

Universidad de Burgos

Facultad de Ciencias

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos

Área de Ingeniería Química



“Evaluación del uso de disolventes eutécticos profundos naturales (NADES) en el pretratamiento de pieles de cebolla”

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Dirigido y tutorizado por

Óscar Benito Román

María Teresa Sanz Díez

Memoria presentada por

Andrés Felipe Mayor Grajales



ANEXO DE SOSTENIBILIZACIÓN CURRICULAR (1)

MÁSTER EN SEGURIDAD Y BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIAS CURSO 2024-2025

D. Andrés Felipe Mayor Grajales, estudiante matriculado en el Trabajo Fin de Máster del Máster en Seguridad y Biotecnología Alimentarias.

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

¿Qué podemos hacer, como ingenieros, frente al reto de millones de toneladas de residuos agroindustriales que, de no ser valorizados, deterioran el medioambiente y desperdician recursos importantes para el mejoramiento de la seguridad alimentaria?

En el actual Trabajo Fin de Máster, se buscó dar respuesta a este interrogante mediante la aplicación de principios de sostenibilidad y economía circular en el tratamiento de residuos lignocelulósicos, en particular a la piel de cebolla. Esta reflexión parte de la necesidad de transformar los sistemas de producción y consumo, creando prácticas que permitan mejorar y optimizar los recursos existentes para reducir la generación de residuos.

A lo largo de este trabajo pude comprender que la sostenibilidad no es solo un concepto técnico o ambiental, sino un compromiso transversal que exige cambios de mentalidad, hábitos y estrategias industriales. El modelo de economía circular; el cual está basado en reducir, reutilizar y reciclar. Ha demostrado ser un factor de mucho análisis, siendo una alternativa viable para minimizar los residuos producidos. Es por ello que, a lo largo del trabajo se buscó revalorizar un subproducto de la agroindustria, por medio del pretratamiento con disolventes eutécticos profundos naturales para obtener un material enriquecido en celulosa.

En este contexto, la investigación se llevó a cabo en el pretratamiento de la piel de cebolla mediante disolventes eutécticos profundos naturales (NADES por sus siglas en inglés), conocidos como solventes verdes que ofrecen una alternativa prometedora frente a reactivos tradicionales muy contaminantes. A través de esta experiencia investigadora pude reforzar mis habilidades para seguir procesos respetuosos con el medioambiente, evaluando factores como la elección de materias primas, la reducción del consumo energético y la utilización mínima de productos peligrosos.

Una de las competencias más relevantes en el proceso de experimentación que pude articular en la universidad, fue la capacidad para analizar y comprender un proceso desde una perspectiva del ciclo de vida, encontrando oportunidades de mejoramiento que van desde el inicio del laboratorio hasta la posible aplicación industrial. Este estudio resulta ser una pieza clave para garantizar que las soluciones generen impactos en la seguridad alimentaria en general.

Además, este TFM fortaleció mi visión de que la innovación tecnológica debe ir de la mano con la sostenibilidad. Dado a que, al explorar diferentes formulaciones de NADES, me permitió comprender cómo pequeñas modificaciones en los parámetros de operación, pueden traducirse en procesos más eficientes y una menor dependencia de reactivos convencionales, sin la necesidad de recurrir a químicos tradicionales.

Otro punto valioso fue la conciencia crítica y razonable sobre los desafíos de escalar estos procesos analíticos y experimentales. Si bien los resultados de laboratorio muestran un gran potencial, llevar estas técnicas estudiadas a nivel industrial implica superar muchas barreras y económicas. Reflexionar



sobre ello, me hizo ser más consciente de la verdadera importancia de poder buscar alternativas viables y asequibles para que los principios de sostenibilidad no se queden no solo en la teoría, sino que se materialicen en soluciones aplicables.

Esta investigación, también refuerza por su parte la necesidad de colaboración interdisciplinar, con las distintas ciencias. Dado a que los retos ambientales exigen la participación de especialistas en ingeniería, química, ciencias alimentarias, economía, medio ambiente y política pública. La gestión de residuos agroindustriales no se resuelve solo desde un laboratorio, sino mediante la articulación de todos los actores de la cadena de valor, incluidos productores, transformadores y al final de los mismos consumidores.

Como resultado, este trabajo no solo ha permitido sentar las bases para producir materiales celulósicos de alto valor añadido, como la nanocelulosa, sino que además abre la puerta a nuevos usos de estos materiales en sectores como la alimentación, el textil o la medicina, contribuyendo a cerrar ciclos productivos bajo los principios de la bioeconomía y la economía circular.

Finalmente, esta experiencia me deja como principal aprendizaje que la sostenibilidad no es una meta alcanzable de forma aislada, sino un proceso de mejora y adaptación continua. Además, requiere de real compromiso para proponer alternativas que transformen la forma en que usamos los recursos disponibles.

Burgos, a 16 de julio de 2025

Fdo.: Andrés Felipe Mayor Grajales

(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 Máster" de la Facultad de Ciencias, aprobado en Junta de Facultad de 6 de abril de 2022, modificado en Junta de Facultad el 7 de junio de 2023)

AGRADECIMIENTOS

El trabajo presentado 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:

PID2022-136385OB-I00 - Nuevas estrategias para la producción de ácido láctico de segunda generación empleando tecnologías emergentes basadas en fluidos pasteurizados, financiado por la Agencia Estatal de Investigación.

BU027P23 - Tecnologías sostenibles de fluidos presurizados para valorizar subproductos de la industria agroalimentaria ricos en proteínas: nuevas estrategias, escalado y análisis tecno-económico y medioambiental, financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).



ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1. PRODUCTOS QUÍMICOS Y MATERIALES	5
3.2. PRETRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS DE LA PIEL DE CEBOLLA CON NADES	6
3.2.1. <i>Preparación de los NADES</i>	6
3.2.2. <i>Adición de la biomasa y tratamiento térmico</i>	7
3.2.3. <i>Separación, lavado y secado del residuo sólido</i>	7
3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS:.....	7
3.3.1. <i>Caracterización química de la piel de cebolla</i>	7
3.3.2. <i>Determinación de azúcares mediante HPLC</i>	8
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	8
4. RESULTADOS EXPERIMENTALES	8
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	8
4.2. EFECTO DE LA PRESENCIA DE EXTRACTIVOS.....	9
4.3. EFECTO DE LA RELACIÓN NADES:CEBOLLA	10
4.4. EFECTO DE LA SELECCIÓN DEL HBD Y HBA	10
4.4.1. <i>Efecto sobre la fracción de celulósica</i>	10
4.4.2. <i>Efecto sobre la fracción de lignina total</i>	11
4.5. EFECTO DE LA TEMPERATURA	12
4.5.1. <i>Resultados obtenidos del efecto de la temperatura en nades, basados en cloruro de colina, ácido málico y ácido láctico</i>	13
4.5.2. <i>Resultados del efecto de la temperatura en NADES basados en ácido tartárico</i>	14
4.5.3. <i>Resultados de la composición de celulosa en función de la temperatura para cloruro de colina (comparación con ácido láctico y ácido málico como HBD)</i>	15
4.5.4. <i>Resultados de la composición de lignina en función de la temperatura para cloruro de colina (comparación con ácido láctico y ácido málico como HBD)</i>	16
4.6. EFECTO DEL TIEMPO DE REACCIÓN: ESTUDIO CINÉTICO	16
4.6.1. <i>Evolución de la fracción celulósica</i>	17
4.6.2. <i>Evolución en la fracción de lignina total</i>	18
5. CONCLUSIONES	18
6. BIBLIOGRAFÍA	19

RESUMEN

En el presente Trabajo Fin de Máster (TFM) se llevó a cabo una investigación tipo “*screening*” centrado en el pretratamiento de piel de cebolla utilizando disolventes eutécticos profundos naturales (NADES) con el objetivo principal de enriquecer la fracción celulósica de este subproducto de la industria agroalimentaria. Estos disolventes verdes ofrecen ventajas importantes frente a otros procedimientos convencionales basados en disolventes orgánicos; como en su biodegradabilidad, baja toxicidad y alta compatibilidad.

Para la formulación de los NADES, se emplearon combinaciones basadas en cloruro de colina y betaína como aceptores de enlaces de hidrogeno (HBA) junto con ácidos orgánicos (láctico, málico y tartárico) como donadores de enlaces de hidrógeno (HBD). La investigación se centró en estudiar las variables clave del proceso, como la relación NADES:cebolla (se varió en el rango 20:1 a 8:1, g:g), el tiempo de reacción (de 1 a 6 horas), cinéticas y la temperatura (80 °C a 140 °C), sobre la eficacia de enriquecimiento de la fracción celulósica y reducción de lignina total.

Los resultados indicaron que, las mezclas de betaína y ácido tartárico incrementó la fracción de celulosa de un 34,3% partiendo como materia prima inicial, logrando un máximo de 64,4%, lo cual lo indica la viabilidad de los NADES como agentes de hidrólisis selectiva. El análisis estadístico confirmó las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según las formulaciones y condiciones predeterminadas, destacando temperaturas de 120 °C como óptimas para las relaciones NADES:cebolla de 10:1 (g:g) y para tiempos de operación largos, de 6 horas.

Este trabajo pone de manifiesto el potencial de los NADES como agentes de pretratamiento selectivo para biomasa, y contribuye a la valorización de subproductos agroindustriales dentro del marco de la biorrefinería y la economía circular. Asimismo, se sientan las bases para futuras investigaciones orientadas al aprovechamiento de la fracción celulósica en aplicaciones de alto valor añadido, como la obtención de materiales nanocelulósicos.

Palabras clave: biorrefinería, economía circular, fracción celulósica, hidrólisis selectiva, NADES, piel de cebolla.

ABSTRACT

In this Master's Thesis (TFM), a screening-type investigation was carried out focusing on the pretreatment of onion skin using natural deep eutectic solvents (NADES) with the main objective of enriching the cellulose fraction of this by-product of the agri-food industry. These green solvents offer significant advantages over other conventional procedures based on organic solvents, such as biodegradability, low toxicity, and high compatibility.

For the formulation of NADES, combinations based on choline chloride and betaine were used as hydrogen bond acceptors (HBA) together with organic acids (lactic, malic, and tartaric) as hydrogen bond donors (HBD). The research focused on studying the key variables of the process, such as the NADES:onion ratio (varied in the range 20:1 to 8:1, g:g), reaction time (from 1 to 6 hours), kinetics, and temperature (80 °C to 140 °C) on the effectiveness of cellulose fraction enrichment and total lignin reduction.

The results indicated that the mixtures of betaine and tartaric acid increased the cellulose fraction from 34.3% of the initial raw material to a maximum of 64.4%, indicating the viability of NADES as selective hydrolysis agents. Statistical analysis confirmed significant differences ($p \leq 0.05$) according to the formulations and predetermined conditions, highlighting temperatures of 120 °C as optimal for NADES:onion ratios of 10:1 (g:g) and for long operating times of 6 hours.

This work highlights the potential of NADES as selective pretreatment agents for biomass and contributes to the valorization of agro-industrial by-products within the framework of biorefinery and the circular economy. It also lays the foundation for future research aimed at exploiting the cellulosic fraction in high value-added applications, such as the production of nanocellulosic materials.

Key words: biorefinery, circular economy, cellulosic fraction, selective hydrolysis, NADES, onion skin.

1. INTRODUCCIÓN

La creciente acumulación de residuos agroindustriales, junto con el agotamiento de los recursos fósiles y sus consecuencias ambientales, ha impulsado la necesidad de desarrollar sistemas de producción más sostenibles, tanto a nivel energético como ambiental. Frente a este desafío, la economía circular ha ganado protagonismo como modelo capaz de reducir el impacto ambiental y fomentar el aprovechamiento integral de los recursos, promoviendo una transición real hacia el objetivo de residuo cero [1]. En particular, la biomasa lignocelulósica representa una fuente natural, renovable y orgánica de carbono apta tanto para la producción de biocombustibles como para la obtención de compuestos químicos de base biológica. Esta conversión, además de reducir la dependencia de fuentes fósiles, contribuye significativamente a la mitigación de las emisiones de CO₂ [2]. La biomasa lignocelulósica destaca por su abundancia, bajo coste y elevada concentración de fracciones valorizables; principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, lo que la convierte en un recurso estratégico para el diseño de procesos de valorización eficientes y sostenibles [3].

Entre las distintas fuentes de lignocelulósica disponibles, los subproductos derivados de la industria agroalimentaria ofrecen una vía especialmente atractiva en términos de la economía circular. En este sentido, la cebolla (*Allium cepa* L.) una de las hortalizas más cultivadas a nivel mundial, con una producción anual estimada de 110 Mt en 2022, genera durante su procesamiento un volumen importante de residuos. Las cascaras, que representan entre el 5% y el 10% del peso total del bulbo, constituyen el residuo principal de esta cadena productiva [4]. Su uso en alimentación animal está restringido debido a la presencia de compuestos organosulfurados, como los alqu(en)il cisteína sulfóxidos, que tras la digestión se transforman en metabolitos altamente reactivos con efectos adversos en el metabolismo de los animales [5]; haciendo que su destino habitual sea el vertedero en basureros, donde se desechan anualmente alrededor de 450.000 toneladas en Europa, generando una importante carga económica y ambiental [1]. A pesar de ser tratadas comúnmente como descarte, estas cáscaras de cebolla (OPW) contienen compuestos bioactivos de alto interés, tales como flavonoides, ácidos fenólicos y pectinas (hasta un 30%), con aplicaciones potenciales en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica [6].

En este contexto, las biorrefinerías se consolidan como plataformas capaces de promover la transformación integral de la biomasa lignocelulósica en una amplia gama de productos con valor añadido. Los procesos convencionales están basados en el uso intensivo de disolventes tóxicos (ácidos orgánicos e inorgánicos) y buscan romper la red estructural compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina. Entre las técnicas más empleadas se encuentran el tratamiento con vapor, la molienda mecánica, la auto-hidrólisis en agua caliente, así como los tratamientos ácido y alcalino [7]. El tratamiento ácido permite disolver parcialmente la lignina y aumentar el área superficial de la celulosa, mejorando su accesibilidad. El tratamiento alcalino, por su parte, favorece la separación de los enlaces estructurales entre la lignina y carbohidratos, lo que incrementa el rendimiento de azúcares fermentables en etapas posteriores [8]. Estos procesos, aunque son efectivos, presentan importantes problemas ambientales, como el consumo de grandes cantidades de disolventes, cuya recuperación y reciclado presenta un reto adicional.

Esta situación ha puesto de relieve la necesidad de seleccionar un medio de pretratamiento que sean naturales, económicos y fácilmente reciclables, alineados con los Objetivos de Desarrollo Sostenible, en particular con el ODS 9 (Industria, innovación e infraestructura) y el ODS 12 (producción y consumo responsables), que promueven el desarrollo de tecnologías limpias y la valorización eficiente de recursos mediante modelos productivos amigables con el medioambiente [9]. La creciente demanda de procesos sostenibles y respetuosos con el medioambiente ha impulsado la investigación y desarrollo de nuevos disolventes verdes. En los últimos años, los disolventes eutécticos profundos (DES) han surgido como alternativas prometedoras a los disolventes orgánicos tradicionales e incluso a los líquidos iónicos (IL),

debido a su bajo coste, menor toxicidad y facilidad de preparación. Estas mezclas se caracterizan por presentar un punto de fusión inferior al de sus componentes individuales, gracias a la formación de enlaces de hidrógeno entre dos compuestos: un aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA), como cloruro de colina o betaína, y un donador de enlaces de hidrógeno (HBD), como el ácido láctico [3], lo que facilita su uso en reacciones de extracción e hidrólisis.

A partir de este concepto general, se desarrollaron los disolventes eutécticos profundos naturales (NADES), compuestos por metabolitos celulares comunes como aminoácidos, azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos [10]. Al estar compuestos por sustancias presentes de forma natural en organismos vivos, los NADES ofrecen diversas ventajas frente a otros DES, tales como su biodegradabilidad, baja toxicidad y alta compatibilidad con otros sistemas biológicos, convirtiéndolas en disolventes atractivos para procesos sostenibles [10]. No obstante, su eficacia como agentes de pretratamiento depende de otras variables, como lo son la naturaleza química de los componentes, la proporción molar entre el HBA y el HBD, las condiciones operativas de trabajo relacionadas a la temperatura y tiempo de tratamiento. Algunos estudios han demostrado su efectividad en el tratamiento de biomasa lignocelulósica; por ejemplo, mezclas de cloruro de colina con ácido oxálico o inclusive con hidróxido de potasio han logrado fraccionar eficazmente tanto la celulosa como la lignina, facilitando la separación de componentes estructurales en residuos vegetales [7]. Es por ello, que los NADES, se plantean como agentes de pretratamiento de la cascara de cebolla, permitiendo eliminar compuestos no celulósicos y facilitar la recuperación de celulosa purificada [11].

La celulosa purificada obtenida a partir de residuos lignocelulósicos puede servir como materia prima para la producción de materiales celulósicos de tamaño nanométrico, cuya aplicación ha crecido significativamente en las últimas décadas por su biodegradabilidad, alta superficie específica y propiedades mecánicas destacadas [12]. Estos materiales se clasifican principalmente en dos tipos; los nanocristales de celulosa (CNC), que se obtienen por hidrólisis ácida y se presentan como varillas rígidas con elevada cristalinidad y por otra parte se encuentran las nanofibras de celulosa (CNF), generadas por desintegración mecánica, las cuales forman redes flexibles de fibrillas altamente entrelazadas, con una estructura similar a espaguetis. Ambas estructuras poseen múltiples grupos hidroxilo en su superficie, lo que permite su funcionalización y compatibilidad con matrices poliméricas [13].

Con base en lo expuesto, el presente trabajo plantea una estrategia exploratoria tipo screening, en la que se evaluaron diferentes formulaciones de NADES en combinación con variables clave del proceso, como la temperatura, tiempo de tratamiento, y la cantidad de biomasa a tratar. Además, el enfoque experimental adoptado en este estudio permite identificar las condiciones que favorecen la hidrólisis selectiva de los componentes no celulósicos, lo que resulta en la obtención de un material enriquecido en celulosa. Esta estrategia no solo optimiza el fraccionamiento de la biomasa, sino que también sienta las bases para el desarrollo de futuras alternativas de valorización de residuos lignocelulósicos, como es el caso de la piel de cebolla.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es llevar a cabo una evaluación preliminar del uso de disolventes eutécticos profundos naturales (NADES) en el pretratamiento de pieles de cebolla. Se pretende estudiar la capacidad de distintas formulaciones de NADES para modificar la composición de dicha biomasa, buscando un enriquecimiento en la fracción celulósica a la vez que se reduce el contenido en lignina total. Para alcanzar este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Diseñar y sintetizar mezclas de disolventes eutécticos profundos naturales (NADES) empleando cloruro de colina y betaína como donadores de puentes de hidrógeno (HBA), en combinación con distintos ácidos orgánicos como aceptores de enlaces de hidrógeno (HBD).
2. Evaluar el efecto de la relación NADES:piel de cebolla en la composición de la biomasa tratada.

3. Analizar la influencia del tiempo de reacción sobre la evolución de la composición química de la biomasa tratada.
4. Determinar el efecto de la temperatura de tratamiento.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PRODUCTOS QUÍMICOS Y MATERIALES

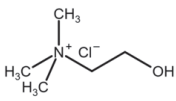
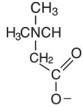
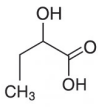
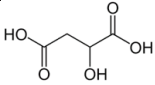
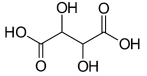
Como materia prima se ha utilizado piel de cebolla (*Allium cepa*, variedad *Horcal*) proporcionada por la empresa productora de morcillas Embutidos Cardeña S.L. Esta cebolla fue secada a temperatura ambiente y triturada utilizando el molino de cuchillas Retsch SM100 hasta obtener un tamaño de partícula inferior a 0.5 mm.

Para la preparación de los NADES utilizados en el desarrollo del trabajo experimental se utilizaron como HBA betaína (98%, adquirida a través de Alfa Aesar GmbH & KG, Alemania) y cloruro de colina (>98%, VWR Chemicals, EEUU) y como HBD los siguientes ácidos orgánicos: ácido láctico DL (~90%, fabricado por Fluka, distribuido por Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Alemania), ácido tartárico (99.5% de pureza, proporcionado por Panreac) y ácido málico (>99%, fabricado por Fluka Chemie AG, Alemania).

Otros reactivos que se han empleado: H₂SO₄ para la hidrólisis ácida y para la fase móvil del HPLC. El ácido sulfúrico utilizado para la hidrólisis de la muestra fue del 96 % de pureza y fue proporcionado por Labbox (España), mientras que el utilizado para la preparación de la fase móvil por HPLC fue Suprapur al 96 % proporcionado por Merck (Alemania). Todos los reactivos fueron usados sin purificación adicional.

Para la preparación de los disolventes eutécticos profundos **NADES**, se utilizaron distintos compuestos como aceptores (HBA) y donadores (HBD) de enlaces de hidrógeno. Para ello, en la Tabla 1, se muestran los reactivos utilizados en la investigación, acompañados con el peso molecular, fórmula química y estructura.

Tabla 1. Características de los reactivos empleados para preparar los NADES

Compuesto	Función	Peso Molecular (g/mol)	Fórmula Química	Estructura
Cloruro de Colina	HBA	139,62	$[(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}]^+\text{Cl}^-$	
Betaína	HBA	117,15	$(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$	
Ácido Láctico	HBD	90,08	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$	
Ácido Málico	HBD	134,09	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$	
Ácido Tartárico	HBD	150,09	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$	

Los reactivos se seleccionaron por su carácter natural, baja toxicidad y alta disponibilidad en el medio, lo que los convierte en alternativas sostenibles en comparación a los disolventes tradicionales. La selección también se basó en su capacidad para formar NADES, por medio de interacciones, como enlaces de hidrógeno entre aceptores (HBA) y donadores (HBD). En

este trabajo de investigación, el cloruro de colina y la betaína se emplearon como HBA debido a su estructura química que facilita la formación de enlaces de hidrógeno con los HBD. Es por ello que, los ácidos láctico, málico y tartárico son grupos funcionales capaces de participar en múltiples interacciones intermoleculares, con lo que permitieron obtener diversas mezclas, dando lugar a obtener biomásas enriquecidas.

Además, las propiedades fisicoquímicas de los NADES, como su viscosidad, polaridad y capacidad extractiva pueden ajustarse en función de la proporción y tipo de los componentes utilizados. Esta versatilidad permite diseñar sistemas específicos orientados a la extracción y valorización de compuestos bioactivos de interés que se encuentran presentes en los subproductos de la agroindustria, como la piel de cebolla utilizada en este estudio.

3.2. PRETRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS DE LA PIEL DE CEBOLLA CON NADES

El proceso de extracción se llevó a cabo en un sistema experimental (tal y como se muestra en la Figura 1) compuesto por dos reactores encamisados en vidrio, cada uno de ellos con un volumen de 0.25 L. Los reactores se aislaron térmicamente empleando fibra de vidrio. Por el encamisado se hizo circular un fluido térmico (Marloterm SH) calentado en un baño termostático (J.P Selecta, Tectron-Bath) que permitió alcanzar la temperatura de operación deseada (entre 80 y 140 °C). La agitación dentro del reactor se consiguió al situar los reactores sobre un agitador magnético J.P Selecta, Agimatic-N, operando a 300 rpm.

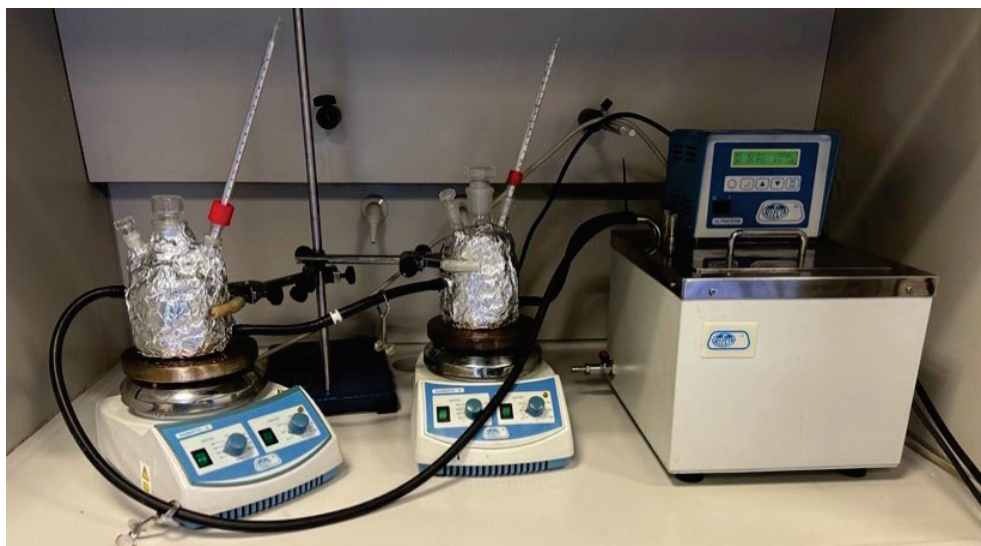


Figura 1. Montaje experimental del sistema de hidrólisis utilizado para el tratamiento de piel de cebolla con NADES.

El pretratamiento mediante hidrólisis con NADES se empleó con el fin de facilitar la ruptura de la estructura lignocelulósica de la piel de cebolla y de este modo, favorecer la liberación de los componentes. Tal como se describe a continuación:

3.2.1. Preparación de los NADES

Para llevar a cabo el proceso de la hidrólisis, los NADES se prepararon combinando un HBA y un HBD en proporciones molares establecidas (por ejemplo, ratio 1:2 HBA:HBD). A partir de la masa molar de cada componente, se calcularon las cantidades necesarias para obtener 20 g de NADES en cada formulación. Además, los reactivos fueron pesados por separado y se introdujeron en el reactor previamente calentado hasta 80 °C. De esta forma y bajo agitación constante, se consiguió la fusión de los componentes de la mezcla hasta formar un líquido homogéneo y transparente. En ese momento se incrementó la temperatura en los reactores hasta alcanzar la temperatura de trabajo.

3.2.2. Adición de la biomasa y tratamiento térmico

Una vez alcanzada la temperatura de trabajo correspondiente (entre 80 y 140 °C), se añadió al reactor la cantidad de cebolla triturada correspondiente (entre 1 y 2,5 g, según el experimento). Después, la mezcla se mantuvo bajo agitación durante el tiempo establecido para cada condición (entre 1 y 6 horas).

3.2.3. Separación, lavado y secado del residuo sólido

Finalizado el tiempo de tratamiento, el reactor se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Luego, se añadieron 20 mL de una mezcla acetona:agua en proporción 50:50 (v/v) para reducir la viscosidad del sistema. Las muestras fueron transferidas a tubos de centrifugación de 50 mL y sometidas a tres ciclos de lavado con acetona y agua, siguiendo el protocolo descrito por Mamilla et al. [7].

Las centrifugaciones se realizaron usando la centrífuga Thermo Scientific Sorvall ST16R. La primera centrifugación se efectuó a 4500 rpm (8 min en el primer ciclo y 5 min en los dos siguientes). En cada ciclo, se descartó el sobrenadante y se adicionaron nuevamente 20 mL de solución acetona:agua en proporción 1:1, seguida de agitación vórtex (*v05 Series, 16x Instruments*) para garantizar una adecuada resuspensión del sedimento. Tras el tercer ciclo de lavado, los pellets obtenidos se secaron en una estufa a 50 °C durante 48 horas y fueron triturados en un molino de bolas (RETSCH MM400) con una frecuencia de 25 Hz durante 2 minutos, para su posterior análisis.

3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS:

3.3.1. Caracterización química de la piel de cebolla

Se realizó la caracterización de la materia prima y residuos tratados para conocer su composición química mediante determinación de humedad, cenizas, cuantificación de lignina y azúcares. El procedimiento seguido se basó en la metodología propuesta por el NREL (Technical Report NREL/TP-510-42618), para la determinación de carbohidratos estructurales y lignina en biomasa. Este procedimiento consta de diferentes pasos que se detallan a continuación:

3.3.1.1. Determinación de humedad

Se utilizó un método gravimétrico convencional. Se pesaron crisoles secos para registrar la tara, se añadieron aproximadamente 100 mg de muestra. Luego, las muestras se colocaron en una estufa a 105 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se dejaron enfriar en un desecador a temperatura ambiente y se pesaron nuevamente. La humedad se calculó por diferencia de peso entre muestra húmeda y seca, expresando el resultado en porcentaje respecto a la masa inicial. Los datos de composición de los residuos de cebolla tras los diferentes tratamientos se expresaron en base seca.

3.3.1.2. Determinación de cenizas

Para la determinación de cenizas, se utilizaron las mismas muestras secas. Los crisoles con la muestra se colocaron en una mufla a 575 °C durante 6 horas. Pasado este tiempo, se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron con el fin de calcular el porcentaje de material inorgánico residual.

3.3.1.3. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida es un paso necesario para romper la estructura lignocelulósica de la muestra y de esta manera liberar los azúcares (monómeros) que forman los componentes estructurales, como la glucosa que es el monómero principal de la glucosa. Para ellos, se realizó el proceso en dos etapas.

Primero, se pesaron aproximadamente 300 mg de muestra seca en tubos roscados, luego se añadió 3 mL de H₂SO₄ al 72%. La mezcla se mantuvo a 30 °C durante 1 hora, agitando alrededor de 5 minutos para asegurar un contacto homogéneo.

Después, se diluyó la mezcla con 84 mL de agua destilada y se transfirió a botellas resistentes de vidrio de 100 mL. La segunda etapa, se realizó en una autoclave a 121 °C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar y se filtró a vacío para separar la lignina insoluble y el material soluble, reservando 50 mL del licor filtrado para el análisis de lignina soluble. Para ello se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis a 240 nm. La muestra se diluyó para que la absorbancia final quedara entre 0,7 y 1, siguiendo el protocolo descrito por el NREL.

Por otro lado, el sólido retenido en el filtro se lavó con agua destilada, se secó a 105 °C, se pesó y finalmente se calcinó en la mufla a 575 °C durante 4 horas para determinar la lignina insoluble. La lignina total de la muestra se calcula como suma de las ligninas soluble e insoluble.

Para la determinación de los carbohidratos estructurales se tomaron 5 mL de licor filtrado, el cual se neutralizó hasta pH 6 usando carbonato sódico. El licor neutralizado se filtró usando un filtro de 0,22 µm y el contenido en azúcares se determinó empleando el sistema cromatográfico descrito en la sección 3.3.2.

3.3.2. Determinación de azúcares mediante HPLC

Se utilizó un HPLC (Agilent Technologies) equipado con una columna Biorad Aminex HPX-87 H (300 x7,8 mm, Bio-Rad) acoplada a la columna de guarda Micro-Guards Cation H+ (BioRad), con un detector de longitud de onda variable (VWD) y un detector de índice de refracción (RID), utilizando ácido sulfúrico 0,005 M como fase móvil (0.6 mL/min). La columna y los detectores se mantuvieron a 40 °C y el tiempo total de funcionamiento fue de 60 min por inyección. El volumen de inyección de cada muestra fueron 10 µL.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan como una media ± desviación estándar de al menos dos réplicas para cada análisis. El análisis estadístico se ha llevado a cabo mediante el software Statgraphics XVII, con el que se han determinado las diferencias entre las muestras mediante un análisis de la varianza aplicando el test de Tukey para un p- valor ($\leq 0,05$).

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

La composición de la materia prima de partida determinada de acuerdo con el protocolo de NREL (descrito en la sección 3.3.1) se recoge en la Tabla 2. Esta composición se va a utilizar como referencia para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos realizados con NADES en la composición de la cebolla.

Tabla 2. Composición de la cebolla usada como materia prima

COMPUESTOS	mg/100 g piel de cebolla
Extractivos	8,4 ± 0,7
Celulosa	34,3 ± 1,9
Pectina	29,8 ± 0,7
Lignina Total	12,8 ± 0,5
Cenizas	7,3 ± 0,5
Proteína	2,6 ± 0,1
Galactano + Arabinano + Xilano	4,6 ± 0,3

A partir de esta composición inicial, se analizaron los sólidos resultantes de los pretratamientos con NADES en su hidrólisis ácida, para estudiar como varía la fracción celulósica y el contenido de lignina total bajo distintas condiciones, que se muestran en los siguientes apartados.

4.2. EFECTO DE LA PRESENCIA DE EXTRACTIVOS

En primer lugar, se estudió el efecto de la presencia de extractivos en la materia prima. Para ello, se trabajó con cebolla (cuya composición se muestra en la Tabla 2 y a la misma a la cual se le eliminaron los extractivos con una mezcla de etanol:agua 70:30. Ambas fracciones se sometieron a un pretratamiento con una combinación de cloruro de colina:ácido láctico (relación molar 1:2), bajo condiciones de 120 °C durante 6 horas utilizando aproximadamente 20 g de NADES por cada 2 gramos de cebolla. Estas condiciones fueron seleccionadas a partir de los experimentos previos realizados en el laboratorio por el grupo BIOIND de la Universidad de Burgos.

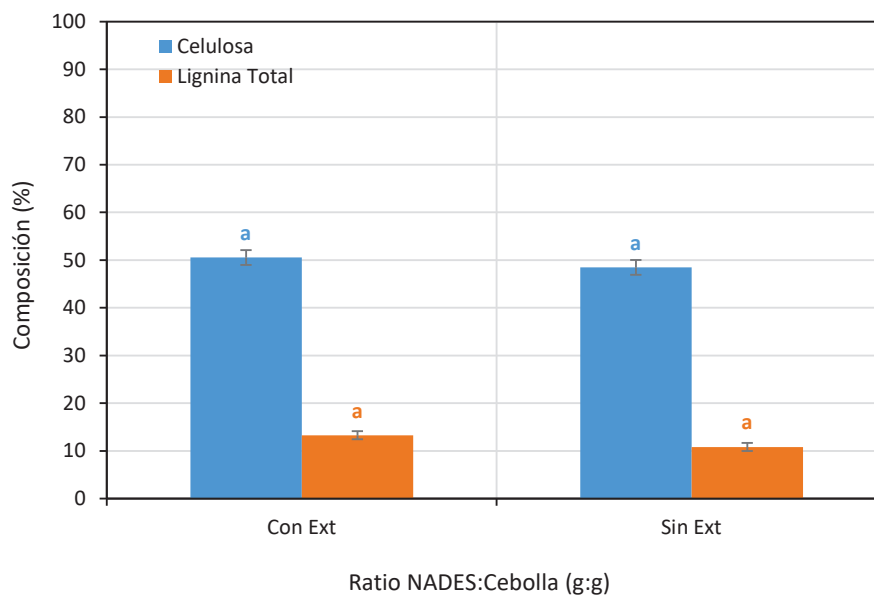


Figura 2. Efecto de la eliminación de extractivos en la composición de celulosa y lignina total de la piel de cebolla. (120°C, 6 h, 10:1). Letras iguales: ausencia de diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La Figura 2 por su parte, presenta los resultados media \pm desviación estándar de la fracción de celulosa y lignina total tras el tratamiento, junto con el análisis estadístico realizado mediante ANOVA de un factor y test de Tukey ($p \leq 0,05$). El contenido de celulosa se mantuvo prácticamente constante, con valores de $50,5 \pm 1,6\%$ para la cebolla con extractivos y $48,5 \pm 1,6\%$ sin extractivos, sin diferencias estadísticamente significativas. Si bien sí que se pudo observar un incremento en el contenido de celulosa de la piel de cebolla tras el tratamiento con los NADES, pasando de un 34% hasta aproximadamente el 50%.

Por su parte, la lignina total disminuyó de $13,3 \pm 0,8\%$ a $10,8 \pm 0,8\%$ tras la eliminación de extractivos, pero este cambio tampoco resultó estadísticamente significativo. Es por ello, que estos hallazgos indican que la eliminación de extractivos no genera un impacto relevante sobre la composición lignocelulósica bajo las condiciones empleadas. Esto concuerda con los estudios previos de Sik et. al [14], quienes explican que los NADES, especialmente las mezclas de cloruro de colina y ácidos orgánicos logran fraccionar de forma eficiente la biomasa lignocelulósica sin necesidad de etapas adicionales de extracción. Además, los NADES poseen capacidades que van más allá de disolución de la lignina, debido a que permiten el fraccionamiento selectivo mediante la solubilización de la hemicelulosa y la lignina. Por ello, y considerando la simplificación operativa del proceso, se decidió continuar los experimentos posteriores utilizando piel de cebolla con extractivos y aprovechar la capacidad de los NADES para extraer los compuestos bioactivos de interés.

4.3. EFECTO DE LA RELACIÓN NADES:CEBOLLA

En este apartado se evaluó el efecto de la relación NADES:cebolla sobre la eficiencia del pretratamiento de la hidrólisis. Para ello, se utilizó piel de cebolla con extractivos y se trabajó con mezclas de cloruro de colina:ácido láctico con una relación molar 1:2 bajo condiciones constantes de 120 °C y 6 horas. La cantidad de NADES se mantuvo en 20 g, y se prepararon diferentes lotes experimentales con cargas de biomasa de 1 g, 1,35 g, 2 g y 2,5 g lo que permitió estudiar las relaciones de NADES:cebolla de 20:1, 15:1, 10:1 y 8:1, respectivamente. Los resultados experimentales obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Efecto de las ratios de NADES:cebolla sobre la composición de celulosa y lignina total de la piel de cebolla tras el pretratamiento.

COMPUESTOS	20:1	15:1	10:1	8:1
Celulosa (%)	50,6 ± 0,7 ^a	48,9 ± 1,4 ^a	50,5 ± 1,6 ^a	51,2 ± 0,8 ^a
Lignina Total (%)	10,3 ± 0,3 ^b	11,6 ± 1,3 ^{a,b}	13,3 ± 0,8 ^{a,b}	15,0 ± 2,1 ^b

La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos junto con la desviación estándar y el análisis estadístico. Se observa que el contenido de celulosa permanece estable entre el 48,9% y 51,2%, sin diferencias estadísticamente significativas, lo que confirma que variar la proporción no ejerce un efecto relevante sobre la fracción celulósica bajo estas condiciones de operación, si bien en cualquiera de los casos se produjo un incremento de la fracción celulósica con respecto a la piel de cebolla de partida.

En cuanto a la lignina total, se evidencia una tendencia de disminución cuando la relación se incrementa de 8:1 a 20:1, pasando de 15,0 ± 2,1% a 10,3 ± 0,3%. No obstante, el análisis estadístico ANOVA muestra que estos valores forman grupos estadísticamente homogéneos (a,b) en todas las relaciones evaluadas, lo que indica que la variación no es significativa en ningún caso. Estos resultados indican que las distintas proporciones no tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la composición de lignina, coincidiendo con lo reportado por Sattlewal et al. [15] donde destacan que la eficiencia de los NADES no solo depende de las proporciones del solvente sino que además depende de su composición química, el pH y la temperatura de operación.

Considerando la eficiencia operativa y la optimización del uso de solvente, se seleccionó la relación 10:1 (g:g) como la condición de trabajo predeterminada, dado a que permite procesar más biomasa por unidad de NADES sin afectar significativamente la eficiencia del pretratamiento y evitando problemas de viscosidad.

4.4. EFECTO DE LA SELECCIÓN DEL HBD Y HBA

En esta sección se evalúa cómo influye la composición del NADES (combinaciones de aceptor de enlaces de hidrogeno (HBA) y el donador (HBD) en la eficiencia del pretratamiento de la piel cebolla. Para ello, se trabajó con dos HBA (cloruro de colina y betaína) y tres HBD (ácido láctico, málico y tartárico) manteniendo una relación molar fija de 1:2 (HBA:HBD). Las condiciones de operación fueron constantes, de 120 °C a 6 horas de reacción con una relación molar de 10:1 (2 g de cebolla por 20 g de NADES). Además, la composición de la materia prima se muestra en la Tabla 2, que se utilizó como referencia para analizar los cambios en la fracción de celulósica y la lignina total.

4.4.1. Efecto sobre la fracción de celulósica

La Figura 3 muestra el contenido de celulosa obtenido tras el pretratamiento con cada mezcla de HBA:HBD. En la figura se observa que la combinación de betaína:ácido tartárico alcanzó el mayor enriquecimiento de celulosa (64,1 ± 1,7%), seguido de la mezcla cloruro de colina:ácido tartárico (58,9 ± 1,8%). Ambos valores presentan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, expresado en letras minúsculas el análisis estadístico) frente a las combinaciones con ácido láctico y málico. Cuando se trabajó con cloruro de colina como HBA, los peores resultados en términos de enriquecimiento de la fracción celulósica se obtuvieron con ácido málico, si bien el contenido en celulosa (aproximadamente el 45%) fue superior al

de la cebolla de partida. Con respecto al empleo de betaína como HBA, la combinación con ácido láctico ofreció el menor enriquecimiento en la fracción celulósica, alrededor del 38%, lo que prácticamente no alteró la composición de la cebolla de partida. Esto demuestra que la selección del HBD y HBA y sus posibles combinaciones tiene un impacto claro sobre la eficacia del NADES para disolver fracciones no celulósicas y concentrar la fracción de celulosa.

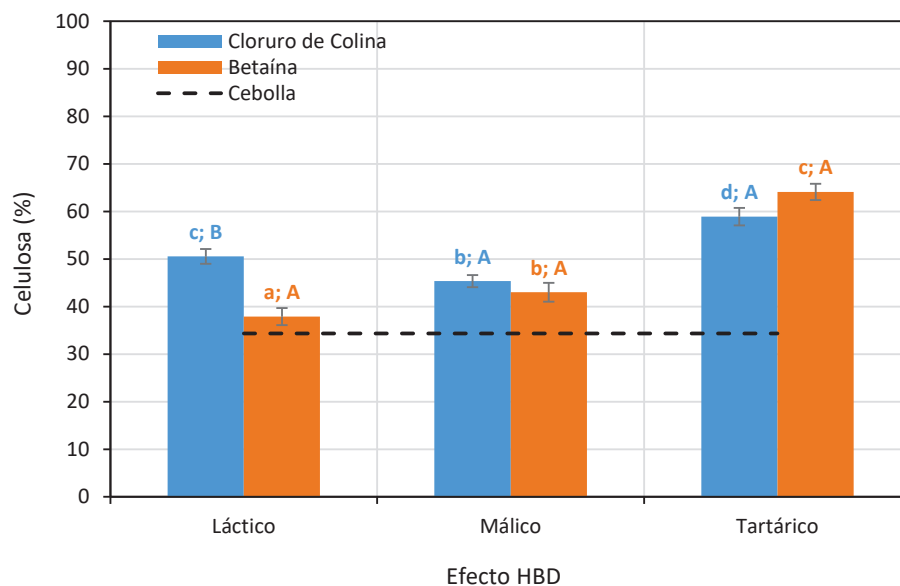


Figura 3. Efecto de la fracción del HBD/HBA sobre la composición de celulosa de la piel de cebolla tras el pretratamiento. (120°C, 6 h, 10:1). Letras distintas: diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas se refieren a la comparación de mezclas con un mismo HBA (cloruro de colina o betaína). Las letras mayúsculas se refieren a la comparación entre mezclas de cloruro de colina y betaína para un mismo HBD.

No obstante, los resultados de la Figura 3 indican que los ácidos orgánicos como el ácido tartárico, con múltiples grupos funcionales, promueven una mayor ruptura de la red lignocelulósica, debido a su capacidad de formar enlaces de hidrógeno con los componentes estructurales. Este comportamiento puede explicarse por la presencia de múltiples grupos ácidos en su estructura, lo que según Kalhor et al. [16] facilita la ruptura de los enlaces éter presentes en la biomasa durante el pretratamiento con NADES.

Asimismo, se confirma que el cambio de HBA (cloruro de colina vs betaína) también afecta la capacidad hidrolítica del NADES, como se puede ver en la Figura 3. El estudio estadístico realizado (letras mayúsculas en la Figura 3) permite ver para cada ácido orgánico seleccionado, como influyen en la composición final de la cebolla la selección del HBA (cloruro de colina o betaína). Cuando se trabajó con los ácidos málico o tartárico, se obtuvieron resultados similares al cambiar el HBA, sin embargo cuando se trabajó con ácido láctico sí que obtuvieron importantes diferencias; por ejemplo, la mezcla de betaína:ácido láctico presentó el menor contenido de celulosa ($37,9 \pm 1,8\%$), que se incrementó de forma notable al usar cloruro de colina. Estos resultados concuerdan con estudios recientes de Syakir et al. [17] que destacan la relevancia de optimizar la combinación de HBA/HBD para maximizar el enriquecimiento de celulosa en matrices lignocelulósicas.

4.4.2. Efecto sobre la fracción de lignina total

La Figura 4 muestra la evolución de la lignina total para las mismas combinaciones HBA/HBD. Se observa que, a diferencia de la fracción celulósica, los valores de lignina no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos, como se evidencia

en las letras “a” de cada barra. Además, los contenidos oscilaron entre $13,3 \pm 0,8\%$ para cloruro de colina:ácido láctico y $16,7 \pm 1,8\%$ para cloruro de colina:ácido tartárico.

Este resultado indica que, aunque la selección del HBD/HBA tiene un impacto relevante en la fracción celulósica, su efecto sobre la solubilización de lignina es limitado bajo condiciones evaluadas ($120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 6 h, relación 10:1). La menor variación encontrada indica que para mejorar la eliminación de lignina podrían requerirse ajustes adicionales en el diseño de los NADES, que favorezcan la ruptura de enlaces lignocelulósicos. Según Xiao et al [18] la fracción lignocelulósica presenta enlaces robustos entre lignina y carbohidratos de difícil ruptura, por lo que optimizar la temperatura, el tiempo de reacción y la relación estequiométrica de los NADES puede incrementar la accesibilidad del disolvente y es por ello, la eficiencia de extracción de lignina.

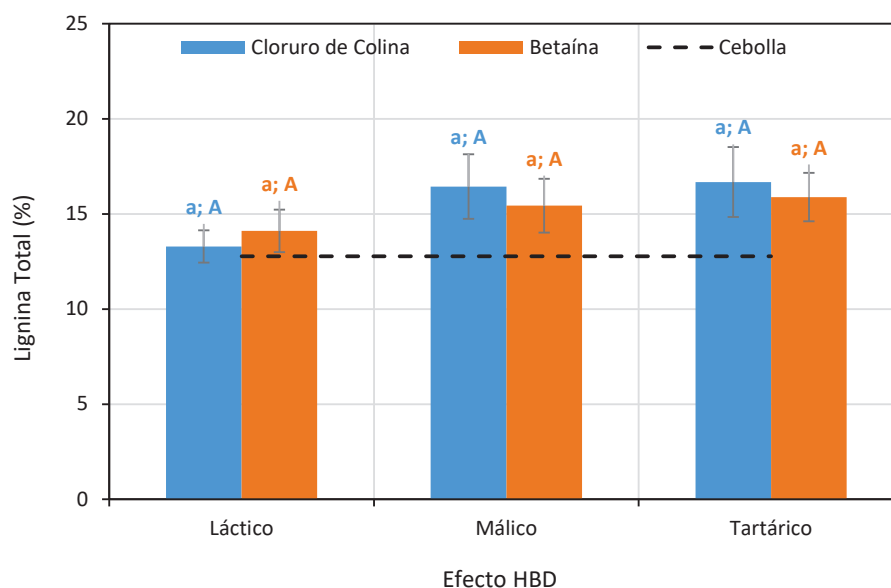


Figura 4. Efecto de la fracción del HBD/HBA sobre la lignina total de la piel de cebolla tras el pretratamiento. (120°C , 6 h, 10:1). Letras iguales: ausencia de diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

De tal manera, se confirma que la combinación de HBA/HBD estudiada optimiza principalmente la recuperación de celulosa, mientras que la lignina permanece más estable. Este resultado concuerda con lo reportado por Lobato et al. [19], quienes demostraron que la solubilización selectiva de lignina depende fundamentalmente de la acidez, polaridad y capacidad de formación de enlaces de hidrogeno del solvente y de condiciones intensificadas de operación.

Se puede concluir con los resultados obtenidos que, bajo las condiciones actuales, la selección de HBA:HBD impacta lo que es la concentración de celulosa, mientras que la eliminación de lignina se mantiene limitada, reforzando la necesidad de evaluar parámetros adicionales de operación para mejorar la eficiencia. Es por ello que, el enriquecimiento en celulosa como la eficiencia del pretratamiento, la combinación óptima corresponde a las combinaciones formadas por betaína y ácido tartárico, dado que muestran el mayor contenido en celulosa tras realizar el tratamiento.

4.5. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Con el fin de evaluar cómo influye la temperatura de operación en la eficacia del pretratamiento de la piel de cebolla mediante el uso de diferentes relaciones de NADES, se realizaron mezclas de cloruro de colina:ácido tartárico y betaína:ácido tartárico, así como cloruro de colina con ácido láctico y málico. Todas las pruebas experimentales se realizaron manteniendo constantes las condiciones de reacción molar (HBA:HBD igual a 1:2) y un tiempo

de reacción de 6 horas. Los ensayos se planificaron para cubrir rangos de temperaturas de 80 °C a 140 °C, con el fin de identificar variaciones significativas al tipo de HBD empleado y al incremento de la temperatura.

De este modo, el análisis en este apartado permitirá determinar si la selección de temperatura favorece el enriquecimiento de la fracción celulósica, así como establecer comparaciones directas entre los distintos ácidos orgánicos empleados. Los resultados obtenidos se compararon con la composición inicial de la materia prima (Tabla 2) y se validaron mediante análisis ANOVA ($p \leq 0,05$) para determinar la significancia estadística de las variaciones observadas.

4.5.1. Resultados obtenidos del efecto de la temperatura en NADES, basados en cloruro de colina, ácido málico y ácido láctico

A continuación, en la Figura 5 se presentan los cambios en la composición de la fracción celulósica de la piel de cebolla al aumentar la temperatura del pretratamiento con distintas combinaciones de NADES, con el fin de evaluar su efecto sobre el enriquecimiento de la celulosa.

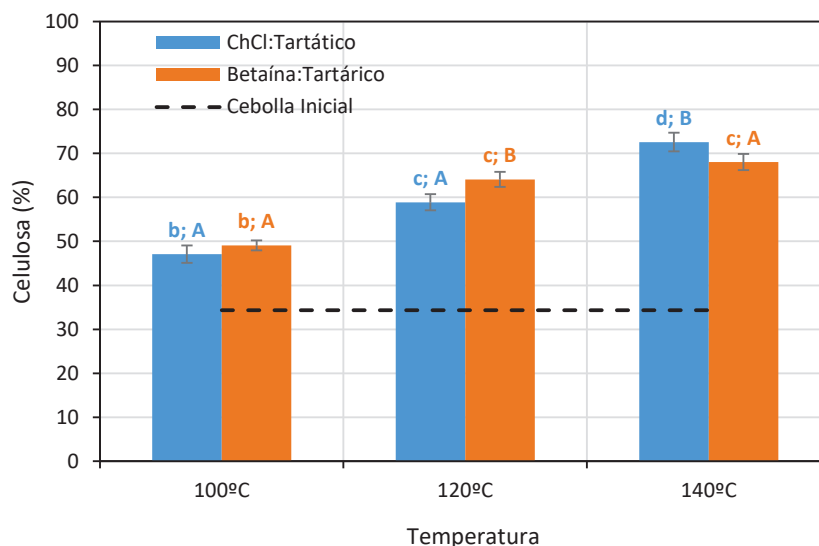


Figura 5. Efecto de la temperatura sobre la fracción de celulosa para las mezclas de cloruro de colina:ácido tartárico y betaína :ácido tartárico (100 °C – 140 °C, 6 h, 10:1). Letras distintas: diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas se refieren a la comparación de mezclas cloruro de colina:ácido tartárico a diferentes temperaturas, mientras que letras mayúsculas se refieren a comparación de mezclas cloruro de colina:ácido tartárico y betaína:ácido tartárico tratadas a la misma temperatura.

La Figura 5 muestra el efecto de la temperatura sobre la composición de celulosa tratada con cloruro de colina:ácido tartárico y betaína:ácido tartárico. Se observa que en ambos sistemas de NADES, el contenido de celulosa aumenta significativamente al elevar la temperatura de 100 °C a 140 °C. Con respecto a la mezcla de cloruro de colina:ácido tartárico, el contenido de celulosa pasa de $47,1 \pm 2,0\%$ a $72,6 \pm 2,1\%$, mientras que para la betaína:ácido tartárico se incrementa de $49,1 \pm 1,1\%$ a $68,0 \pm 1,8\%$. Es por ello, que el ANOVA muestra diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre temperaturas, como lo indican las diferentes letras del análisis.

Este comportamiento valida que el aumento de temperatura intensifica la ruptura de enlaces hemicelulósicos y lignocelulósicos, favoreciendo la concentración de celulosa en la biomasa pretratada. Según los resultados obtenidos por Syakir Bahazin et al. [17] destacan la estabilidad térmica de los NADES basados en betaína y su alta capacidad de formar fuertes enlaces de hidrógeno mejorando la fracción celulósica recuperada, lo que explica la tendencia observada especialmente para betaína:ácido tartárico. Además, se destaca que trabajar a

temperaturas intermedias en 120 °C resultan efectivas para cloruro de colina:ácido tartárico, mientras que betaína:ácido tartárico podría sostener un rango superior para maximizar su rendimiento.

Es por ello que, los resultados demuestran que la selección de temperaturas más elevadas favorece significativamente la recuperación de la celulosa cuando se utilizan los NADES con ácido tartárico. Además, las letras mayúsculas que se encuentran representadas en la Figura 7, permiten comparar el efecto del tipo de HBA, es decir cloruro de colina frente a betaína en a una misma temperatura, lo que permite la identificación de las diferencias significativas en el enriquecimiento de celulosa asociadas al tipo de aceptor empleado.

4.5.2. Resultados del efecto de la temperatura en NADES basados en ácido tartárico

Dado que el ácido tartárico mostró una tendencia favorable en el enriquecimiento de la fracción celulósica en los análisis previos, en el siguiente apartado se profundiza el comportamiento frente al incremento de temperatura en combinación con distintos HBA (cloruro de colina y betaína).

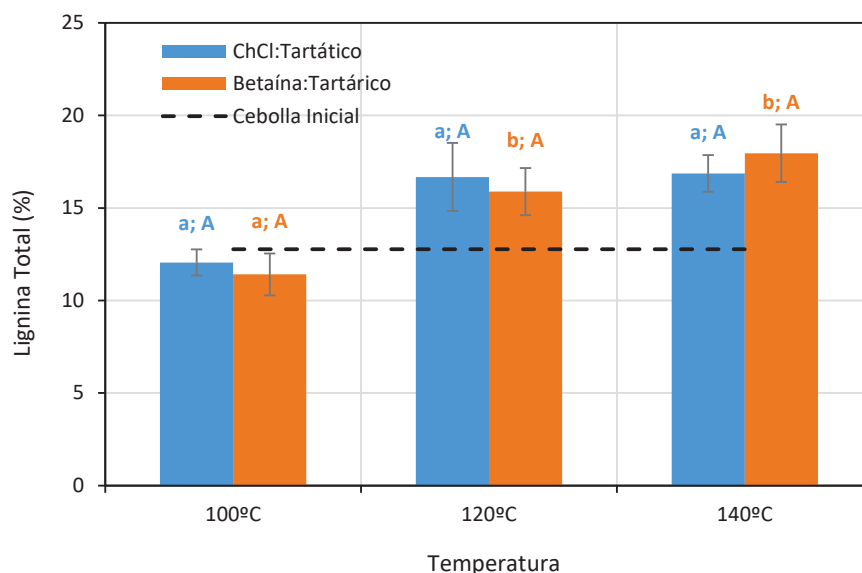


Figura 6. Efecto de la temperatura sobre la fracción de lignina para las mezclas de cloruro de colina:ácido tartárico y betaína:ácido tartárico. (100 °C – 140 °C, 6 h, 10:1). Letras distintas: diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas se refieren a la comparación de mezclas cloruro de colina:ácido tartárico a diferentes temperaturas, mientras que letras mayúsculas se refieren a comparación de mezclas cloruro de colina:ácido tartárico y betaína:ácido tartárico tratadas a la misma temperatura.

En la Figura 6, se analiza la transición del contenido de lignina siguiendo las mismas condiciones y temperaturas. Para cloruro de colina:ácido tartárico, la lignina aumenta $12,1 \pm 0,7\%$ a $16,9 \pm 1,0\%$, mientras que para betaína:ácido tartárico, se incrementa de $11,4 \pm 1,1\%$ a $18,0 \pm 1,6\%$ al pasar de 100 °C y 140 °C.

El análisis estadístico muestra diferencias significativas, como lo indican las letras mayúsculas en la Figura 6 para la mezcla betaína:ácido tartárico. En cambio, existe una menor variación en cloruro de colina:ácido tartárico, lo que indica que la solubilización de lignina es menos sensible a la temperatura en sistemas de cloruro de colina, pero ligeramente mayor cuando se emplea betaína como HBA. Estos resultados reafirman que la temperatura es un factor determinante para la recuperación de la celulosa, sin embargo la solubilización de la lignina puede verse limitada por factores como la viscosidad o la formación de estructuras resistentes.

Según Aroso et al. [22] la elevada viscosidad de los NADES basados en betaína puede limitar la eficiencia de la disolución de la lignina, lo que explica por qué, aunque la fracción celulósica aumenta, la reducción de lignina no es tan marcada como en mezclas de cloruro de colina.

Por tanto, se refuerza la necesidad de optimizar no solo la temperatura, sino también la formulación de los NADES, para maximizar la eficacia de disolución de lignina y garantizar un pretratamiento compacto.

4.5.3. Resultados de la composición de celulosa en función de la temperatura para cloruro de colina (comparación con ácido láctico y ácido málico como HBD)

La Figura 7 presenta el efecto de la temperatura sobre la fracción celulósica cuando se emplean mezclas de cloruro de colina:ácido láctico y cloruro de colina:ácido málico. En ambos casos, se observa un aumento progresivo de la celulosa alcanzando un máximo de $52,8 \pm 1,0\%$ a $140\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que representa un incremento significativo respecto a temperaturas más bajas. Para cloruro de colina:ácido málico, la celulosa también mostró una tendencia ascendente, logrando así $56,3 \pm 1,2\%$ a $140\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por lo que estos resultados confirman que la temperatura ejerce un efecto positivo sobre la concentración de celulosa.

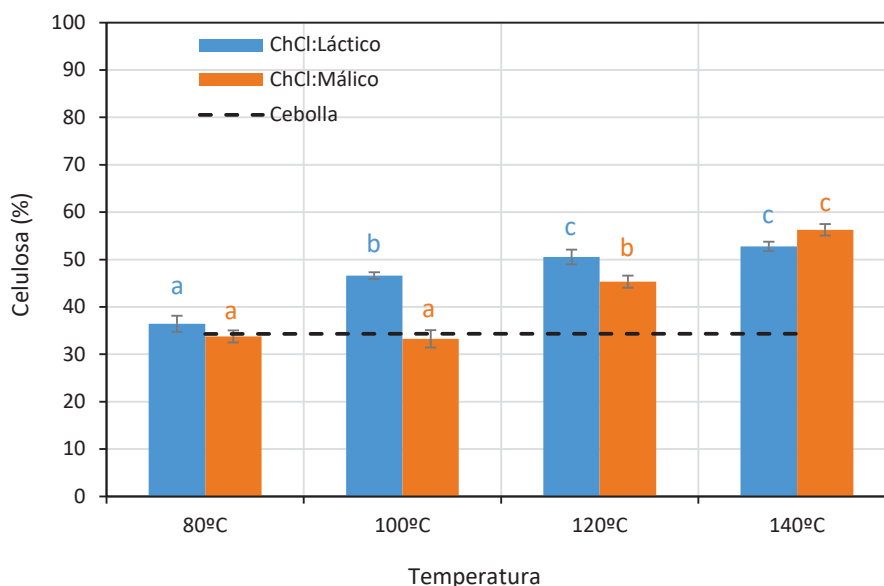


Figura 7. Variación de la fracción de celulosa con la temperatura para cloruro de colina:ácido láctico y cloruro de colina:ácido málico. ($100\text{ }^{\circ}\text{C} - 140\text{ }^{\circ}\text{C}$, 6 h, 10:1). Letras distintas: diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Estos resultados demuestran a su vez que la temperatura es un factor muy importante para la intensificación de la ruptura de enlaces hemicelulósicos y lignínicos, promoviendo la concentración de la fracción celulósica. Según lo reportado por Gómez-Urios et al. [23], la polaridad y acidez de los NADES cloruro de colina:ácido láctico y cloruro de colina:ácido málico incrementan la solubilidad de los componentes lignocelulósicos, a la vez que protegen compuestos antioxidantes, evitando la degradación excesiva de la celulosa, favoreciendo a un pretratamiento más selectivo y manteniendo la integridad de la celulosa mientras se facilita la extracción de fracciones no deseadas. En este sentido, la superioridad de cloruro de colina:ácido málico sobre cloruro de colina:ácido láctico puede atribuirse a la capacidad que tiene el ácido málico para formar múltiples enlaces de hidrógeno con la matriz vegetal, lo que fortalece la disolución de hemicelulosas y lignina sin dañar la estructura celulósica.

Con lo expuesto, se confirma que la adecuada elección del HBD, combinada con la temperatura óptima, es determinante para maximizar la recuperación de la fracción celulósica.

4.5.4. Resultados de la composición de lignina en función de la temperatura para cloruro de colina (comparación con ácido láctico y ácido málico como HBD)

La Figura 8 muestra la influencia de la temperatura sobre la fracción de lignina para las mezclas de cloruro de colina:ácido láctico (y cloruro de colina:málico. En el caso de colina:ácido láctico, los valores se mantuvieron relativamente constantes, desde $13,4 \pm 1,0\%$ a 80°C hasta $14,0 \pm 1,0\%$ a 140°C . Sin embargo, para cloruro de colina:málico, se observa un incremento notable desde $18,4 \pm 1,5\%$ a 100°C hasta $21,7 \pm 1,8\%$ a 140°C .

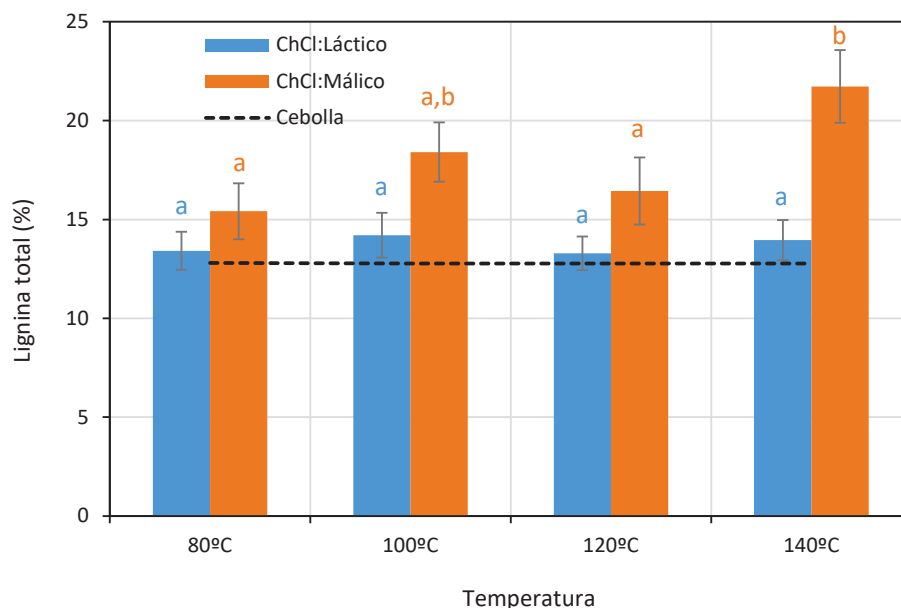


Figura 8. Variación de la fracción de lignina con la temperatura para las mezclas cloruro de colina:ácido láctico y cloruro de colina:málico. ($100^\circ\text{C} - 140^\circ\text{C}$, 6 h, 10:1). Letras distintas: diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Por su parte, el análisis ANOVA muestra que para cloruro de colina:ácido láctico no se detectan diferencias estadísticamente significativas, indicando que la lignina se mantiene relativamente estable con el aumento de la temperatura. Por otro lado, para cloruro de colina:málico, se observa una diferencia significativa entre 80°C y 140°C , lo que indica una menor eficiencia en la solubilización de lignina a temperaturas más altas, debido a fenómenos de recondensación o formación de complejos resistentes.

Esta tendencia concuerda con lo reportado por Gómez-Urios et al. [23] quienes demostraron que la polaridad y la estructura funcional de los NADES basados en cloruro de colina condicionan la interacción con la lignina, explicando asimismo que una estructura de HBD inadecuada puede favorecer la formación de enlaces estables, limitando su solubilización bajo tratamientos térmicos intensos.

Se concluye que la elección del HBD es determinante para la eficiencia en la eliminación de lignina cuando se emplea cloruro de colina como base aceptora de hidrógeno. Además, rangos superiores a 120°C no siempre garantizan una eliminación adicional de lignina sin comprometer la recuperación de la fracción de celulósica.

4.6. EFECTO DEL TIEMPO DE REACCIÓN: ESTUDIO CINÉTICO

En este apartado se analiza la variación en la composición de la piel de cebolla a lo largo del tiempo de tratamiento, considerando dos combinaciones de NADES: cloruro de colina:ácido tartárico y betaína:ácido tartárico. Ambas mezclas se evaluaron bajo condiciones fijas de 120°C , con tiempos de reacción de 1, 2, 4 y 6 horas, manteniendo una relación molar de 1:2 (HBA:HBD) y una relación de NADES:cebolla 10:1 (2 g de cebolla por 20 g de NADES).

4.6.1. Evolución de la fracción celulósica

En la Figura 9 se presentan los resultados sobre la evolución del contenido de celulosa en función del tiempo de reacción, empleando dos combinaciones de NADES: cloruro de colina:ácido tartárico y betaína:ácido tartárico.

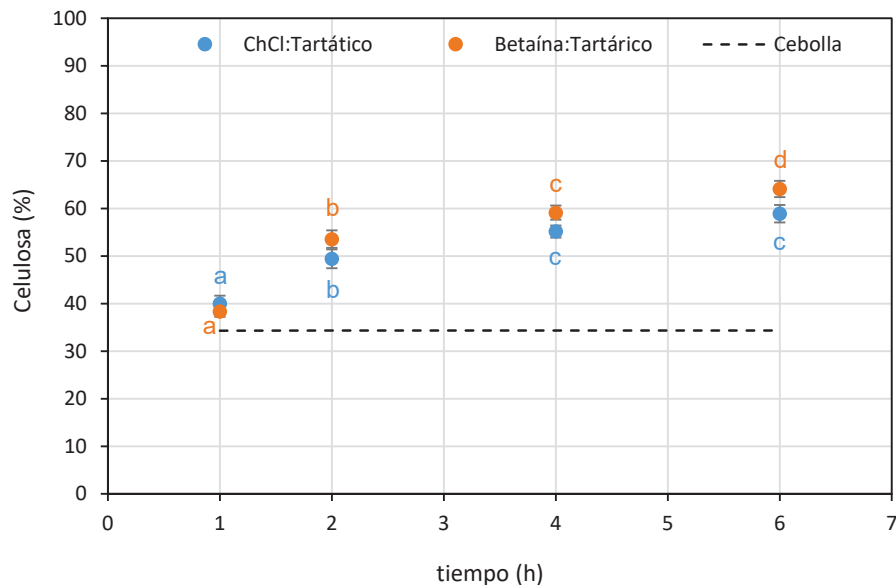


Figura 9. Evolución del contenido de celulosa de la piel de cebolla tratada con cloruro de colina:ácido tartárico y betaína:ácido tartárico (120 °C, 1 – 6 h, 10:1). Letras distintas: diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La Figura 9 muestra la variación tras pasa el tiempo del contenido de celulosa. Observándose que, para ambas mezclas el contenido de celulosa se incrementa de forma sostenida conforme aumenta el tiempo de reacción. En el caso de la mezcla de cloruro de colina:ácido tartárico, la celulosa pasó de $40,0 \pm 1,7\%$ tras 1 hora, hasta $58,9 \pm 1,8\%$ después de 6 horas de tratamiento. De manera similar, la combinación de betaína:ácido tartárico mostró una tendencia ascendente, alcanzando un máximo de $64,1 \pm 1,7\%$. Es por ello, que el análisis estadístico confirma la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0,05$) a lo largo del tiempo, como lo evidencia la separación en grupos homogéneos (a,b,c) para cloruro de colina y (a,b,c,d) betaína, respectivamente. Es decir, que la hidrólisis como a su vez la eliminación de fracciones celulósicas y lignínicas alcanzan un límite operativo, por el cual el tratamiento no produce mejoras significativas en el enriquecimiento de celulosa. La tendencia concuerda con lo reportado por Raza et al. [20], quienes evaluaron una relación de NADES a base de cloruro de colina y ácido fórmico (1:2 relación molar) sobre residuos de la palmera de dátil, con un pretratamiento a 60 °C durante 1 hora y una relación de NADES:biomasa de 10:1. A partir de ello, lograron incrementar la fracción celulósica del 44 % hasta un 72 %, y reducir la lignina de un 32 % a un 15%. Sin embargo, concluyeron que a pasar del potencial de los NADES con ácidos dicarboxílicos, su eficiencia se puede ver afectada por fenómenos en los límites operativas o por la recondensación de la lignina. Aunque el sistema reportado por los autores empleó un ácido carboxílico distinto los resultados encontrados presentan una tendencia comparable con este trabajo.

Este resultado lleva a sugerir que extender el tiempo de reacción hasta 6 horas permite maximizar la recuperación de la celulosa, bajo las condiciones actuales, sin incrementos adicionales significativos, si bien sería necesario estudiar tiempos más largos de reacción para asegurar las tendencias observadas y que se realizarán en el futuro.

4.6.2. Evolución en la fracción de lignina total

A continuación se presenta la evolución del contenido de lignina total en la piel de cebolla a lo largo del tratamiento, evaluando las mismas condiciones de NADES en el estudio de la celulosa.

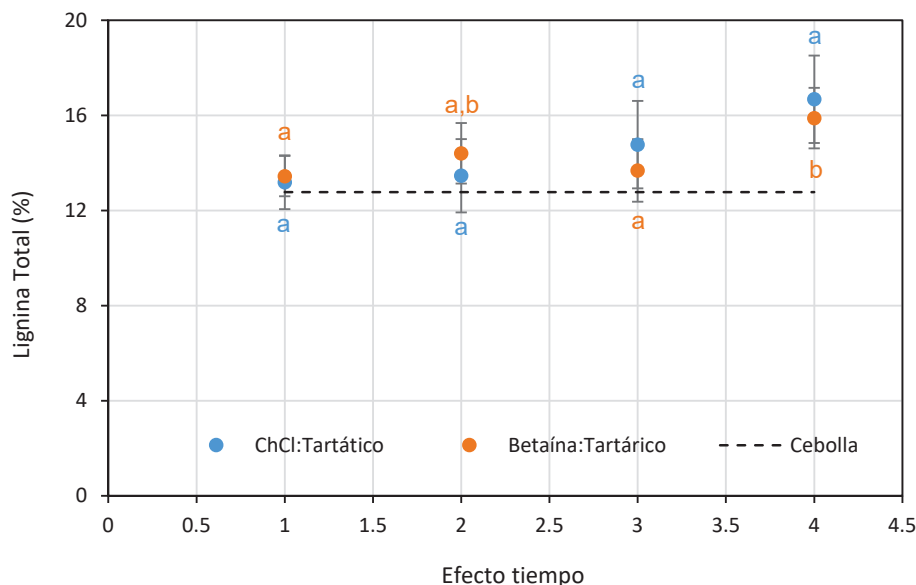


Figura 10. Evolución de la lignina total en la piel de cebolla durante el pretratamiento con cloruro de colina:ácido tartárico y betaína:ácido tartárico (120 °C, 1 – 6 h, 10:1). Letras distintas: diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

En la Figura 10 se presenta la evolución de la lignina total bajo una tendencia diferente. Para la mezcla de cloruro de colina:ácido tartárico los valores oscilaron entre $13,2 \pm 1,1\%$ y $16,7 \pm 1,8\%$, mientras que para betaína:ácido tartárico se mantuvieron entre $13,4 \pm 0,8\%$ y $15,9 \pm 1,3\%$. Aunque, se observa una rápida variación, el análisis estadístico evidencia que, en general la solubilización de lignina es menos sensible al aumento del tiempo bajo las condiciones estudiadas. Solo en el caso de betaína:ácido tartárico se observa una rápida separación de grupos en el análisis ANOVA, lo que puede indicar un efecto moderado en la eliminación de la lignina. Este resultado coincide con Raj et al. [21] quienes destacan que tiempos prolongados no generan mejoras adicionales significativas en sistemas eutécticos profundos optimizados.

Cabe destacar que, a pesar de esta estabilización, podría haberse planteado una ampliación del tiempo de operación mayor a 6 horas con el fin de verificar la ausencia de cambios posteriores. Sin embargo, los resultados obtenidos en el laboratorio permiten determinar que bajo las condiciones ensayadas, se alcanza el rendimiento máximo de enriquecimiento celulósico sin necesidad de prolongar innecesariamente el tiempo de reacción. Sin embargo, se concluye que, las 6 horas de pretratamiento resultaron insuficientes para confirmar la estabilización del sistema, siendo necesario realizar experimentos adicionales que puedan permitir explorar tiempos superiores y mejorar la eficiencia en la solubilización de ambos componentes.

5. CONCLUSIONES

Los resultados indican una estrategia tipo "screening", en la que se estudió el uso de diferentes formulaciones de disolventes eutécticos naturales (NADES) en el pretratamiento de la piel de cebolla. A través de análisis de variables clave, como la selección del HBA/HBD, la relación NADES:cebolla, el tiempo de tratamiento y temperatura.

Las mezclas de betaína y ácido tartárico, resultó la formulación más eficaz para alcanzar los niveles altos de celulosa que partió de un 34,4% como materia prima hasta lograr un 64,4%, lo cual indica la viabilidad de los NADES como agentes de hidrólisis selectiva. Por su parte se determinó que, una relación de NADES:cebolla de 10:1 (g:g) y con un tiempo de operación largos de 6 horas son adecuados para lograr el enriquecimiento celulósico. Pero se evidenció que, la lignina total no alcanzó un grado óptimo de reducción en ese intervalo, por lo que es recomendable realizar evaluaciones de tiempos más prolongados.

No obstante, el análisis estadístico permitió confirmar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según las condiciones predeterminadas, destacando temperaturas aproximadas a los 120 °C son adecuadas para enriquecer la celulosa y tiempos de operación largos, sin comprometer su integridad

Con este enfoque fue posible confirmar el gran potencial que tienen los NADES como agentes de pretratamiento para biomasa, destacando su aplicación en procesos de revalorización en residuos agroindustriales. Además, sienta una base sólida para futuros estudios orientados a la obtención de materiales nanocelulósicos que puedan incorporarse en sectores industriales bajo los principios de sostenibilidad y economía circular.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Hernández Manchado, "Extracción con agua subcrítica y ultrafiltración para la obtención de pecto-oligosacáridos a partir de residuos de piel cebolla," 2023, Accessed: Jun. 18, 2025. [Online]. Available: <http://hdl.handle.net/10259/9132>
- [2] M. He, Y. Sun, and B. Han, "Green Carbon Science: Scientific Basis for Integrating Carbon Resource Processing, Utilization, and Recycling," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 52, no. 37, pp. 9620–9633, Sep. 2013, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201209384>.
- [3] P. Kalhor and K. Ghandi, "Deep Eutectic Solvents for Pretreatment, Extraction, and Catalysis of Biomass and Food Waste," *Molecules*, vol. 24, no. 22, 2019, doi: 10.3390/molecules24224012.
- [4] Y. T. Tan, A. S. M. Chua, and G. C. Ngoh, "Deep eutectic solvent for lignocellulosic biomass fractionation and the subsequent conversion to bio-based products – A review," *Bioresour Technol*, vol. 297, p. 122522, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122522>.
- [5] B. Salgado, L. Monteiro, and N. Rocha, "Allium species poisoning in dogs and cats," *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, vol. 17, pp. 4–11, Jun. 2011, doi: 10.1590/S1678-91992011000100002.
- [6] Ó. Benito-Román, R. Melgosa, A. E. Illera, M. T. Sanz, and S. Beltrán, "Kinetics of extraction and degradation of pectin derived compounds from onion skin wastes in subcritical water," *Food Hydrocoll*, vol. 153, 2024, doi: 10.1016/j.foodhyd.2024.109957.
- [7] J. Mamilla, U. Novak, M. Grilc, and B. Likozar, "Natural deep eutectic solvents (DES) for fractionation of waste lignocellulosic biomass and its cascade conversion to value-added bio-based chemicals," *Biomass Bioenergy*, vol. 120, p. 417, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.biombioe.2018.12.002.
- [8] A. Paiva, R. Craveiro, I. Aroso, M. Martins, R. L. Reis, and A. Duarte, "Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century," *ACS Sustain Chem Eng*, vol. 2, pp. 1063–1071, Jun. 2014, doi: 10.1021/sc500096j.

- [9] Naciones Unidas, “Objetivos de Desarrollo Sostenible.” Accessed: Jun. 26, 2025. [Online]. Available: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/>
- [10] C. L. Yiin, Y. Suzana, A. Quitain, and Y. Uemura, “Physicochemical Properties of Low Transition Temperature Mixtures in Water,” *Chem Eng Trans*, vol. 45, pp. 1525–1530, Jun. 2015, doi: 10.3303/CET1545255.
- [11] N. M. Baheg, A. Abdel-Hakim, A. E.-A. A. El-Wakil, M. Mekewi, and S. Halim, “Development of Novel Natural Deep Eutectic Solvent for Cellulose Nanofibrillation of Orange Peel via New Surface Functionalization,” *ACS Sustain Chem Eng*, vol. 11, no. 40, pp. 14793–14806, Oct. 2023, doi: 10.1021/acssuschemeng.3c04922.
- [12] M. C. N. Picot-Allain and M. N. Emmambux, “Isolation, Characterization, and Application of Nanocellulose from Agro-industrial By-products: A Review,” *Food Reviews International*, vol. 39, no. 2, pp. 941–969, 2023, doi: 10.1080/87559129.2021.1928689.
- [13] A. García, A. Gandini, J. Labidi, N. Belgacem, and J. Bras, “Industrial and crop wastes: A new source for nanocellulose biorefinery,” *Ind Crops Prod*, vol. 93, pp. 26–38, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.06.004>.
- [14] B. Sik, R. Székelyhidi, E. Lakatos, and Z. Ajtony, “Using natural deep eutectic solvents for the extraction of antioxidant compounds from cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruits,” *Green Analytical Chemistry*, vol. 11, p. 100154, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.greeac.2024.100154>.
- [15] A. Sattlewal, R. Agrawal, S. Bhagia, J. Sangoro, and A. J. Ragauskas, “Natural deep eutectic solvents for lignocellulosic biomass pretreatment: Recent developments, challenges and novel opportunities,” *Biotechnol Adv*, vol. 36, no. 8, pp. 2032–2050, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.08.009>.
- [16] P. Kalhor and K. Ghandi, “Deep Eutectic Solvents for Pretreatment, Extraction, and Catalysis of Biomass and Food Waste,” *Molecules*, vol. 24, no. 22, 2019, doi: 10.3390/molecules24224012.
- [17] M. F. Syakir Bahazin, N. I. Amalin Mohd Isa, N. A. Natasha Mohd Azlan, M. R. Anuar, K. F. Pa’ee, and T.-L. Kelly Yong, “Valorization of oil palm Biomass: Investigating ChCl:Lactic Acid deep eutectic solvents for efficient furfural production,” *Biomass Bioenergy*, vol. 200, p. 107971, 2025, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2025.107971>.
- [18] T. Xiao *et al.*, “Recent progress in deep eutectic solvent(DES) fractionation of lignocellulosic components : A review,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 192, p. 114243, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.114243>.
- [19] Á. Lobato-Rodríguez, B. Gullón, A. Romani, P. Ferreira-Santos, G. Garrote, and P. G. Del-Río, “Recent advances in biorefineries based on lignin extraction using deep eutectic solvents: A review,” *Bioresour Technol*, vol. 388, p. 129744, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129744>.
- [20] M. Raza, L. Ali, M. Altarawneh, and B. Abu-Jdayil, “Evaluation of thermal pyrolysis characteristics and kinetic parameters of cellulose extracted from date waste using

- natural deep eutectic solvent,” *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, vol. 10, p. 100796, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2024.100796>.
- [21] T. Raj and V. Singh, “Natural deep eutectic solvents (NADES) assisted deconstruction of oilcane bagasse for high lipid and sugar recovery,” *Ind Crops Prod*, vol. 210, p. 118127, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118127>.
- [22] I. M. Aroso, A. Paiva, R. L. Reis, and A. R. C. Duarte, “Natural deep eutectic solvents from choline chloride and betaine – Physicochemical properties,” *J Mol Liq*, vol. 241, pp. 654–661, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.06.051>.
- [23] C. Gomez-Urios, P. Puchades-Colera, A. Frigola, M. J. Esteve, J. Blesa, and D. Lopez-Malo, “Natural deep eutectic solvents: A paradigm of stability and permeability in the design of new ingredients,” *J Mol Liq*, vol. 412, p. 125864, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.125864>.