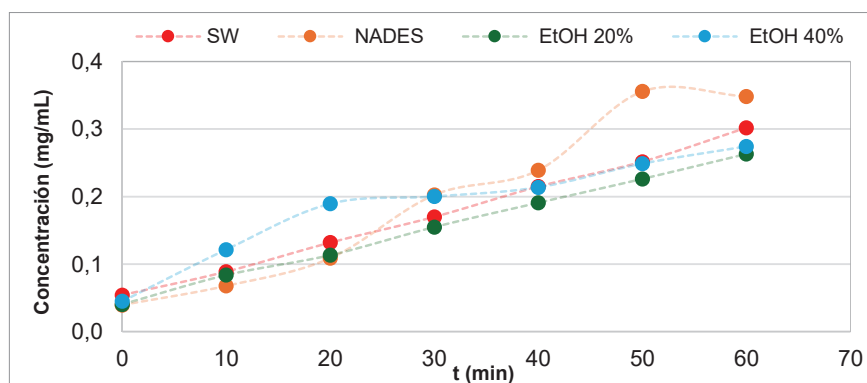


Figura 8. Concentración del ácido fórmico frente al tiempo con el empleo de diferentes medios modificados.

El ácido acético ha sido el principal producto detectado, alcanzando un valor máximo de 0.96 mg/mL en el medio con SW y un valor similar con NADES, mientras que para los medios etanólicos se han obtenido resultados ligeramente inferiores pero muy parejos entre sí (0.76–0.83 mg/mL). Estas cifras se relacionan con la hidrólisis de la fracción hemicelulósica y la liberación al medio de los grupos acetilo que forman parte de la estructura de las hemicelulosas.

Por su parte, el ácido fórmico ha presentado una evolución parecida, con un máximo de 0.3 mg/mL a los 50 min en dicho medio, aunque se puede observar cómo el resto de los

modificadores tienen un efecto similar. El ácido fórmico se puede formar a partir de la degradación del furfural, pero mayoritariamente se forma a partir de la degradación de la xilosa, según se han descrito los mecanismos en bibliografía [35].

En la Fig. 9, se muestra el cambio de pH en las muestras líquidas tras el tratamiento con SW, donde se puede observar el descenso de pH registrado desde valores iniciales a tiempo 0, cercanos a 6, hasta llegar a pH en torno a 4 a los 60 min. Estos resultados verifican el progresivo crecimiento de ácidos orgánicos en el medio ya que este se acidifica según avanza el proceso de extracción, favoreciendo la hidrólisis de la biomasa.

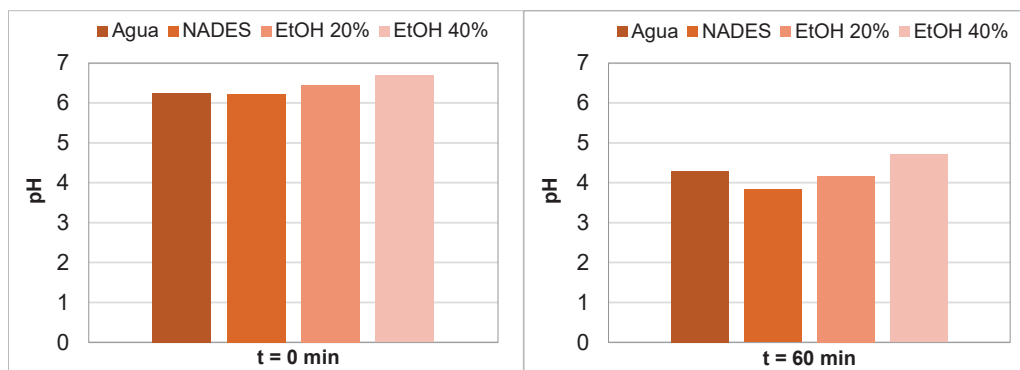


Figura 9. Comparación entre el pH a tiempo 0 y 60 de las muestras líquidas obtenidas tras el tratamiento en medio subcrítico.

Otros compuestos, derivados de la degradación de azúcares determinados en el medio de reacción, han sido los compuestos de deshidratación de C5 (furfural) y C6 (5-hidroximetilfurfural, 5-HMF), cuyas cinéticas de formación se muestran en las Figuras 10 y 11, respectivamente.

Comparando los valores obtenidos entre ambos furanos, se observa en las Figuras 10 y 11 que, tras los tratamientos llevados a cabo en este estudio, se consigue mayor producción de furfural que de 5-HMF. Esto puede estar relacionado con los resultados de las Figuras 4 y 5 ya que el furfural es un producto que aparece por degradación de las pentosas xilosa y arabinosa, y, por ende, de la hemicelulosa. Mientras que, el 5-HMF proviene de la degradación de la celulosa, pero como la extracción de glucosa es mínima, no se libera al medio y no se produce su degradación, detectándose así una baja cantidad de 5-HMF.

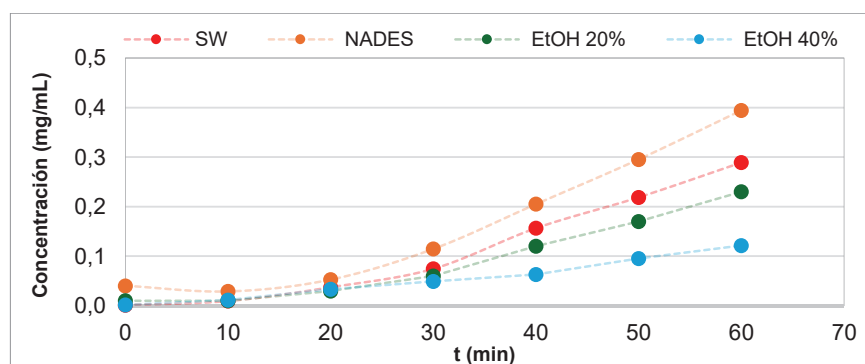


Figura 10. Concentración del furfural formado con el empleo de SW y diferentes medios modificados frente al tiempo.

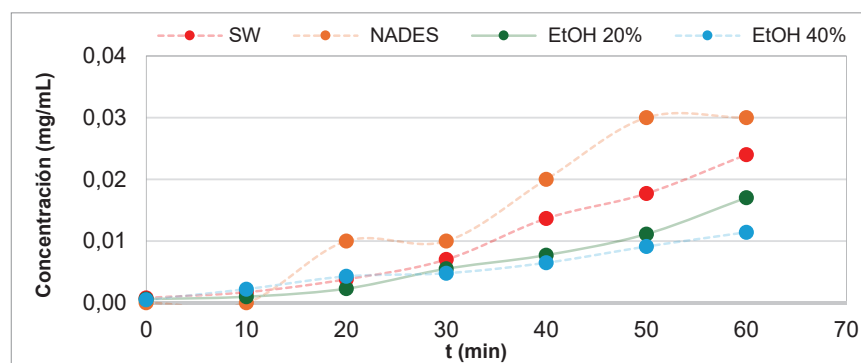


Figura 11. Concentración del 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) frente al tiempo con el empleo de diferentes medios modificados.

Como se observaba en la Fig. 4, la cantidad de xilanos aumenta en el medio líquido a medida que transcurre el tiempo, lo cual se correlaciona bien con la Fig. 10 en la que se refleja una mayor cantidad de furfural en el medio. La presencia de NADES y los tratamientos con SW condujeron a una mayor cantidad de pentosas monoméricas, tanto xilosas como arabinosas, en el medio a partir de las cuales se puede producir furfural mediante procesos de deshidratación. La presencia de etanol en el medio condujo a un mayor porcentaje de xilosas y arabinosas oligoméricas (Figura 4b y 5b), conduciendo a una menor cantidad de furfural en los medios hidroalcohólicos, sobre todo el del 40 %, por ese efecto protector que demuestra tener (todo ello representado en la Fig. 10).

A pesar de que la concentración de furfural y 5-HMF en los medios con etanol es muy similar, se observa como el experimento con etanol al 20 % (v/v) sigue una tendencia de degradación superior. Con el uso de etanol 40 % (v/v) el furfural aumenta en menor medida, en comparación a los otros tres tratamientos llevados a cabo, lo que significa que se está produciendo una hidrólisis más controlada, generando una mayor concentración de oligómeros sin llegar a generar productos de degradación. De esta forma, se cuantificó que el empleo de NADES a 60 min (0.4 mg/mL de furfural) frente a 0.1 mg/mL con etanol al 40 %, alcanza una cantidad casi cuatro veces mayor de furfural, concentración similar a la alcanzada con SW. Esta tendencia también se observó en la formación de HMF, producto de deshidratación de la glucosa, aunque a concentraciones más bajas debido al menor grado de hidrólisis de la celulosa en las condiciones estudiadas.

Cabe mencionar que los experimentos en los que se ha usado el NADES son en los que se ha detectado mayor cantidad de productos de degradación, así como en los anteriores análisis, que tampoco se obtienen los mejores resultados de liberación de hemicelulosa o celulosa. Por tanto, además de lograrse peores resultados de extracción y más productos de degradación, da muchos problemas operacionales debido a su carácter hidrofóbico. Su manejo y separación se complicaron por la incapacidad de introducir fase orgánica en los equipos de análisis, que funcionan en base acuosa. Al final por todo ello, la conclusión es que se desaconseja su uso para este tipo de experimentos.

Al comparar la evolución seguida por los productos de degradación, se percibe que el etanol ejerce un efecto protector, posiblemente asociado a la formación de etil ferulato. Es conocido que este compuesto polifenólico aparece de la reacción del ácido ferúlico con etanol, por esto en el medio acuoso no se ha detectado su presencia. Aunque aún no hay artículos que puedan asegurar la idea de que, gracias a este compuesto, el disolvente con etanol tenga un efecto protector sobre los componentes disueltos del medio disminuyendo la degradación de estos, con este trabajo es evidente que la utilización de este disolvente causa una menor degradación de los productos disueltos en el líquido [36].

4.2.2.5. Peso molecular de los oligómeros detectados

Para la determinación del peso molecular de los componentes detectados en la fracción líquida se ha recurrido a la técnica analítica de GPC o cromatografía de exclusión por tamaño, especificando la composición del equipo en el apartado 3.2.2.3. En las Figuras 12 y 13 se muestra la distribución de pesos moleculares para los tratamientos llevados a cabo en SW y para una concentración de etanol al 40 %, respectivamente.

Se ha encontrado que las distribuciones de MW (peso molecular, por sus siglas en inglés) en los hidrolizados obtenidos son muy complejos. Por ello, se ha decidido estudiar el contenido en fracciones de alto, medio y bajo peso molecular, siendo la fracción de interés la de peso molecular medio (rango entre 1–5 kDa). En este estudio, la fracción intermedia es la de valor porque la obtención de hemicelulosas con este determinado grado de polimerización tienen gran potencial como compuesto con propiedades prebióticas.

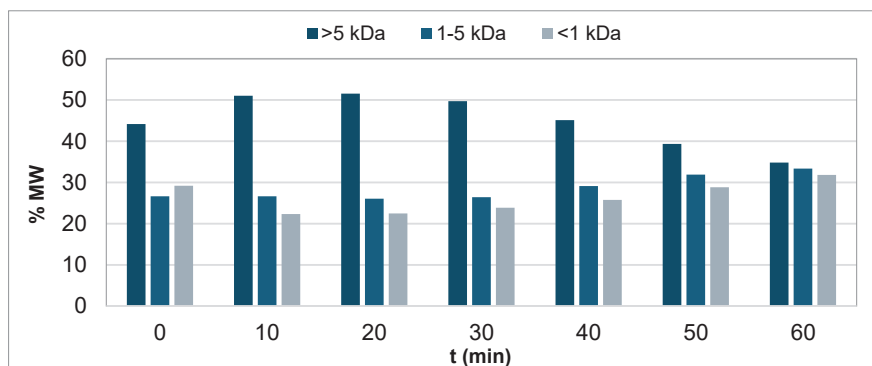


Figura 12. Pesos moleculares de los compuestos disueltos frente al tiempo, empleando el medio con agua.

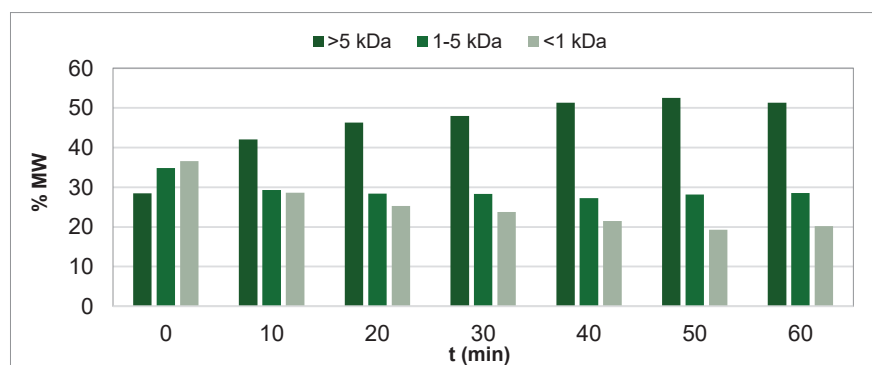


Figura 13. Pesos moleculares de los compuestos disueltos frente al tiempo, empleando el medio con etanol 40 % (v/v).

En las Figuras 12 y 13 se ha representado la distribución de pesos moleculares de los hidrolizados en medio con SW y añadiendo un 40 % de etanol, respectivamente. Se observa en ambos casos que la fracción con un tamaño superior a 5 kDa fue la mayoritaria. Sin embargo, se observaron diferencias en la distribución que apoyan los resultados encontrados en los análisis de las otras especies químicas determinadas.

En la Fig. 12 se ha detectado un máximo de productos de alto peso molecular a los 20 min. Inicialmente, la cantidad de fracciones de alto peso molecular extraídas asciende y estas fracciones comienzan a disminuir según aumenta el tiempo de operación, consiguiendo un aumento en paralelo de las fracciones de menor peso molecular. Esto se debe a que se producen dos mecanismos, uno de extracción y otro de degradación. Al comparar estos datos con los representados en las figuras del apartado 4.2.2.4, se contempla el aumento de la concentración de ácidos orgánicos y furfural, lo que es una evolución lógica ya que el

descenso del peso molecular corresponde a un aumento en paralelo del contenido de productos de degradación.

En el caso de la Fig. 13, que corresponde al medio con etanol 40 % (v/v), es notable como ocurre una extracción/disolución de la fracción de hemicelulosa, pero en este caso no se observa la degradación de la fracción de alto peso molecular (>5 kDa), logrando alcanzar valores superiores al 50 % al final del proceso. En cambio, al emplear el medio con agua, a pesar de que se lleva a cabo una extracción de compuestos de interés, la velocidad de degradación es mayor. Los resultados que se observan en la Fig. 13 consolidan los resultados de las Figuras 10 y 11, apoyando la idea del efecto protector del etanol para la fracción de oligómeros hidrolizada al medio de reacción, ya que nos da la ventaja de extraer más hemicelulosas con una mínima cantidad de productos de degradación.

4.2.3. Caracterización de sólidos

El medio empleado durante el tratamiento tuvo un efecto significativo sobre la composición química del sólido obtenido, tal y como se recoge en la Tabla 1. Se observa una disminución en la cantidad de arabinosanos al emplear un medio modificador, lo que significa que se ha conseguido la extracción e hidrólisis de la hemicelulosa con el tratamiento, resultando un sólido con una cantidad inferior de hemicelulosas.

Se observa que el contenido de lignina insoluble y sobre todo el de lignina soluble del residuo obtenido con etanol 40 % (v/v), ha disminuido en comparación al contenido de la materia prima, lo que significa que ha comenzado la deslignificación. Por otro lado, se analiza cómo el contenido de celulosa aumenta casi un 15% en el medio con agua y los modificados con etanol, cumpliendo uno de los objetivos del trabajo. Se puede decir que el empleo del etanol como modificador del medio aumenta el rendimiento de la operación de extracción de hemicelulosa e inicia un proceso deslignificación. En general, al trabajar con etanol a 175 °C se observan cambios significativos entre la composición de la materia prima y el residuo obtenido, excepto en el caso de la lignina insoluble. También se han encontrado diferencias al trabajar con SW y con etanol 40 % (v/v), sin embargo, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el empleo de etanol 40 % (v/v) y etanol 20 % (v/v).

Se ha realizado un balance de materia para los biopolímeros hemicelulosas, celulosas y lignina. A partir de la cantidad inicial de 10 g de materia prima se han obtenido sólidos finales de 5.2 g con SW, 5.7 g con NADES, 5.6 g con etanol al 20 % y 3.7 g con etanol al 40 %, siendo el porcentaje hidrolizado igual a 47 %, 30 %, 43 % y 63 %, respectivamente. A partir de estos datos del sólido recogido tras el proceso de hidrólisis y sus composiciones presentadas en la Tabla 1, se van a calcular los balances de materia a los principales componentes estructurales (lignina insoluble, glucanos, xilanos y arabinanos). Este balance va a permitir conocer la masa de componente estructural presente en la materia prima y en el sólido tras el tratamiento, tal y como se recoge en la Tabla 3.

Tabla 3. Balances de materia a los principales componentes estructurales de la materia prima y de los sólidos obtenidos tras el tratamiento en medio subcrítico, mostrando el % solubilizado.

Componentes (g)	Rastrojo de maíz	Productos sólidos tras tratamiento con SW			
		Sin modificador	NADES (5%)	EtOH (20%)	EtOH (40%)
Lignina insoluble	1.91	1.25 (34.8 %)	1.36 (28.9 %)	1.17 (38.9 %)	0.69 (63.9 %)
Celulosa (glucanos)	3.82	2.79 (26.9 %)	2.15 (43.8 %)	3.00 (21.4 %)	1.99 (47.9 %)
Xilanos	1.88	0.6 (68.2 %)	0.36 (81.0 %)	0.69 (63.4 %)	0.56 (70.4 %)
Arabinanos	0.37	0.04 (89.4 %)	0.02 (94.2 %)	0.05 (86.0 %)	0.04 (88.8 %)

Los datos presentados en la Tabla 3 permiten conocer la cantidad de componente solubilizado tras el tratamiento, como diferencia entre la masa de componente inicial y final tras el tratamiento. Puede observarse que, con respecto a la celulosa, el tratamiento en medio subcrítico sin modificador permitió la solubilización de cerca del 27% de la celulosa inicial, porcentaje que se incrementó con el uso de NADES y etanol 40% como modificadores (hasta valores cercanos al 45%). Con respecto a la lignina, el mayor porcentaje de solubilización se consiguió cuando se trabajó con etanol 40% como modificador, con una solubilización conseguida cercana al 64%, frente al 35% conseguido sin la adición de modificadores. Fue en el medio con etanol al 40 % en el que se detectó una mayor cantidad de polifenoles en la fracción líquida (tal y como se presenta en la Tabla 2), lo que es compatible con el grado de solubilización de la lignina determinado mediante el balance de materia. Es por ello que el etanol presenta un gran potencial para ser empleado en procesos de deslignificación de la biomasa, al actuar sobre este componente estructural. También cabe destacar que el empleo de NADES como modificador fue el que menor efecto tuvo sobre la lignina en términos de solubilización. Sin embargo, este modificador sí que permitió obtener la mayor solubilización de xilanos y arabinanos (81 y 94%, respectivamente), resultados notablemente superiores a los obtenidos con los otros medios, como en agua subcrítica sin la adición de modificador (68%) o etanol 40% (70 % de solubilización de xilanos alcanzada).

El análisis elemental ha revelado diferencias entre los sólidos generados en los diferentes tratamientos y la materia prima (Tabla 1). Se ha podido observar cómo todos los elementos del medio con NADES 5 % (v/v) presentan diferencias estadísticamente significativas con la materia prima y el resto de los experimentos, sobre todo en el mayor contenido.

En la Tabla 1, se observa un aumento en el contenido de carbono, sin diferencias estadísticamente significativas entre la materia prima y el medio con etanol 40 % (v/v), pero sí que hay cambios estadísticamente significativos entre la materia prima y el medio con agua o etanol 20 % (v/v). Estos valores concuerdan con la literatura [37].

En cuanto al contenido de oxígeno, en comparación con el contenido de la materia prima, se observa una importante disminución en el sólido tratado con el medio NADES 5 % (v/v), teniendo un valor de 28.6 %. Esto podría ser por la pérdida de moléculas de agua asociadas a reacciones de deshidratación que se llevan a cabo durante la operación con el medio subcrítico.

En los resultados presentados en la Tabla 1 se puede visualizar como el HHV ha aumentado en el residuo sólido generado tras tratamiento con NADES como modificador, debido al mayor aumento de C de este sólido.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden deducir de este trabajo son:

- I. El pretratamiento de extracción mediante SW a 175 °C ha demostrado ser una estrategia eficaz en la valorización del rastrojo de maíz. Gracias a la adición de modificadores, la concentración de hemicelulosa solubilizada ha sido superior, obteniendo mayormente xilosa en forma oligomérica. El experimento con etanol 40 % (v/v) ha sido el que mayor eficacia de extracción ha conseguido.
- II. Se ha detectado una liberación mínima de glucosa en el extracto líquido y, por tanto, de celulosa. Se observa que añadir un modificador no influye significativamente en su extracción. Esto es porque, además de la capacidad recalcitrante de la biomasa lignocelulósica, la estructura cristalina de la celulosa le aporta más resistencia.
- III. En general, respecto a la recuperación de polifenoles y otros compuestos derivados de la lignina realizados sólo en los experimentos de SW y etanol 40 %, este último medio ha resultado ser significativamente más eficiente. Se ha incrementado la concentración de los ácidos hidroxicinámicos como son el ácido

p-cumárico y el ácido ferúlico, que desde el punto de vista estructural están esterificados en la pared celular indicando un inicio de la deslignificación. Además, se ha detectado sólo en este medio, el 4- vinilguayacol y el etil ferulato que son el compuesto característico resultante de la descarboxilación térmica del ácido ferúlico y el compuesto resultante de la reacción del ácido ferúlico con el etanol, respectivamente.

- IV. En el líquido han aparecido ácidos orgánicos y productos de degradación como el furfural y el 5-HMF. Se encuentra una mayor concentración de furfural que de 5-HMF, lo que está relacionado con una exposición prolongada de las xilosas monoméricas liberadas al medio de reacción. Con los resultados de los pesos moleculares se consolida la idea de que el medio con etanol 40 % (v/v) tiene un efecto protector puesto que la fracción de bajo peso molecular no aumenta con el tiempo.
- V. El NADES ha contribuido favorablemente a la solubilización de la hemicelulosa, pero en general no ha mostrado buenos resultados y ha sido un medio problemático operacionalmente. Por tanto, debido a los problemas relacionados con su manejo, separación y recuperación, se complica la propuesta de un escalado a nivel industrial.
- VI. Respecto a los experimentos, con el empleo de etanol se ha conseguido enriquecer la fracción celulósica casi un 15 %, evidenciando el carácter selectivo del tratamiento y su potencial para etapas posteriores de valorización. Así, se puede concluir que este medio ha sido significativamente favorable en la separación de la estructura de carácter recalcitrante del rastrojo de maíz.

Para finalizar, se considera que los mejores resultados en la hidrólisis del rastrojo de maíz se han obtenido utilizando una disolución hidroalcohólica al 40 % (v/v) a los 50 min bajo unas condiciones de operación de 175 °C y 50 bar, consiguiendo un equilibrio entre la capacidad de extracción de los componentes estructurales y el control de la degradación de estos en el extracto líquido. Teniendo en cuenta estos resultados, para afrontar el problema de recalcitrancia se propone un proceso en cascada en el que se emplee en primer lugar SW para la solubilización de hemicelulosas y posteriormente etanol al 40 % para la deslignificación de la biomasa lignocelulósica.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Bedru, T. K., Meshesha, B. T., Mohammed, S. A., Demesa, A. G., & Jayakumar, M. (2025). Efficient Biomass Fractionation via Organosolv for Sustainable Bioenergy Production: A Comprehensive Review. In *International Journal of Chemical Engineering* (Vol. 2025, Issue 1). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1155/ijce/3120449>
- [2] Debnath, B., Haldar, D., & Purkait, M. K. (2021). A critical review on the techniques used for the synthesis and applications of crystalline cellulose derived from agricultural wastes and forest residues. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 273). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118537>
- [3] Mayta Paucara, S. M., Quintana Caceda, M. E., Norabuena Meza, E. W., & Tello Sánchez, R. A. (2023). Extracción de Celulosa a partir de residuos de hojas de maíz. *TECNIA*, 33(2), 77–93. <https://doi.org/10.21754/tecnia.v33i2.1676>
- [4] Thorenz, A., Wietschel, L., Stindt, D., & Tuma, A. (2018). Assessment of agroforestry residue potentials for the bioeconomy in the European Union. *Journal of Cleaner Production*, 176, 348–359. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.143>
- [5] Candela, H., Illera, A. E., Barea, P., Ruiz, M. O., Beltrán, S., & Sanz, M. T. (2025). Optimization of second-generation lactic acid from corn stover by alkaline catalysis in

- subcritical water reaction medium. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 19(5), 1245–1258. <https://doi.org/10.1002/bbb.2785>
- [6] Huerta, R. R., & Saldaña, M. D. A. (2018). Pressurized fluid treatment of barley and canola straws to obtain carbohydrates and phenolics. *Journal of Supercritical Fluids*, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.11.029>
- [7] Pasangulapati, V., Ramachandriya, K. D., Kumar, A., Wilkins, M. R., Jones, C. L., & Huhnke, R. L. (2012). Effects of cellulose, hemicellulose and lignin on thermochemical conversion characteristics of the selected biomass. *Bioresource Technology*, 114, 663–669. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.036>
- [8] Coreño-Alonso, J., & Teresa Méndez-Bautista, M. (2010). *Relación estructura-propiedades de polímeros*. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(18\)30098-3](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(18)30098-3)
- [9] Xu, N., Zhang, W., Ren, S., Liu, F., Zhao, C., Liao, H., Xu, Z., Huang, J., Li, Q., Tu, Y., Yu, B., Wang, Y., Jiang, J., Qin, J., & Peng, L. (2012). Hemicelluloses negatively affect lignocellulose crystallinity for high biomass digestibility under NaOH and H₂SO₄ pretreatments in Miscanthus. *Biotechnology for Biofuels*, 5. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-58>
- [10] Pointner, M., Kuttner, P., Obrlik, T., Jäger, A., & Kahr, H. (2014). Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels. In *Agronomy Research* (Vol. 12, Issue 2).
- [11] Rodríguez-Viveros, N., Paz-Samaniego, R., Hernández-Hernández, A. A., García-Curiel, L., Pérez-Escalante, E., Contreras-López, E., & Pérez-Flores, J. G. (2023). *Extracción de arabinoxilanos de subproductos agroindustriales adaptada a la estrategia universal de recuperación de compuestos bioactivos* (Vol. 8). <https://doi.org/10.29105/idcyta.v8i1.100>
- [12] Luis Espinoza-Acosta, J., Torres-Chávez, P. I., Carvajal-Millán, E., Ramírez-Wong, B., Bello-Pérez, L. A., & Montaña-Leyva, B. (n.d.). *Ionic Liquids and Organic Solvents for Recovering Lignin from Lignocellulosic Biomass*.
- [13] Bu, Y., Wang, L., & Chen, H. (2024). Recalcitrant structure analysis of the enzymatic residues in corn stover pretreated with steam explosion. *Industrial Crops and Products*, 222. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119772>
- [14] Huerta, R. R., & Saldaña, M. D. A. (2019). Sequential treatment with pressurized fluid processing and ultrasonication for biorefinery of canola straw towards lignocellulosic nanofiber production. *Industrial Crops and Products*, 139. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111521>
- [15] Benito-Román, Ó., Alvarez, V. H., Alonso, E., Cocero, M. J., & Saldaña, M. D. A. (2015). Pressurized aqueous ethanol extraction of β -glucans and phenolic compounds from waxy barley. *Food Research International*, 75, 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.006>
- [16] Zhang, J., Wen, C., Zhang, H., Duan, Y., & Ma, H. (2020). Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 95, pp. 183–195). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.018>
- [17] Cocero, M. J., Cabeza, Á., Abad, N., Adamovic, T., Vaquerizo, L., Martínez, C. M., & Pazo-Cepeda, M. V. (2018). Understanding biomass fractionation in subcritical & supercritical water. In *Journal of Supercritical Fluids* (Vol. 133, pp. 550–565). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.08.012>
- [18] Álvarez-Viñas, M., Rodríguez-Seoane, P., Flórez-Fernández, N. *et al.* Subcritical Water for the Extraction and Hydrolysis of Protein and Other Fractions in Biorefineries from Agro-food Wastes and Algae: a Review. *Food Bioprocess Technol* 14, 373–387 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02536-4>
- [19] Rezanía, S., Oryani, B., Cho, J., Talaiekhosani, A., Sabbagh, F., Hashemi, B., Rupani, P. F., & Mohammadi, A. A. (2020). Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass
-

- for bioethanol production: An overview. *Energy*, 199. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117457>
- [20] Pazo-Cepeda, V., Benito-Román, Ó., Navarrete, A., & Alonso, E. (2020). Valorization of Wheat Bran: Ferulic Acid Recovery Using Pressurized Aqueous Ethanol Solutions. *Waste and Biomass Valorization*, 11(9), 4701–4710. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00787-7>
- [21] Ribeiro, B. D., Florindo, C., Iff, L. C., Coelho, M. A. Z., & Marrucho, I. M. (2015). M2nthol-based eutectic mixtures: Hydrophobic low viscosity solvents. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 3(10), 2469–2477. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00532>
- [22] Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S. N., & Pauli, G. F. (2018). Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. In *Journal of Natural Products* (Vol. 81, Issue 3, pp. 679–690). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945>
- [23] Sebbah, T., Yahla, I., Cunha, E., Riazi, A., Amorim, C. G., Rodriguez-Diaz, J. M., & Montenegro, M. C. B. S. M. (2025). Enhanced Extraction and Separation with HPLC-DAD of Phenolic and Flavonoid Antioxidants from *Portulaca oleracea* L. Leaves Using Tailored Terpenoid-Based NADES: Comparative Assessment of Antiradical and Antimicrobial Activities. *Antioxidants*, 14(2). <https://doi.org/10.3390/antiox14020132>
- [24] Queffelec, J., Beraud, W., Ferron, S., Boustie, J., Rodríguez-González, I., Díaz-Reinoso, B., Torres, M. D., & Domínguez, H. (2024). Alternatives for the extraction of bioactives and biopolymers from *Evernia prunastri* for the formulation of antimicrobial bio-based films. *Green Chemistry*, 26(19), 10205–10224. <https://doi.org/10.1039/d4gc02741h>
- [25] Barea, P., Illera, A. E., Candela, H., Melgosa, R., Benito-Román, O., & Sanz, M. T. (2026). Cascade valorization of okara by subcritical water hydrolysis: assessment of protein and amino acid profile in batch and semi-continuous systems. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-8653473/v1>
- [26] Benito-román, Ó., Blanco, B., Sanz, M. T., & Beltrán, S. (2020). Subcritical water extraction of phenolic compounds from onion skin wastes (*Allium cepa* cv. horcal): Effect of temperature and solvent properties. *Antioxidants*, 9(12), 1–20. <https://doi.org/10.3390/antiox9121233>
- [27] Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2006). *Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date: 12/08/2006.* www.nrel.gov
- [28] Friedl, A., Padouvas, E., Rotter, H., & Varmuza, K. (2005). Prediction of heating values of biomass fuel from elemental composition. *Analytica Chimica Acta*, 544(1-2 SPEC. ISS.), 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.01.041>
- [29] Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (n.d.). *Determinación de carbohidratos estructurales y lignina en biomasa.* Retrieved http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html
- [30] Glińska, K., Gitalt, J., Torrens, E., Plechkova, N., & Bengoa, C. (2021). Extraction of cellulose from corn stover using designed ionic liquids with improved reusing capabilities. *Process Safety and Environmental Protection*, 147, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.09.035>
- [31] Moniz, P., Pereira, H., Quilhó, T., & Carvalheiro, F. (2013). Characterisation and hydrothermal processing of corn straw towards the selective fractionation of hemicelluloses. *Industrial Crops and Products*, 50, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.037>
- [32] Zhang, T., Zhang, S., Lan, W., & Yue, F. (2023). Quantitative Extraction of p-Coumaric Acid and Ferulic Acid in Different Gramineous Materials and Structural Changes of Residual Alkali Lignin. *Journal of Renewable Materials*, 11(2), 555–566. <https://doi.org/10.32604/jrm.2023.025701>

- [33] Brimo-Alevra, E., Koutli, M., Marielou, E., Chatzimitakos, T., & Makris, D. P. (2025). Hydrothermal and Organosolv Treatments for Hydroxycinnamate Release from Corn Stover: Strong versus Mild Alkaline Catalysis. *Molecules*, 30(21). <https://doi.org/10.3390/molecules30214297>
- [34] Detering, T., Mundry, K., & Berger, R. G. (2021). Generation of 4-vinylguaiacol through a novel high-affinity ferulic acid decarboxylase to obtain smoke flavours without carcinogenic contaminants. *PLoS ONE*, 15(12 December). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244290>
- [35] Illera, A. E., Candela, H., Beltrán, S., & Sanz, M. T. (2025). Insights into the kinetics of furfural production from different monomers and polymers derived from biomass in a subcritical water reaction medium intensified by CO₂ as pressurization agent. *Biomass and Bioenergy*, 193. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2024.107550>
- [36] Zhong, Y., Herburger, K., Xu, J., Kirkensgaard, J. J. K., Khakimov, B., Hansen, A. R., & Blennow, A. (2022). Ethanol pretreatment increases the efficiency of maltogenic α -amylase and branching enzyme to modify the structure of granular native maize starch. *Food Hydrocolloids*, 123. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107118>
- [37] Duguid, K. B., Montross, M. D., Radtke, C. W., Crofcheck, C. L., Wendt, L. M., & Shearer, S. A. (2009). Effect of anatomical fractionation on the enzymatic hydrolysis of acid and alkaline pretreated corn stover. *Bioresource Technology*, 100(21), 5189–5195. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.082>