



UNIVERSIDAD DE BURGOS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
**GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**  
**TRABAJO DE FIN DE GRADO**  
Curso 2025-2026

**Estudio de la recuperación de ácido láctico a partir  
de hidrolizados de rastrojo de maíz mediante un  
proceso de ultrafiltración asistida con niosomas**

*Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos*

*Área de Ingeniería Química*

Tutora: María Olga Ruiz Pérez

**Noelia Fernández Pozos**  
**Marzo 2026**

## ÍNDICE:

<b>1.- ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>2.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>3.- OBJECTIVES .....</b>	<b>5</b>
<b>4.- PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>5</b>
4.1.- PRODUCTOS QUÍMICOS Y MATERIALES.....	5
4.2.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	6
4.2.1. Preparación de los niosomas.....	6
4.2.2. Experimentos de extracción con los niosomas formulados .....	6
4.2.3. Experimentos de ultrafiltración asistida con niosomas de Span 60 .....	7
4.2.4. Experimentos con el hidrolizado de agua subcrítica .....	9
<b>4.3.- MÉTODOS ANALÍTICOS.....</b>	<b>10</b>
4.3.1. Determinación de la concentración de los ácidos orgánicos .....	10
4.3.2. Determinación del potencial zeta de los niosomas .....	11
4.3.3. Distribución de tamaño de partícula de los niosomas.....	11
4.3.4. Determinación del pH.....	11
4.3.5. Análisis estadístico .....	11
<b>5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>11</b>
5.1.- RESULTADOS DE LA PREPARACIÓN DE LOS NIOSOMAS .....	12
5.2.- EXTRACCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO CON LOS NIOSOMAS FORMULADOS .....	14
5.3.- RESULTADOS DE SELECTIVIDAD.....	15
5.4.- RESULTADOS DE LA ULTRAFILTRACIÓN CON NIOSOMAS DE SPAN 60.....	16
5.5.- RESULTADOS CON EL HIDROLIZADO DE RASTROJO DE MAÍZ .....	18
<b>6.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>20</b>
<b>7.- AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>21</b>
<b>8.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>21</b>

## 1.- ABSTRACT

This study investigates the recovery and purification of lactic acid from corn stover subcritical water hydrolysates using a hybrid separation process based on niosome-assisted ultrafiltration. Agricultural residues such as corn stover represent abundant lignocellulosic biomass that can be valorised to produce high-value chemicals within a more sustainable biorefinery framework. However, hydrolysates generated during thermochemical treatment contain complex mixtures of organic acids and degradation products, making selective separation of lactic acid challenging. In this work, different sorbitan-based niosomes were formulated using Span 60, Span 80 and Tween 80, and their physicochemical properties were characterized through particle size distribution and zeta potential measurements. Ultrasonication time strongly influenced vesicle formation, and stable systems were obtained after approximately 45 minutes of treatment. Encapsulation experiments performed with synthetic solutions showed that the non-dissociated form of lactic acid exhibited higher encapsulation efficiencies than the lactate form, particularly for Span 60-based niosomes. The influence of competing organic acids such as formic and acetic acids was also evaluated, revealing a decrease in selectivity under multicomponent conditions.

Niosome-assisted ultrafiltration experiments were subsequently conducted using Span 60 niosomes and a tubular ceramic membrane with both synthetic and real corn stover hydrolysate. Process performance was assessed through permeate flux and retention factors for the different organic acids. Results showed that operational parameters such as pH and contact time significantly affected separation efficiency. Acidic conditions favoured higher retention due to increased encapsulation of the protonated acid species, while longer contact times up to 1.5 h did not modify retention values, indicating that this contact time was sufficient to reach equilibrium between the continuous phase and the niosomal vesicles.

Overall, the results demonstrate that niosome-assisted ultrafiltration constitutes a promising solvent-free for the recovery of lactic acid from lignocellulosic hydrolysates, contributing to the development of sustainable biomass valorisation processes within future biorefineries and circular bioeconomy systems.

**Keywords:** lactic acid purification; sorbitan-based niosomes; encapsulation efficiency; crossflow ultrafiltration; corn stover; subcritical water hydrolysis.

## 2.- INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el uso intensivo de recursos fósiles ha generado importantes desafíos en los ámbitos energético, ambiental y económico. Aunque estos recursos han promovido un notable desarrollo tecnológico e industrial, su carácter no renovable y el impacto asociado a su extracción y transformación han impulsado la búsqueda de alternativas más sostenibles [1]. En este contexto, las materias primas lignocelulósicas han adquirido un creciente interés, ya que constituyen recursos ampliamente disponibles, principalmente en forma de residuos agrícolas, y representan una fuente abundante de biomasa renovable susceptible de valorización para la obtención de compuestos de alto valor añadido, contribuyendo además a la reducción del impacto ambiental asociado a su gestión [2,3].

Un ejemplo concreto de esta estrategia es la valorización de los rastrojos de maíz, que constituyen los subproductos generados tras la cosecha y están formados principalmente por tallos y hojas. La producción mundial de maíz supera los 1100 millones de toneladas anuales [4,5], mientras que en España se alcanzan cifras superiores a los 3 millones de toneladas [6,7]. Esta elevada producción implica la generación de grandes cantidades de residuos agrícolas, ya que por cada tonelada de grano obtenida se producen entre 1,0 y 1,3 toneladas de rastrojo de maíz [8]. Como resultado, se generan varios millones de toneladas de rastrojo de maíz susceptibles de ser aprovechadas como biomasa de segunda generación. El interés en este recurso se debe principalmente a su composición, caracterizada por un alto contenido en polisacáridos estructurales, que representan aproximadamente entre el 50 y el 70 % de su peso seco, destacando la celulosa (35-45 %) como el polisacárido mayoritario [9].

El compuesto objeto de estudio en este trabajo es el ácido láctico ( $C_3H_6O_3$ ). Este ácido es uno de los ácidos orgánicos más relevantes a nivel industrial debido a su amplia gama de aplicaciones. Se trata de un  $\alpha$ -hidroxiácido descubierto en 1780 por Carl Wilhelm Scheele [10] y posteriormente vinculado a los procesos fermentativos gracias a los estudios de Louis Pasteur sobre bacterias ácido-lácticas. Desde su producción industrial a finales del siglo XIX, su importancia ha crecido de forma constante en sectores como el alimentario, químico, farmacéutico y cosmético. En la industria alimentaria destaca por su papel como acidulante, regulador de pH y conservante, contribuyendo a la estabilidad microbiológica, al desarrollo del sabor y a la prolongación de la vida útil [11]. En el ámbito farmacéutico y biomédico se emplea como regulador del pH, electrolito en soluciones intravenosas y de diálisis, intermediario quirral y componente de biomateriales reabsorbibles, como suturas y dispositivos médicos [12]. En la industria química, actúa como acidulante, agente desincrustante, y precursor de otros compuestos de alto valor añadido, especialmente del ácido poliláctico (PLA), un bioplástico biodegradable cuyo crecimiento ha impulsado notablemente la demanda mundial de ácido láctico en las últimas décadas [11-13].

El ácido láctico puede obtenerse por síntesis química o mediante fermentación, siendo esta última la vía industrial preferida en el marco de la química sostenible debido a su menor impacto ambiental. No obstante, este proceso fermentativo industrial se basa en el uso de azúcares refinados (glucosa, sacarosa o lactosa) o biomasas de primera generación (melazas, jarabes de maíz, lactosuero, entre otros) que pueden destinarse a la alimentación humana o animal. Esta circunstancia genera competencia con la cadena alimentaria y contribuye al incremento de los costes de producción [14].

En este contexto, el mercado global ha experimentado un aumento sostenido desde principios del siglo XXI, con Estados Unidos y China como principales consumidores y productores, y con un interés creciente en optimizar la producción de ácido láctico a partir de materias primas renovables, tales como los residuos agrarios de rastrojo de maíz (biomasa de segunda generación), con la finalidad de mejorar la sostenibilidad y competitividad del proceso industrial [15]. Por otra parte, la biomasa lignocelulósica, compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina, presenta una estructura compleja y altamente resistente a la degradación, que dificulta el acceso a los polisacáridos fermentables. Esta característica hace necesario aplicar etapas de pretratamientos físicos, químicos, y/o enzimáticos, con el fin de liberar los azúcares fermentables. No obstante, estos pretratamientos pueden generar subproductos derivados de la degradación de los carbohidratos y de la lignina que actúan como inhibidores en etapas posteriores del proceso. En consecuencia, suele presentar mayores dificultades operativas y, en muchos casos, incluso tras la aplicación de estos procesos, los rendimientos de productividad obtenidos continúan siendo inferiores a los alcanzados con biomasa de primera generación [16].

En los últimos años, los procesos hidrotérmicos, y en particular la hidrólisis en agua subcrítica, se han consolidado como tecnologías eficientes para el tratamiento de biomasa lignocelulósica [17,18]. El agua subcrítica se define como agua en estado líquido a temperaturas comprendidas entre 100 °C y 374 °C, sometida a presión suficiente para evitar su vaporización. Bajo estas condiciones, el agua presenta una disminución de su constante dieléctrica y un incremento de su producto iónico, lo que mejora su capacidad como medio reactivo y favorece reacciones de hidrólisis sin necesidad de añadir grandes cantidades de catalizadores externos [18].

De este modo, el tratamiento con agua subcrítica permite, en una única etapa, la alteración de la estructura lignina-carbohidrato, la solubilización y fragmentación de los polisacáridos (celulosa y hemicelulosa), así como la conversión de los azúcares generados en ácido láctico [9]. Como resultado, el hidrolizado obtenido a partir de los residuos de rastrojo de maíz es una disolución acuosa compleja, que contiene ácido láctico junto con diversas impurezas. Entre ellas destacan otros ácidos orgánicos de bajo peso molecular (principalmente los ácidos acético y fórmico), compuestos solubles derivados de la degradación parcial de la lignina y productos de degradación secundaria de los azúcares tales como furfural y 5-hidroximetilfurfural [9].

La etapa de purificación del ácido láctico puede constituir una de las fases más críticas del proceso, ya que el valor de mercado del producto final aumenta significativamente con su grado de pureza. No obstante, la separación selectiva del ácido láctico a partir de estos hidrolizados representa un desafío significativo debido a la complejidad de la matriz y a la presencia de múltiples compuestos con propiedades fisicoquímicas similares [19]. Los métodos convencionales de separación, como la extracción con disolventes, la destilación reactiva o los procesos de intercambio iónico con resinas poliméricas, pueden implicar elevados costes energéticos, consumo de reactivos químicos y generación de múltiples corrientes residuales secundarias [19-21]. Por ello, resulta de gran interés el desarrollo de estrategias de separación alternativas, más sostenibles, sin uso de disolventes orgánicos y adsorbentes sólidos.

En este contexto, el proceso de ultrafiltración asistida con niosomas constituye una estrategia de separación híbrida que combina la encapsulación de solutos en vesículas coloidales con la separación mediante membranas [22]. En este proceso, determinadas moléculas presentes en la disolución pueden quedar atrapadas dentro de los niosomas, formando agregados de tamaño mucho mayor que el de las especies libres. De este modo, aunque el soluto tenga un peso molecular bajo, puede ser retenido por la membrana de ultrafiltración al encontrarse asociado a estas vesículas, mientras que las especies de bajo peso molecular que no están encapsuladas atraviesan fácilmente los poros de la membrana (Figura 1). Este enfoque permite transformar una separación basada únicamente en el tamaño molecular en un proceso selectivo asistido por partículas coloidales, lo que resulta especialmente interesante para la recuperación de compuestos a partir de disoluciones acuosas multicomponente complejas.

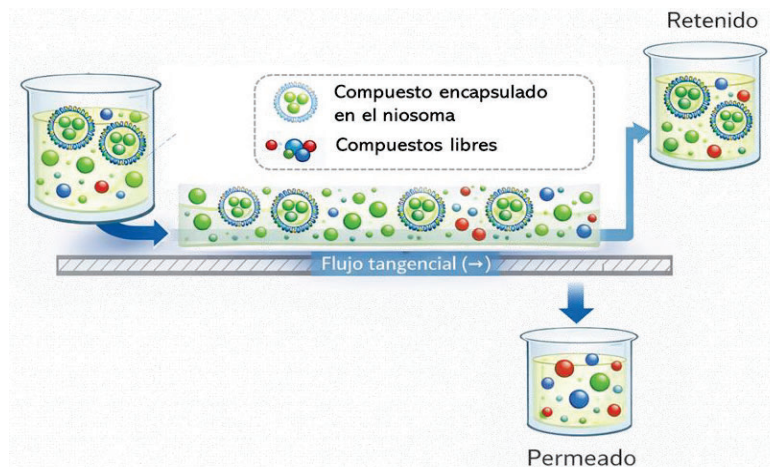


Figura 1. Esquema de separación del proceso híbrido de ultrafiltración asistida con niosomas.

Los niosomas (Figura 2) han surgido como sistemas vesiculares prometedores en aplicaciones de encapsulación de compuestos bioactivos y de separación selectiva de solutos en disoluciones diluidas [23]. Se trata de vesículas bilaminares formadas por tensioactivos no iónicos que presentan una organización anfífilica en la que las cadenas hidrofóbicas del tensioactivo se orientan hacia el interior formando una bicapa, mientras que las cabezas polares permanecen en contacto con el medio acuoso. Esta disposición da lugar a una vesícula cerrada con un núcleo acuoso interno capaz de encapsular compuestos hidrofílicos, y una bicapa vesicular en el que pueden incorporarse moléculas moderadamente hidrofóbicas [23-25]. Debido a esta organización, los niosomas presentan propiedades similares a las de los liposomas; además suelen presentar mayor estabilidad química y menor coste de producción [23,24].

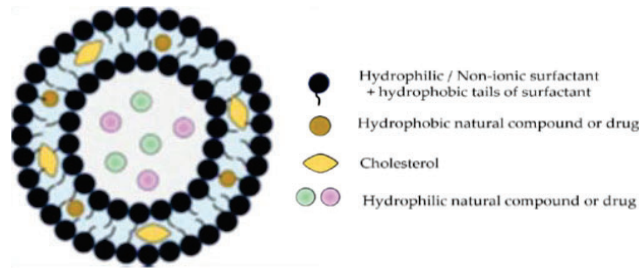


Figura 2. Estructura de un niosoma [26].

El fundamento fisicoquímico de este proceso de encapsulación se basa en la interacción diferencial de las especies presentes en la disolución con la bicapa vesicular y el compartimento acuoso interno. En el caso del ácido láctico ( $pK_a \approx 3,86$ ), el equilibrio ácido-base determina la presencia de la forma no disociada (HL) o de la forma ionizada (lactato,  $L^-$ ), dependiendo del pH del medio. De forma teórica, la especie ionizada (lactato), debido a su carácter cargado y mayor carácter hidrofílico, presenta una baja permeabilidad a través de la bicapa; no obstante, puede asociarse a las vesículas mediante interacciones con los grupos polares de los tensioactivos. Por otra parte, la forma no disociada, al ser eléctricamente neutra y menos polar, presenta mayor afinidad por entornos hidrofóbicos y puede difundir parcialmente a través de la bicapa por difusión pasiva. En determinadas condiciones, si existe un gradiente de pH entre la fase acuosa exterior y la del interior del niosoma, puede producirse un fenómeno conocido como *ion trapping*, en el cual la especie neutra del ácido difunde al interior de la vesícula y posteriormente se ioniza en el núcleo, quedando retenida en este compartimento interno del niosoma [23,24].

Como consecuencia de estos fenómenos de partición y difusión, puede establecerse un equilibrio de distribución del soluto entre la fase acuosa externa, la bicapa vesicular y el núcleo acuoso interno. Este comportamiento permite que una fracción del ácido láctico quede asociada a las vesículas, ya sea en el núcleo acuoso o mediante interacciones con las regiones polares de la bicapa vesicular. Esto conlleva que la eficiencia de encapsulación dependa de diversos parámetros fisicoquímicos, entre los que destacan el pH del medio, el tamaño vesicular y la estabilidad coloidal del sistema [24-28]. En particular, vesículas de tamaño nanométrico presentan una mayor superficie específica disponible para la interacción con los solutos y favorecen una cinética de intercambio más rápida. Asimismo, el potencial zeta ( $\zeta$ ) constituye un parámetro clave para evaluar la estabilidad coloidal de la dispersión, considerándose generalmente que valores absolutos superiores a  $|30|$  mV indican una adecuada repulsión electrostática entre partículas y una menor tendencia a la agregación [27, 28].

En cuanto a la ultrafiltración, las membranas se presentan como una alternativa especialmente atractiva desde el punto de vista operativo [22]. Estas membranas generalmente fabricadas a partir de materiales inorgánicos como óxidos metálicos (por ejemplo, alúmina, titanía o zirconia), presentan una elevada resistencia química, lo que les permite operar en condiciones extremas de pH. Además, su menor tendencia a la adsorción de compuestos orgánicos en los poros reduce el ensuciamiento irreversible, lo que favorece su aplicación en el tratamiento de corrientes complejas como los hidrolizados lignocelulósicos. Esto permite minimizar las paradas para limpieza, mantener elevados valores de filtrabilidad y prolongar la vida útil de las membranas [29].

Por tanto, el proceso de obtención y purificación estudiado en este trabajo se llevó a cabo mediante un sistema integrado que combina el tratamiento con agua subcrítica con la separación mediante membranas. La integración de las etapas de hidrólisis y separación constituye una alternativa viable para la producción de ácido láctico, al permitir la valorización de rastrojos de maíz como materia prima renovable. Asimismo, el empleo de agua subcrítica, membranas y niosomas refuerza el carácter sostenible del proceso, al reducir la necesidad de disolventes orgánicos y reactivos químicos. En conjunto, esta estrategia constituye una

alternativa tecnológica innovadora y alineada con los principios de la química sostenible, orientada a la obtención y purificación eficiente de ácido láctico a partir de biomasa residual.

### 3.- OBJECTIVES

The main objective of this work was to develop and investigate a niosome-assisted ultrafiltration process, using multichannel tubular ceramic membranes, for the separation of lactic acid from corn stover subcritical water hydrolysates. To accomplish this objective, the following specific objectives were addressed:

1. To develop experimental protocols for analytical measurements, niosome preparation by ultrasonication, ultrafiltration system operation, and membrane cleaning.
2. To experimentally identify the main organic acids and other relevant compounds present in the corn stover subcritical water hydrolysate.
3. To select the most suitable surfactants and formulation conditions for lactic acid separation based on a literature review of niosome technology.
4. To evaluate the influence of ultrasound time and formulation composition on the hydrodynamic size and stability of niosomes prepared with different sorbitan surfactants (Span 60, Span 80 and Tween 80).
5. To assess the encapsulation capacity and selectivity of different niosome formulations for the separation of organic acids (lactic, formic, and acetic acids).
6. To analyse permeation rates and retention factors during the niosome-assisted ultrafiltration using both synthetic and corn stover hydrolysates, investigating the influence of the pH and niosome concentration on fractionation performance.

### 4.- PARTE EXPERIMENTAL

#### 4.1.- PRODUCTOS QUÍMICOS Y MATERIALES

Las disoluciones acuosas sintéticas se prepararon a partir de lactato cálcico pentahidratado (99 %, Scharlau), ácido láctico (72 %, Sigma-Aldrich), ácido acético (99,8 %, VWR Chemicals) y ácido fórmico (98 %, Panreac).

El hidrolizado de residuos de maíz (denominado HRM en este trabajo), suministrado por el grupo BIOIND del área de Ingeniería Química de la Universidad de Burgos, presentó un pH de  $6,6 \pm 0,1$  y un contenido total de materia orgánica de 18,2 g/L, con  $11,2 \pm 0,1$  g/L de ácido láctico,  $1,1 \pm 0,3$  g/L de ácido fórmico,  $2,3 \pm 0,5$  g/L de ácido acético. El HRM se obtuvo siguiendo el protocolo propuesto por Candela y col. [9] que se describe brevemente a continuación. Los residuos agrícolas de tallos y hojas de maíz proporcionados por agricultores de Saldaña (Palencia) se secaron a temperatura ambiente y se molieron (Retsch SM100) hasta un tamaño de partícula inferior a 2 mm para su uso como biomasa lignocelulósica. Esta biomasa se trató con agua subcrítica a 260 °C y 80 bar durante 210 minutos. La relación biomasa/agua en el reactor fue del 5 % p/v, y se empleó hidróxido de calcio 0,3 M como catalizador (aproximadamente 2 % p/v). Tras este tratamiento, la suspensión se filtró a temperatura ambiente y la fase líquida constituyó el HRM que se almacenó a -20 °C hasta su utilización en los ensayos de ultrafiltración asistida con niosomas.

El pH del HRM y de las disoluciones acuosas se ajustó empleando ácido clorhídrico (37 %, EMSURE, Supelco) e hidróxido de calcio (95 %, Panreac).

Los patrones para el análisis por HPLC incluyeron ácido glicólico (98 %) y ácido propiónico (99 %) de Tokyo Chemical Industry (TCI); glucosa (99 %), xilosa (99 %), furfural (99 %), gliceraldehído (98 %) y glicolaldehído (98 %) de Sigma-Aldrich; 5-hidroximetilfurfural (97 %) de Alfa Aesar; y 1,3-dihidroxiacetona (95 %) e hidroxiacetona (95 %) de Fluorochem y ThermoScientific, respectivamente. La fase móvil se preparó utilizando ácido trifluoroacético (98 %, Sigma-Aldrich).

Los tensioactivos no iónicos utilizados para la preparación de los niosomas fueron monoestearato de sorbitano (Span 60,  $C_{24}H_{46}O_6$ , E-491,  $430,63 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 99 %), monooleato de sorbitano (Span 80,  $C_{24}H_{44}O_6$ , E-494,  $428,6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 99 %) y monooleato de sorbitán polioxi-etileno (Tween 80,  $C_{64}H_{124}O_{26}$ , E-433,  $1310 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 98 %), todos ellos suministrados por Sigma-Aldrich.

Para la limpieza química de la membrana se utilizaron ácido fosfórico (85 %, Sigma-Aldrich) e hidróxido de sodio (98 %, Labkem). En todos los experimentos y para preparar todas las disoluciones acuosas se empleó agua ultrapura obtenida mediante un sistema Milli-Q (Millipore).

Otros materiales empleados en este estudio fueron: balanza analítica (Precisa 125 A), pH-metro (Crison GLP 22), centrifuga (Eppendorf, centrifuge 5804), agitador orbital (New Brunswick Scientific, Model G25), tanque de vidrio de 200 y 500 mL (Pobel), matraces aforados, vasos de precipitado, matraces Erlenmeyer con tapón roscado, agujas desechables (100 Sterican, B Braun de 0,80 x 40 mm), jeringuillas (Injekt Luer Solo, B Braun 2 mL $\pm$ 0,1), filtros de jeringa de polipropileno (Scharlau, 13 mm 0,22  $\mu$ m), filtros de ultracentrifugación Amicon MWCO 3 kDa de 4 y 15 mL de capacidad con una membrana de celulosa regenerada (Millipore).

## 4.2.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 4.2.1. Preparación de los niosomas

Para la preparación de los niosomas se emplearon Span 80 (S80) y Span 60 (60) como agentes estructurales básicos, y Tween 80 (T80) como agente modificador de la bicapa vesicular. Los niosomas se formularon en agua Milli-Q pesando las cantidades correspondientes de tensioactivo en una balanza analítica ( $\pm$ 0,001 g), y añadiendo posteriormente agua Milli-Q hasta alcanzar un volumen final de 100 mL ( $\pm$ 1 mL). Se prepararon cuatro mezclas diferenciadas, denominadas fases pre-niosomas (Figura 3A). La primera fase pre-niosoma estuvo compuesta por 20 mM de S60; la segunda, por 20 mM de S80; la tercera, de 20 mM de S60 y 4 mM de T80; y la cuarta, por 20 mM de S80 y 4 mM de T80. Las fases pre-niosomas se prepararon 24 horas antes de su utilización para asegurar una adecuada hidratación y relajación de las cadenas carbonatadas de las estructuras moleculares.

Seguidamente, los niosomas se prepararon por ultrasonificación directa de los 100 mL de la fase pre-niosoma en un homogeneizador de ultrasonidos (Figura 3B, Vibra-Cell VCX 500, Sonics & Materials Inc), equipado con una sonda de 13 mm de diámetro y acoplado a un baño termostático ( $\pm$  0,3 ULTRASON-S-H, J.P. SELECTA), a una temperatura de 30,0 $\pm$ 0,1 °C y con una amplitud del 30 %, aplicando pulsos alternos de 30 segundos de funcionamiento y 30 segundos de parada (30 s ON / 30 s OFF) para evitar el sobrecalentamiento de la muestra. El tiempo de ultrasonidos aplicado estuvo comprendido entre 10 y 90 minutos (5–45 minutos de tiempo efectivo). Se tomaron muestras de los niosomas recién preparados y tras 24 y 48 horas de almacenamiento a 4 °C, que fueron posteriormente analizadas para establecer las similitudes y diferencias entre los distintos tipos de niosomas formulados.

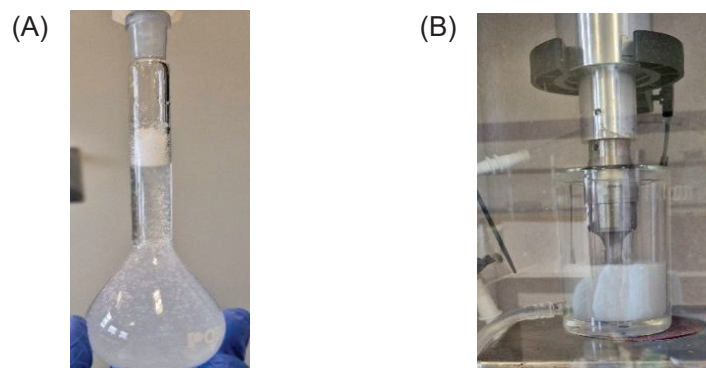


Figura 3. Fotografías (A) de la fase pre-niosomas antes de la ultrasonificación y (B) del equipo de ultrasonidos durante la preparación de los niosomas de Span 60.

### 4.2.2. Experimentos de extracción con los niosomas formulados

El estudio de extracción de ácido láctico se llevó a cabo empleando los distintos tipos de niosomas formulados y diferentes disoluciones acuosas de ácido láctico, lactato cálcico y mezclas ternarias de los ácidos láctico, fórmico y acético, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición y pH de las disoluciones de ácido láctico utilizadas como alimentación para los estudios de extracción con los distintos tipos de niosomas formulados.

Disoluciones alimentación	pH	C (g/L)		
		Ácido láctico (AL)	Ácido fórmico (AF)	Ácido acético (AA)
F1	2,6±0,2	2,1±0,1	-	-
F2	2,7±0,3	0,81±0,05	-	-
F3	2,3±0,2	1,95±0,06	2,05±0,03	2,09±0,05
F4	2,4±0,2	0,78±0,04	0,81±0,04	0,87±0,07
F5	6,6±0,3	2,1±0,09	-	-
F6	6,5±0,1	0,9±0,1	-	-

En los experimentos de extracción, se transfirieron 100 mL de cada disolución acuosa alimentación (fase continua) a matraces con tapón roscado a los que se añadieron 10 mL de niosomas (fase dispersa). Los matraces se colocaron en un agitador orbital (New Brunswick Scientific) y se mantuvieron en agitación (250 rpm) a 25 °C durante 90 minutos con el fin de favorecer el proceso de extracción. Finalizada la etapa de agitación, se tomó una muestra de 4 mL de la suspensión, y se ultracentrifugó (8000 rpm durante 10 minutos) utilizando filtros Amicon que tienen acoplada una membrana de celulosa regenerada de corte molecular de 3 kDa, lo que permitió separar los componentes libres de los niosomas. Los permeados obtenidos (ácido orgánico libre en la fase continua después de la extracción), así como las disoluciones alimentación (ácido orgánico inicial en la fase continua), se analizaron posteriormente para evaluar el rendimiento del proceso de extracción.

La cantidad de ácido orgánico extraído en los niosomas se calculó mediante el siguiente balance de materia:

$$C_{nio} V_d = (C_0 - C_{libre}) V_c \quad (1)$$

donde  $V_c$  es el volumen de fase continua,  $V_d$  es el volumen de fase dispersa (niosomas), y  $C_0$  y  $C_{libre}$  son la concentración de los ácidos orgánicos en la fase continua antes (disolución acuosa alimentación) y después de la extracción (permeado de la ultrafiltración centrífuga), respectivamente.

La eficacia de extracción (EE, %) se determinó en este trabajo como la relación entre la cantidad de ácido orgánico en los niosomas con respecto a la cantidad de ácido orgánico inicial en la disolución acuosa alimentación.

#### 4.2.3. Experimentos de ultrafiltración asistida con niosomas de Span 60

Los experimentos de ultrafiltración asistida con niosomas de S60 se llevaron a cabo utilizando una disolución acuosa sintética cuya concentración de ácidos orgánicos y pH básico reproducía la del hidrolizado HRM obtenido con agua subcrítica a partir de los residuos de maíz y denominada en el resto del trabajo como hidrolizado sintético (HS).

Como se ha comentado anteriormente, la membrana empleada fue una membrana cerámica tubular de ultrafiltración Filtanium (TAMI Industries, Figura 4A), con un corte molecular nominal (MWCO) de 10 kDa, fabricada en dióxido de titanio ( $TiO_2$ ) soportado sobre Titania y con una longitud de 25 cm, que se seleccionó experimentalmente debido a que garantizó la retención completa de los niosomas de S60. Esta membrana presenta una configuración multicanal compuesta por siete canales paralelos, con un área efectiva de filtración de 0,0132 m<sup>2</sup>, un diámetro externo total de 0,006 m y un diámetro hidráulico de canal de 0,002 m.

El equipo de ultrafiltración (Figura 4B) consta de un tanque (1) de alimentación encamisado (Pobel), de una bomba peristáltica (2) Masterflex (HV-7220-57 con un cabezal Masterflex L/S EasyLoad II HV-77201-62) que se utilizó para impulsar la alimentación desde el tanque hasta el módulo de membrana (5). El tanque de alimentación está conectado con un baño termostático de agua para poder trabajar en condiciones de temperatura (4) constante durante la ultrafiltración. Se han colocado dos manómetros (3) para medir la presión transmembrana (PTM) a la entrada y a la salida del módulo de membrana, y una válvula (6) aguas abajo del módulo de membrana para controlar el caudal de circulación y la PTM. Las corrientes,

permeado (7) y retenido (8), que abandonan el módulo de membrana pueden ser recirculadas al tanque de alimentación (1) o recogidas de forma continua en otros tanques adicionales instalados en el sistema. Las tuberías instaladas en todo el dispositivo experimental fueron tubo de silicona (Materflex L/S 15).

(A) Membrana Tami



(A) Equipo de ultrafiltración

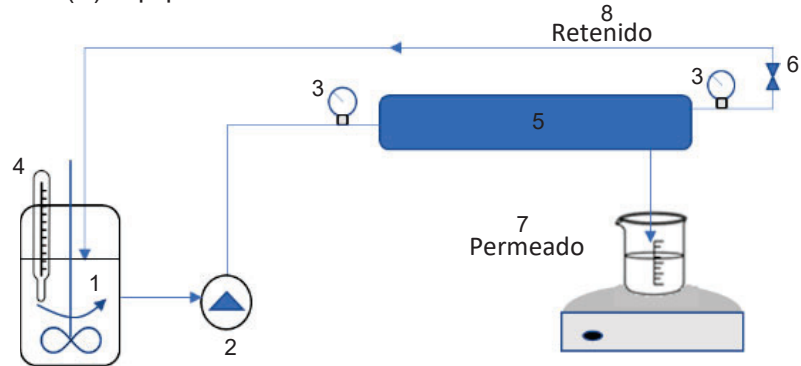


Figura 4. (A) Membrana Tami y (B) Equipo de ultrafiltración.

Los experimentos de ultrafiltración asistida con niosomas se han realizado siguiendo las tres subetapas consecutivas mostradas en la Figura 5. En la **etapa 1** (extracción), en el tanque de alimentación se introdujo la suspensión formada por 200 mL del HS a pH= 1,5, 2,5 o 3,5 (fase continua) y 20 mL de niosomas de S60 (10 % v/v, fase dispersa), manteniéndose bajo agitación durante 90 minutos o 24 horas. Seguidamente, la suspensión se recirculó por el sistema durante 5 minutos y se ajustaron la presión transmembrana (PTM) y el caudal de alimentación mediante el regulador de velocidad de la bomba y la válvula. En la **etapa 2**, se realizó una ultrafiltración en modo recirculación total durante 15 minutos, recirculándose tanto el retenido como el permeado al tanque de alimentación. Esta etapa intermedia permitió estabilizar las condiciones hidrodinámicas del sistema, así como homogeneizar la suspensión antes de iniciar la etapa de concentración.

Finalmente, en la **etapa 3**, se llevó a cabo la ultrafiltración en modo concentración, recirculándose el retenido al tanque de alimentación y retirándose el permeado de forma continua. Se dio por finalizado el proceso de concentración cuando se alcanzó un factor de reducción de volumen (FRV) de 2,2. Este factor se calculó como la relación entre el volumen inicial de suspensión introducido en el tanque ( $V_t = 220$  mL) y el volumen final del retenido ( $V_r$ ):  $FRV = V_t/V_r$ .

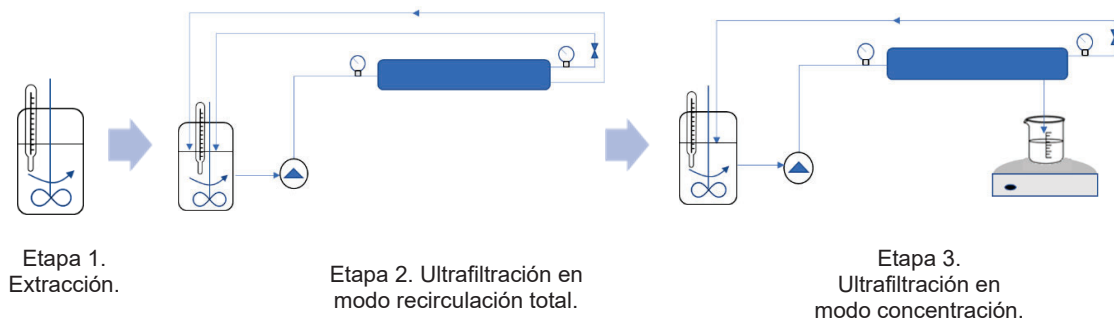


Figura 5. Esquema de las subetapas del proceso de ultrafiltración asistida con niosomas.

Con el objetivo de evaluar el efecto del pH y la duración del contacto entre las fases, se diseñaron dos tandas experimentales independientes. En el primer ensayo, se realizaron 3 experimentos para analizar el efecto del pH. Para ello, se utilizó como disolución alimentación 200 mL de HS acidificada hasta valores de pH de 1,5, 2,5, y 3,5, a los que se adicionaron una concentración de niosomas del 10% (v/v), y se mantuvieron ambas fases en contacto durante

90 minutos a 25 °C en la **etapa 1** (Figura 5). En el segundo ensayo, se estudió la influencia de la duración del contacto entre las fases: niosomas y disolución HS. Se compararon dos tiempos de contacto en la **etapa 1**, 90 minutos y 24 horas. En este caso, la concentración de niosomas se mantuvo en el 10% (v/v), y el pH del HS se fijó en 1,5. Estos dos ensayos permitieron determinar la influencia de estas dos variables operativas sobre el rendimiento de separación de los niosomas y la membrana. Todos estos experimentos se realizaron a una PTM= 1,0±0,1 bar, con un caudal de alimentación de 8,8 ± 0,5 L/h y a 25,0±0,1 °C. El flujo de permeado se determinó a lo largo de la **etapa 3** (ultrafiltración en modo concentración) mediante medidas volumétricas (±0,1 mL) y gravimétricas (±0,001 g). La densidad de flujo de permeado (J) se calculó utilizando la ecuación 2.

$$J = \frac{V_p}{A t} \quad (2)$$

donde  $V_p$  es el volumen de permeado, A el área efectiva de membrana (132 cm<sup>2</sup>) y t el tiempo de operación. El valor de J obtenido fue de 46±3 L/m<sup>2</sup> h tanto para el agua pura como para las distintas suspensiones de HS con los niosomas S60 evaluadas en este estudio.

Inmediatamente después de terminar la **etapa 3** (ultrafiltración en modo concentración), se tomó una muestra de la fase de retenido. En esta muestra, los componentes libres se separaron de los niosomas por ultrafiltración centrífuga (15 minutos, 8000 rpm) utilizando filtros Amicon MWCO 3 kDa de 15 mL. Para poder analizar el rendimiento de la operación, se midió experimentalmente el volumen de cada una de las corrientes y la concentración de los distintos compuestos en el HS alimentación ( $C_o$ ), en el permeado de la ultrafiltración centrífuga de una muestra de retenido ( $C_{libre,r}$ , ácido orgánico libre en la fase retenido), y en el permeado total ( $C_p$ ). La concentración total de cada compuesto en el retenido ( $C_r$ ) al final de la ultrafiltración se calculó utilizando el siguiente balance de materia:

$$C_r V_r = C_o V_c - C_p V_p = C_{libre,r}(V_c - V_p) + C_{nio,r}V_d \quad (3)$$

el factor de retención total (FR<sub>t</sub>, %) con la ecuación 4:

$$FR_t = \frac{\text{ácido orgánico en el retenido (g)}}{\text{ácido orgánico inicial (g)}} 100 = \frac{C_r V_r}{C_o V_c} 100 \quad (4)$$

y el factor de retención en los niosomas (FR<sub>nio</sub>, %) con la ecuación 5:

$$FR_{nio} = \frac{\text{ácido orgánico extraído en los niosomas (g)}}{\text{ácido orgánico en el retenido (g)}} 100 = 1 - \frac{C_{libre,r}(V_c - V_p)}{C_r \cdot V_r} 100 \quad (5)$$

donde  $V_c$  es el volumen de fase continua (200 mL de disolución HS),  $V_d$  es el volumen de fase dispersa (20 mL de fase niosomas),  $V_p$  es el volumen total de permeado al terminar la ultrafiltración que estuvo exento de niosomas, y  $V_r$  es el volumen total de retenido al terminar la ultrafiltración.

#### 4.2.4. Experimentos con el hidrolizado de agua subcrítica

Como última etapa experimental, se evaluó la adición de niosomas formulados con S60 al hidrolizado de rastrojo de maíz (HRM). El HRM suministrado se elaboró siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.1. En la Figura 6 se recoge la secuencia de etapas investigadas para la separación de los distintos compuestos mayoritarios presentes en este hidrolizado. En la **etapa 1**, se procedió a su acidificación mediante la adición de ácido clorhídrico hasta alcanzar un pH de 1,5±0,1, partiendo de un pH inicial de 6,6±0,1. Posteriormente, en la **etapa 2**, la muestra se mantuvo en refrigeración a 4 °C durante 0 a 4 horas con el fin de analizar su efecto en la precipitación de la materia coloidal generada por la degradación de la lignina. A continuación, en la **etapa 3**, se sometió a un proceso de centrifugación (8000 rpm durante 55 minutos) y finalmente se realizó una filtración, para recuperar la fracción líquida exenta de sólidos.

Seguidamente, en la **etapa 4** se inició el proceso híbrido de ultrafiltración asistida con niosomas variando la fracción en volumen de fase dispersa, siguiendo el mismo protocolo experimental detallado en el apartado anterior (Figuras 5 y 6). Recuerdo brevemente, a continuación, el protocolo experimental de esta **etapa 3** del proceso. En primer lugar, se pusieron en contacto ambas fases empleando una concentración de niosomas del 10 y del 30% (v/v), mezclando 200 mL del HRM con 20 o con 60 mL de niosomas, durante 90 minutos a 25 °C con una PTM de  $1,0 \pm 0,1$  bar y un caudal de alimentación de  $8,8 \pm 0,5$  L/h. Posteriormente, la suspensión se mantuvo en recirculación total a través de la membrana durante 10 minutos, con el objetivo de estabilizar el sistema. Finalmente, se llevó a cabo la ultrafiltración en modo concentración (Figura 6). Para poder examinar y comparar los rendimientos globales del proceso propuesto, se midió experimentalmente el volumen de cada una de las corrientes y la concentración de los distintos compuestos en el HRM alimentación, en el HRM acidificado, antes y después de la centrifugación, así como en el permeado y en el retenido. Además, se midió J durante la ultrafiltración en modo concentración, y se determinaron los factores de retención utilizando las ecuaciones 4 y 5.

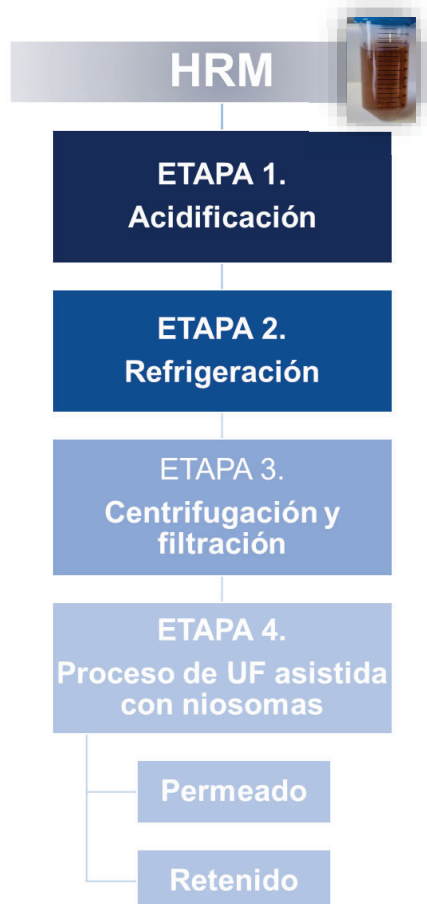


Figura 6. Esquema de las etapas empleadas para el estudio del fraccionamiento de los compuestos mayoritarios del HRM elaborado a partir de residuos de maíz en agua subcrítica.

#### 4.3.- MÉTODOS ANALÍTICOS

##### 4.3.1. Determinación de la concentración de los ácidos orgánicos

La medida de la concentración de los ácidos orgánicos y otros componentes en las alimentaciones y permeados se realizó a través de cromatografía líquida de alta resolución utilizando un HPLC-LC (Agilent Infinity II).

Este equipo consta de una columna Biorad Aminex® HPX-87 H (300 × 7,8 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). La fase móvil empleada ha sido ácido trifluoroacético 10 mM con un flujo de 0,6 mL/min.

La columna y los detectores se mantuvieron a 40 °C y el tiempo total de funcionamiento fue de 60 minutos por inyección. Todas las muestras antes de su análisis por HPLC se centrifugaron a 5000 rpm y 21 °C durante 20 minutos, y posteriormente se filtraron con filtros de jeringa de 0,22 µm de tamaño de poro (Scharlab).

La concentración de las especies protonada (AH) y aniónica (A<sup>-</sup>) de estos ácidos orgánicos se determinó con las ecuaciones 6 y 7, utilizando el valor experimental de la concentración total de ácido (C, g/L) determinada por HPLC, el pK<sub>a</sub> del ácido (pK<sub>a</sub> = 3,86; 3,75 y 4,8 para los ácidos láctico, fórmico, y acético, respectivamente) y el valor experimental del pH de las disoluciones acuosas:

$$C_{AH} = \frac{C}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad (6)$$

$$C_{A^-} = C - C_{AH} \quad (7)$$

#### 4.3.2. Determinación del potencial zeta de los niosomas

El potencial zeta (PZ, mV) de los niosomas se midió con un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.). Se realizaron sobre la misma muestra que se empleó para medir la distribución de tamaño de partícula, pero utilizando una celda capilar equipada con electrodos que permite el paso de corriente eléctrica (DTS1070, Malvern Panalytical, España). Se realizaron 3 réplicas de 11 medidas a 25 °C para cada muestra. La medida de PZ es un indicador de la estabilidad de las dispersiones coloidales, cuanto mayor sea su valor absoluto (positivo o negativo), más estables serán los niosomas formulados.

#### 4.3.3. Distribución de tamaño de partícula de los niosomas

El diámetro hidrodinámico medio (DP, nm) y el índice de polidispersidad (PDI) de los niosomas formulados se midió por la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) con el Zetasizer Nano ZS antes mencionado y empleando cubetas de polipropileno. Se realizaron 3 réplicas de 3 medidas a 25 °C para cada muestra de niosomas. El índice de polidispersidad proporciona información sobre la anchura de la distribución de tamaño de partícula, obteniendo valores comprendidos entre 0 y 1. Cuanto menor sea su valor, mayor uniformidad tendrá la fase niosoma formulada.

#### 4.3.4. Determinación del pH

El pH de todas las muestras acuosas se midió con un pH-metro Crison GLP 22 (Crison).

#### 4.3.5. Análisis estadístico

Cada experimento se replicó tres veces (N=3), y todas las muestras fueron medidas por triplicado. Los datos obtenidos se presentan como valor medio ± desviación estándar, con el objetivo de verificar la validez de los resultados y la variabilidad de los ensayos efectuados bajo las mismas condiciones operativas. Para identificar diferencias significativas se aplicó la prueba LSD de Fisher con un valor  $p \leq 0,05$ , empleando el programa Statgraphics Centurion 19 (Statistical Graph Co., Rockville, MD).

### 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se presentan y discuten los resultados obtenidos en el desarrollo del proceso de separación de ácido láctico mediante niosomas y ultrafiltración.

En primer lugar, en el subapartado **5.1** se analizan los resultados de la preparación y caracterización de los niosomas formulados empleando Span 60 y Span 80 como agentes estructurales y Tween 80 como agente modificador de la bicapa vesicular.

A continuación, en el subapartado **5.2** se comparan y discuten los resultados de extracción de ácido láctico empleando los cuatro tipos de niosomas formulados, y en el subapartado **5.3** se evalúa su selectividad frente a otros ácidos orgánicos que suelen estar presentes en los

hidrolizados de agua subcrítica a partir de materiales lignocelulósicos. Finalmente, se presentan los resultados de los ensayos de ultrafiltración asistida con niosomas de Span 60 utilizando tanto una formulación sintética (subapartado 5.4) como el hidrolizado obtenido a partir de residuos de maíz (subapartado 5.5), con el objetivo de comparar y analizar las similitudes y diferencias en el rendimiento de extracción y en la capacidad de filtración de la membrana bajo distintas condiciones de pH, duración del contacto entre las fases previo a la ultrafiltración y cantidad de niosomas empleada.

### 5.1.- RESULTADOS DE LA PREPARACIÓN DE LOS NIOSOMAS

Los niosomas formulados con tensioactivos no iónicos son termodinámicamente inestables y su formación requiere de un aporte de energía. Una técnica eficaz para la formación de niosomas es aplicar energía por ultrasonidos, puesto que la cavitación acústica promueve la formación de estructuras estables y uniformes [27]. En este trabajo, se ha evaluado el aporte de energía variando el tiempo de ultrasonidos desde 10 hasta 90 minutos (tiempo efectivo= 5-45 minutos).

Los resultados del efecto del tiempo de ultrasonidos sobre el diámetro de partícula (DP) y el potencial zeta (PZ) para la formación de los niosomas formulados con 20 mM de Span 60 (S60) y de Span 80 (S80), así como del sistema micelar formulado con 4 mM de Tween 80 (T80) se muestran en la Figura 7.

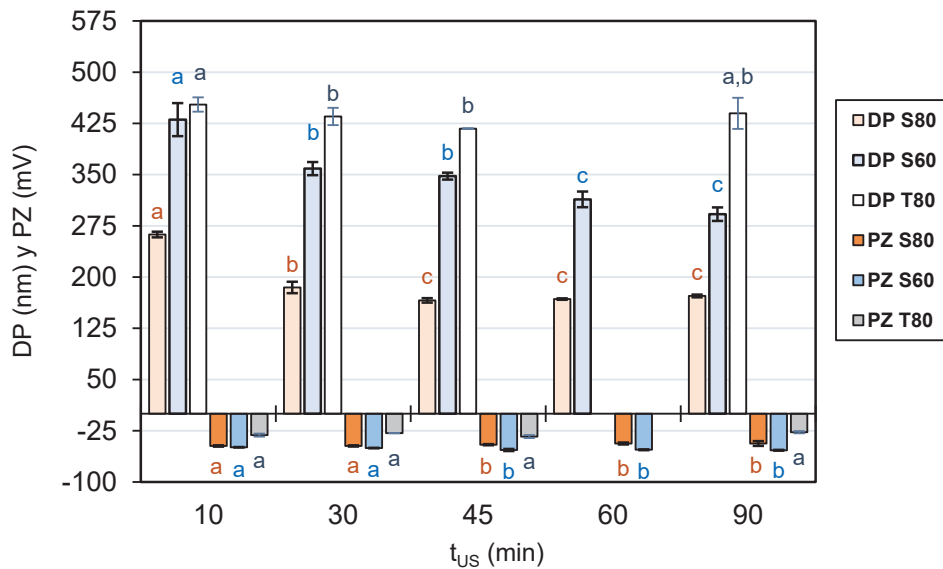


Figura 7. Diámetro de partícula (DP, nm) y potencial zeta (PZ, mV) frente al tiempo de ultrasonidos ( $t_{US}$ , min). Los valores con distintas letras para cada componente indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Número de réplicas: N=3.

El análisis realizado con el equipo Nanosizer evidenció que las distribuciones de tamaño presentaban un único pico tanto para los niosomas de Span como para las micelas de Tween 80, es decir, una distribución monomodal de tamaño de partícula. En cuanto al índice de polidispersidad (PDI) se redujo desde 0,5 hasta un valor constante de 0,3 al aumentar el tiempo de ultrasonidos para los dos Span y se mantuvo en un valor constante, próximo a 0,6 para el T80. Dado que valores cercanos o inferiores a 0,3 se consideran indicativos de sistemas niosomales con vesículas más homogéneas, puede afirmarse que las formulaciones de Span estudiadas presentaron una homogeneidad de tamaño aceptable.

Los resultados de la Figura 7 muestran que resultó necesario un tiempo de ultrasonidos cercano a 60 minutos para obtener niosomas homogéneos (PDI=0,3) de S60 y S80, con diámetros de partícula pequeños de 348 nm para la formulación con S60 y 166 nm para S80. Tal como se ha descrito previamente, una disminución en el tamaño de partícula implica un aumento del área superficial disponible, lo que favorece la interacción con los compuestos presentes en el extracto. Además, el tamaño de partícula influye directamente en el

rendimiento del proceso, ya que partículas de menor tamaño tienden a presentar mayor estabilidad coloidal y un comportamiento más uniforme durante la ultrafiltración.

El potencial zeta (Figura 7) de las vesículas formadas apenas se ha visto modificado por el  $t_{us}$ , obteniéndose unos valores de -53 mV para S60, -45 mV para S80. Estos resultados confirman que valores absolutos superiores a 30 mV se asocian con sistemas coloidales estables, al favorecer la repulsión electroestática entre partículas, minimizar la agregación y mantener la estabilidad durante el proceso de ultrafiltración.

Por otra parte, como se puede observar en la Figura 7, un aumento del  $t_{us}$  hasta los 90 minutos no cambió ni el DP ni el PZ de los niosomas formulados con ambos Span, justificando que 60 minutos de  $t_{us}$  es el tiempo mínimo necesario requerido para la formación de los niosomas formulados con S60 y S80.

Respecto al T80, que tiene un balance hidrófilo-lipófilo (HBL) elevado (aproximadamente 15), tiene un carácter hidrofílico que justifica su solubilidad en agua. A concentraciones superiores a su concentración micelar crítica (CMC, aproximado de 1 mM), forma micelas en la disolución acuosa; sin embargo, cuando se incluyen las proporciones adecuadas en formulaciones con tensioactivos no iónicos lipofílicos como el S60 (HBL 4,7) y S80 (HBL 4,3), el T80 se puede incorporar en la bicapa, actuando como agente modificador. Los valores obtenidos para el DP fueron más grandes, próximos a 440 nm, que los obtenidos para los niosomas formulados con Span; además, las micelas de T80 presentaron valores de PZ de -33 mV, indicando que son más inestables en el medio. Se observó que el tiempo de tratamiento por ultrasonidos influyó de manera significativa en la reducción del diámetro de partícula para las vesículas de niosomas, mientras que su efecto fue despreciable para la formación de las micelas de T80. En este caso, la formación de micelas no depende del tiempo de tratamiento por ultrasonidos, sino de la concentración micelar crítica (CMC), cuyo valor es aproximadamente 1 mM siendo inferior al valor utilizado para su formulación (4 mM). Esta diferencia estructural explica el comportamiento observado respecto a las formulaciones basadas en tensioactivos tipo Span. A partir del conjunto de resultados obtenidos, se determinó que la formulación basada en niosomas de S60 y S80, formados con tiempos de ultrasonidos de 60 minutos, presentan buena estabilidad coloidal y un tamaño vesicular adecuado para su posible aplicación en la extracción de ácido láctico.

Posteriormente, se prepararon dos nuevas formulaciones empleando mezclas de 20 mM de S60 y de S80 con 4 mM de T80 aplicando un  $t_{us}$  de 60 minutos, con el fin de evaluar su comportamiento comparativo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de diámetro de partícula (DP) y potencial zeta (PZ) obtenidos con 60 minutos de tiempo de ultrasonidos para las formulaciones de S60, S80, S60 con T80 y S80 con T80.

Niosomas	DP ( $\pm 5$ , nm)	PZ ( $\pm 1$ , mV)
Span 60	314	-53
Span 80	168	-44
Span 60 + Tween 80	240	-42
Span 80 + Tween 80	120	-29

En este segundo estudio, las formulaciones que incorporaban T80 presentaron menor tamaño de DP, pero también menor valor absoluto de PZ, como se observa en la Tabla 2. Estas diferencias observadas pueden justificarse debido a que el T80 se incorpora en la bicapa y cambia la estructura de la vesícula. Además, presentaron una distribución monomodal de tamaño de partícula, lo que indica la ausencia de micelas de T80, las cuales deberían estar situadas sobre un tamaño de DP de 400 nm. Estos niosomas también se han seleccionado para incluirlos en el estudio de extracción de ácido láctico debido fundamentalmente a su reducido tamaño de partícula.

Indicar que no se observaron cambios significativos en el DP ni en el PZ durante el almacenamiento a 4 °C durante 48 horas para ninguno de los cuatro tipos de niosomas formulados.

## 5.2.- EXTRACCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO CON LOS NIOSOMAS FORMULADOS

En este tercer estudio, se evaluó la eficacia de extracción del ácido láctico empleando los cuatro tipos de niosomas formulados y disoluciones acuosas de ácido láctico de 0,8 g/L y de 2 g/L a distintos pH (aproximadamente 2,6 y 6,6), denominadas F1, F2, F5 y F6 en la Tabla 1. Es decir, se ha evaluado la extracción de ácido láctico tanto en su forma no disociada (LH) como en su forma ionizado o forma lactato (L-). A partir de la concentración inicial media ( $C_0$ ) medida por HPLC y del pH del medio, se calcularon las fracciones de LH (Ecuación 6) y L- (Ecuación 7), considerando el equilibrio ácido-base de este ácido orgánico.

Las disoluciones (F1 y F2 en la Tabla 1) a pH ácido presentaron como forma predominante la forma no disociada (LH >94 %), y las disoluciones (F5 y F6 en la Tabla 1) a pH mayor que el  $pK_a = 3,86$  del ácido láctico presentaron como forma mayoritaria la forma lactato (L- >99 %). Los resultados de la eficacia de extracción (EE, %) de ácido láctico con los niosomas formulados con S60, S80, S60 con T80 y S80 con T80, se muestran en la Figura 8. Se observa que, para las dos concentraciones estudiadas, la eficacia de extracción de ácido láctico a partir de disoluciones a pH inferior a su  $pK_a$  resultó significativamente superior al utilizar los niosomas de S60. Por el contrario, los niosomas de S60 con T80 resultaron tener mayor rendimiento de extracción a partir de las disoluciones con un pH superior al  $pK_a$  de este ácido orgánico. Además, se puede observar en la Figura 8 que la extracción de la forma LH presentó la mayor eficacia de extracción, destacando especialmente las formulaciones individuales basadas en S60, que mostraron la retención más alta del ácido láctico.

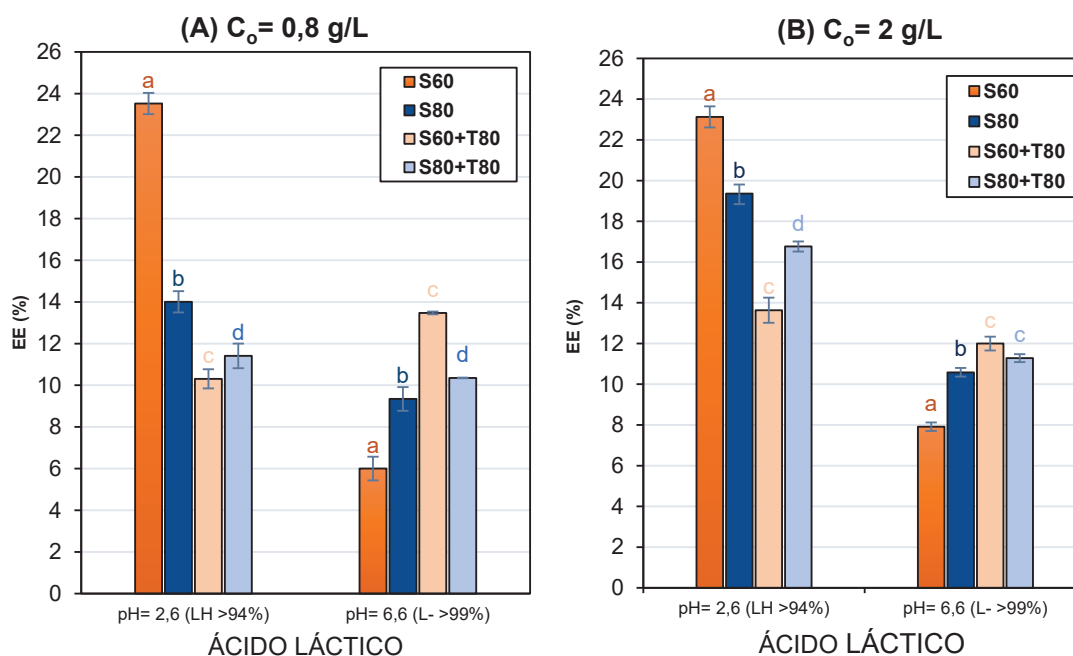


Figura 8. Resultados de los porcentajes de eficacia de encapsulación (EE, %) del ácido láctico a concentraciones ( $C_0$ ) de 0,8 g/L (A) y 2 g/L (B), para las cuatro formulaciones de niosomas preparados en este trabajo. Los valores con distintas letras para cada tipo de niosoma indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Número de réplicas: N=3.

A nivel global, los valores de la eficacia de encapsulación en valores de concentración de 0,8 g/L (Figura 8A) son mayores que a 2 g/L (Figura 8B), lo que demuestra que la eficacia de extracción se ve favorecida cuanto menor concentración de ácido láctico haya en la disolución, esto se explica como efecto de saturación.

Se puede concluir que los niosomas de Span 60 presentan una mejor afinidad por el ácido láctico que el resto de los niosomas formulados en este trabajo.

### 5.3.- RESULTADOS DE SELECTIVIDAD

Aunque los niosomas de S60 proporcionaron mejores resultados de extracción de ácido láctico, para abordar el estudio de selectividad se decidió trabajar con los cuatro tipos de niosomas formulados.

En este cuarto estudio se emplearon disoluciones acuosas de ácido láctico y mezclas ternarias de los ácidos láctico, fórmico y acético, todas ellas con dos concentraciones de 0,8 g/L y 2 g/L (F1-F4, Tabla 1). Las disoluciones individuales de ácido láctico presentaron valores de pH entre 2,6-2,8, mientras que las mezclas ternarias mostraron un pH ligeramente inferior (2,27-2,4), debido a la presencia conjunta de los tres ácidos orgánicos. Al igual que en el apartado anterior, 5.2, se calcularon las fracciones de LH y L- considerando el equilibrio ácido-base del ácido láctico y utilizando las ecuaciones 6 y 7. En las cuatro disoluciones acuosas, la forma LH siguió siendo la predominante, alcanzando aproximadamente el 97 % para 2 g/L y el 96 % para 0,8 g/L. En el caso del ácido fórmico y ácido acético, ambos se encontraron mayoritariamente en la forma LH bajo estas condiciones de pH, alcanzando valores superiores al 96 %.

En la Figura 9, se puede evaluar comparativamente la eficacia de extracción (EE, %) del ácido láctico de forma individual y en la mezcla ternaria, en las dos concentraciones estudiadas y con las cuatro formulaciones de niosomas.

La comparación del EE muestra que la formulación basada en S60 presenta de nuevo los valores más elevados en ambas concentraciones (0,8 y 2 g/L), alcanzando valores cercanos al 24 %. Este comportamiento se mantiene independientemente de que el ácido láctico se encuentra solo o acompañado de otros ácidos orgánicos, lo que sugiere una mayor afinidad del ácido láctico por las formulaciones preparadas con S60. En las formulaciones que incorporan T80, el EE disminuye de forma notable tanto para los niosomas elaborados con S60 como para los de S80. Asimismo, la presencia de otros ácidos (mezcla ternaria) produjo una disminución del EE del ácido láctico respecto a cuando se encontraba en forma individual.

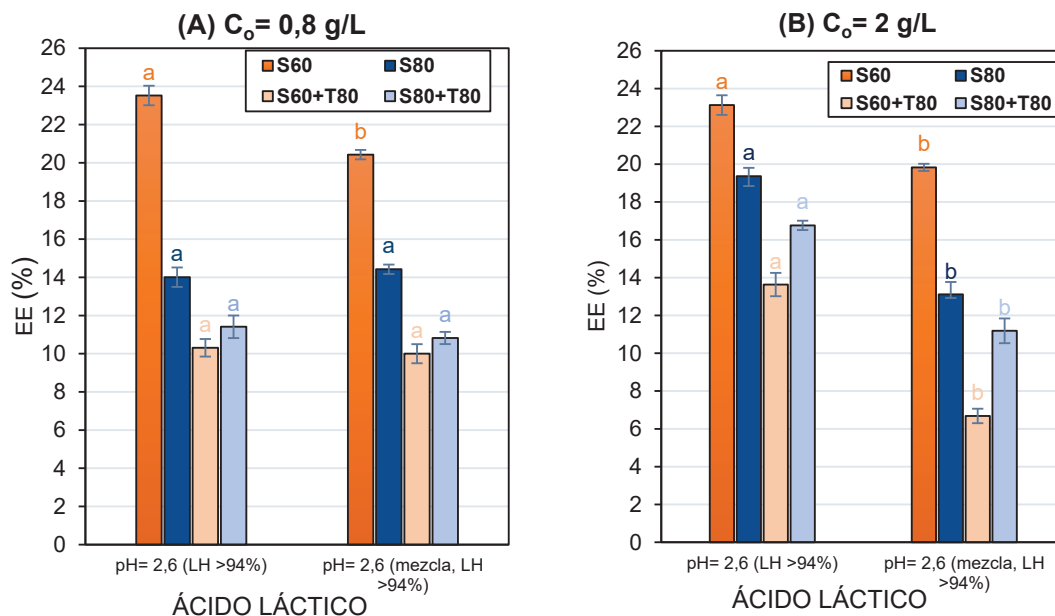


Figura 9. Resultados de los porcentajes de eficacia de encapsulación (EE, %) del ácido láctico solo y mezclado con los ácidos fórmico y acético, a concentraciones (C<sub>o</sub>) de 0,8 g/L (A) y 2 g/L (B), para las cuatro formulaciones de niosomas preparados en este trabajo. Los valores con distintas letras para cada tipo de niosoma indican diferencias significativas (p ≤ 0,05). Número de réplicas: N=3.

De forma global, los valores de EE fueron mayores a concentraciones más bajas (0,8 g/L, Figura 9A), confirmando nuevamente el efecto de saturación del niosoma a concentraciones elevadas y justificando su utilización a baja concentración. Este resultado indica una reducción en la selectividad del sistema cuando existen moléculas competidoras con características fisicoquímicas similares.

En la Tabla 3 se muestra la comparación de las eficacias de extracción (EE,%) de los tres ácidos, que permite evaluar la selectividad relativa para cada formulación estudiada. Todos los niosomas extrajeron los tres ácidos orgánicos, resultando el grado de extracción ligeramente superior para el ácido láctico, excepto en el caso del S80 junto con T80 que tiene una mayor selectividad para el ácido fórmico. Por tanto, partiendo de disoluciones acuosas con la misma concentración para los tres ácidos orgánicos, ninguno de estos niosomas ha resultado ser selectivo.

Tabla 3. Resultados de la eficacia de encapsulación de los ácidos láctico, fórmico y acético para los cuatro tipos de niosomas formulados, y mezclas de los tres ácidos orgánicos a concentraciones ( $C_o$ ) de 0,8 g/L y 2 g/L. Los subíndices L, F y A representan los ácidos láctico, fórmico y acético respectivamente.

Tipo de niosomas	$C_o$ (g/L)	$EE_L$ (%)	$EE_F$ (%)	$EE_A$ (%)
Span 60	2	19,8 <sup>a</sup> ±0,2	10,1 <sup>a</sup> ±0,4	9,5 <sup>a</sup> ±0,6
	0,8	<b>20,4<sup>a</sup>±0,2</b>	10,5 <sup>a</sup> ±0,4	9,3 <sup>a</sup> ±0,8
Span 80	2	13,1 <sup>b</sup> ±0,7	6 <sup>b</sup> ±2	1,2 <sup>b</sup> ±1
	0,8	<b>14,4<sup>c</sup>±0,3</b>	3,3 <sup>c</sup> ±0,5	4,5 <sup>c</sup> ±0,5
Span 60 + Tween 80	2	6,7 <sup>d</sup> ±0,4	6,5 <sup>b</sup> ±0,7	3,2 <sup>c</sup> ±0,9
	0,8	<b>10,0<sup>e</sup>±0,5</b>	6,3 <sup>b</sup> ±0,7	3 <sup>b,c</sup> ±2
Span 80 + Tween 80	2	11,2 <sup>e</sup> ±0,7	12,3 <sup>d</sup> ±2	5,0 <sup>d</sup> ±0,3
	0,8	10,8 <sup>e</sup> ±0,3	<b>18,6<sup>e</sup>±2</b>	9,3 <sup>a</sup> ±0,4

\*Los valores con distintas letras para cada compuesto indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Número de réplicas: N=3.

Según la composición del hidrolizado de rastrojo de maíz (76,7 % de ácido láctico y 23,3 % de los ácidos fórmico y acético) puede ser interesante analizar la aplicación de los niosomas de Span 60 en una disolución sintética donde mayoritariamente contenga ácido láctico, es decir, que simule la composición real de los ácidos orgánicos presentes en el hidrolizado de rastrojo de maíz.

#### 5.4.- RESULTADOS DE LA ULTRAFILTRACIÓN CON NIOSOMAS DE SPAN 60

Como se ha comentado anteriormente, en esta parte experimental se empleó una disolución sintética denominada hidrolizado sintético (HS) para simular la composición y pH del hidrolizado obtenido con agua subcrítica a partir del rastrojo de maíz (HRM). Esta disolución fue formulada a pH 6,57, con una concentración de 11,2±0,2 g/L, 1,1±0,4 g/L y 2,3±0,4 g/L, de los ácidos láctico, fórmico y acético, respectivamente; lo que implica también la presencia de iones calcio en cantidades similares a las que presenta el HRM. La presencia de este catión puede influir en el comportamiento de extracción de los niosomas, afectar a su estabilidad, provocar la rotura de la bicapa vesicular o interferir en la interacción entre los ácidos orgánicos y la membrana niosomal.

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de extracción de los niosomas de S60 frente a los ácidos orgánicos presentes en la disolución, se llevaron a cabo dos ensayos independientes, según lo descrito en el apartado 4.2.3.

El **primer ensayo** se centró en analizar el efecto del pH, trabajando a distintos pHs ácidos inferiores al  $pK_a$  del ácido láctico, sobre el proceso de extracción del mismo. Para ello, el HS a pH 6,57 se acidificó empleando ácido clorhídrico hasta alcanzar tres valores de pH: 1,5, 2,5 y 3,5.

El rendimiento de la operación se ha analizado utilizando el valor de factor de retención total ( $FR_t$ , %, Ecuación 4) y de retención en los niosomas ( $FR_{nio}$ , %, Ecuación 5), cuyos resultados se muestran en la Figura 10.

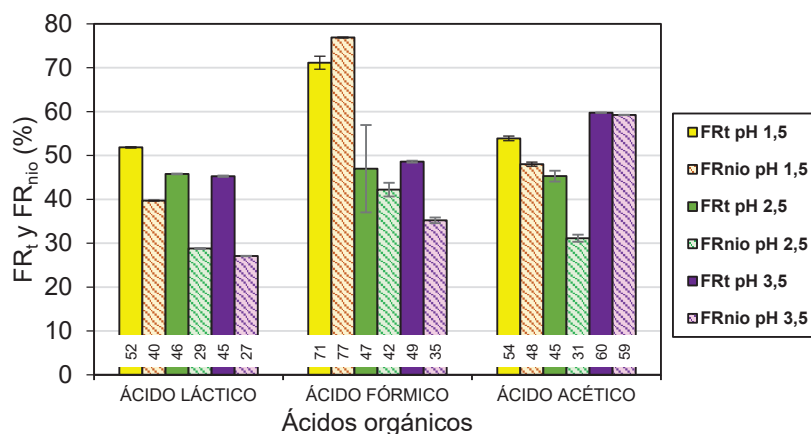


Figura 10. Resultados del factor de retención total (FR<sub>t</sub>, %) y en los niosomas (FR<sub>nio</sub>, %) de los ácidos láctico, fórmico y acético utilizando niosomas de S60 y el hidrolizado HS a distintos valores de pH.

Tal y como se puede observar en la Figura 10, una disminución del pH inicial del HS desde 3,5 a 1,5 aumenta el rendimiento de la operación, obteniéndose valores del FR<sub>t</sub> y de FR<sub>nio</sub> considerablemente superiores para los tres ácidos orgánicos estudiados. Asimismo, se observa que los valores de retención asociados a los niosomas son elevados en todos los casos, lo que demuestra que una parte importante de la retención total se debe a la encapsulación en el interior de los niosomas. Este resultado parece indicar que un gradiente de pH más grande entre el núcleo del niosoma y el HS mejora la transferencia de estos ácidos orgánicos a través de la bicapa de los niosomas formulados con S60.

Con el **segundo ensayo** se evaluó el efecto del tiempo de contacto entre los niosomas (10 % v/v) y el HS a pH de 1,5 acidificado con ácido clorhídrico; las variables de tiempo seleccionadas fueron 1,5 y 24 horas. El procedimiento experimental se realizó de la forma descrita en el apartado 4.2.3. Los resultados de los factores de retención fueron significativamente iguales (N=3, p≤ 0,05) a los obtenidos con un tiempo de contacto entre las fases de 1,5 horas. Este comportamiento sugiere que un tiempo de 1,5 horas es suficiente para alcanzar las condiciones de equilibrio entre la fase acuosa y los niosomas.

Todos estos resultados ponen de manifiesto que tanto el pH del medio como el tiempo de contacto influyen significativamente en el proceso de encapsulación de los ácidos orgánicos en niosomas de Span 60, siendo parámetros clave para optimizar posteriormente el tratamiento del hidrolizado real de rastrojo de maíz.

Con el fin de seleccionar las condiciones experimentales más adecuadas para el posterior tratamiento del HRM, se elaboró una tabla resumen (Tabla 4) en la que se recopilan los resultados obtenidos en los cuatro experimentos, incluyendo la concentración de cada ácido encapsulado en los niosomas (Y, g ácido orgánico/g S60) y el porcentaje del factor de retención asociado a los niosomas (FR<sub>nio</sub>, %).

Tabla 4. Resultados de la concentración de ácido encapsulado en los niosomas (Y) y el factor de retención en los niosomas (FR<sub>nio</sub>, %) respecto a los cuatro experimentos realizados con los tiempos de contacto de 1,5 y 24 horas y los pH de la disolución sintética de 1,5, 2,5 y 3,5. Los subíndices L, F y A representan los ácidos láctico, fórmico y acético respectivamente.

Experimentos	pH	Tiempo (h)	Y <sub>L</sub>	FR <sub>nioL</sub> (%)	Y <sub>F</sub>	FR <sub>nioF</sub> (%)	Y <sub>A</sub>	FR <sub>nioA</sub> (%)
1	3,5	1,5	3,4	27,08	0,4	35,22	3,0	59,24
2	2,5	1,5	3,8	28,79	0,5	42,22	0,9	31,14
3	1,5	1,5	6,1	39,71	2,3	76,89	2,0	48,03
4	1,5	24	6,3	39,88	2,4	76,07	1,9	48,76

Esta Tabla 4, demuestra que el valor de Y para el ácido láctico en todos los experimentos fue considerablemente superior que el valor de Y de los ácidos fórmico y acético, y por

consiguiente los niosomas de S60 se pueden considerar selectivos al ácido láctico al emplear la formulación del hidrolizado sintético.

Como conclusión, estos resultados permitieron definir las condiciones experimentales más adecuadas para el posterior tratamiento del hidrolizado de rastrojo de maíz, estableciendo como óptimas las condiciones de pH 1,5 y un tiempo de 1,5 horas, ya que permiten obtener los mayores valores de retención durante el proceso de ultrafiltración asistido con niosomas. Además, se va a valorar el aumento de la concentración de niosomas hasta un 30 % (v/v).

### 5.5.- RESULTADOS CON EL HIDROLIZADO DE RASTROJO DE MAÍZ

Para la realización de este experimento, se siguió el protocolo descrito en el apartado 4.2.4, empleando el hidrolizado de rastrojo de maíz (HRM) acidificado a pH 1,5 y evaluando dos concentraciones diferentes de niosomas de Span 60, correspondientes al 10 % y 30 % (v/v), con el objetivo de analizar la influencia de la concentración de niosomas sobre el proceso de extracción de los ácidos orgánicos presentes en el hidrolizado.

El Figura 11 muestra los resultados obtenidos para el factor de retención de los niosomas ( $FR_{nio}$ , %) para los distintos ácidos orgánicos estudiados.

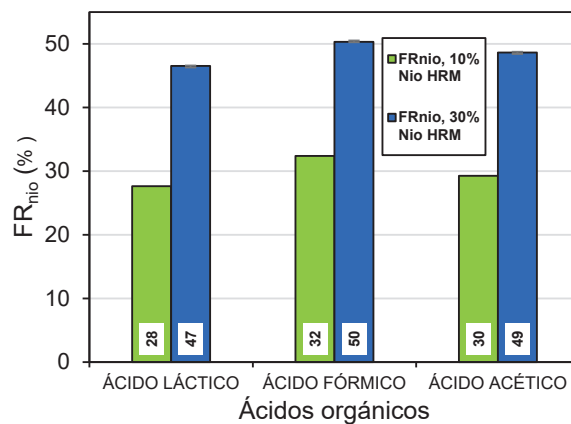


Figura 11. Resultados del factor de retención de los niosomas de los ácidos orgánicos respecto al HRM con una concentración del 10 % y del 30 % (v/v) de niosomas S60.

Los resultados obtenidos indican que el ácido fórmico sigue siendo el compuesto que presenta mayor porcentaje de retención dentro de los niosomas, seguido del ácido acético y, finalmente, del ácido láctico. Este comportamiento es coherente con las tendencias observadas previamente en la Figura 10 del apartado 5.4. Asimismo, se observa que al aumentar la concentración de niosomas del 10 % al 30 % se produce un incremento notable del porcentaje de retención, lo que sugiere que una mayor cantidad de niosomas disponibles favorece la encapsulación de los ácidos orgánicos presentes en el hidrolizado HRM.

Con el fin de analizar con mayor detalle la capacidad de encapsulación de los niosomas de S60, se calculó el parámetro  $Y$  (g de ácido orgánico encapsulado/g de S60), cuyos valores se recogen en la Figura 12.

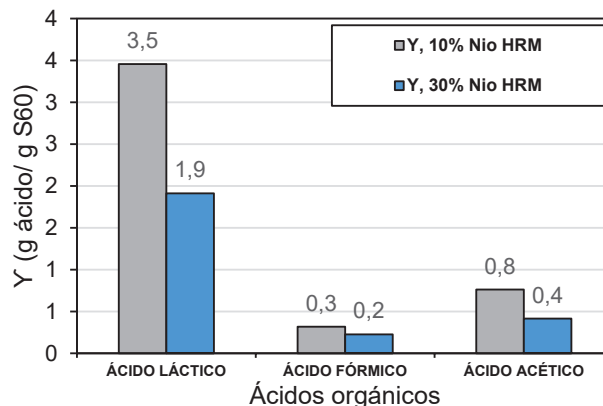


Figura 12. Resultados de  $Y$  para los experimentos de la Figura 11.

Si observamos la Figura 12 el ácido láctico presenta los valores más elevados de  $Y$ , debido probablemente a que es el ácido orgánico que se encuentra en mayor concentración en el HRM, además esto indica que, en términos de capacidad de encapsulación por unidad de S60, estos niosomas presentan una afinidad mayor por el ácido láctico que por el resto de los ácidos orgánicos presentes en el HRM.

Con el fin de evaluar con mayor detalle la diferencia entre el hidrolizado sintético (HS) y el HRM, se compararon ambos experimentos con una concentración del 10 % de niosomas (v/v), con el objetivo de analizar la influencia de la composición de la fase acuosa en el proceso de encapsulación. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13.

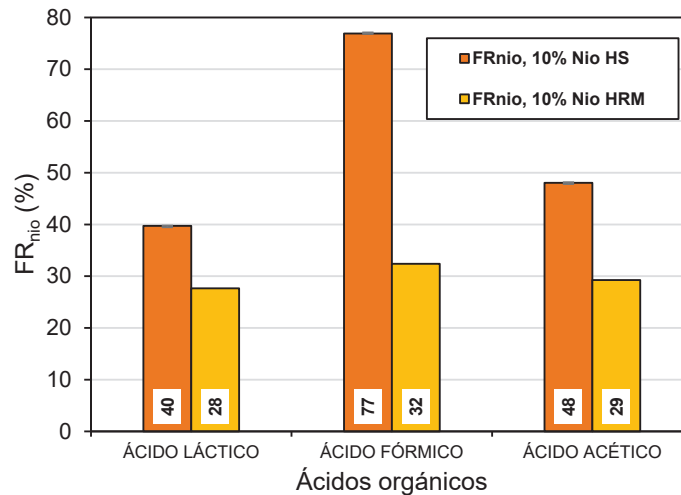


Figura 13. Factor de retención en los niosomas de los ácidos orgánicos empleando el HRM y el HS con una concentración del 10 % (v/v) de niosomas de S60.

En ambos casos, como se observa en la Figura 13, la extracción de todos los ácidos orgánicos con los niosomas de S60 con el HRM resultaron inferiores que con el HS, lo que sugiere que los distintos compuestos presentes en el hidrolizado de rastrojo de maíz (mayoritariamente productos de degradación de la lignina y coloides) pueden interferir en el proceso de encapsulación de los ácidos orgánicos.

La comparación de los valores de  $Y$  para evaluar la selectividad de los niosomas de S60 hacia el ácido láctico se muestra en la Figura 14. El ácido láctico fue el ácido orgánico que presentó la mayor concentración encapsulada dentro de los niosomas. De igual forma, si se comparan los resultados de HS con el HRM se ve como disminuyen en más de la mitad de su valor, lo que confirma el resultado del  $FR_{nio}$  y se ratifica que la posible causa de esa disminución de la concentración puede deberse a una interferencia con otros compuestos presentes en el HRM.

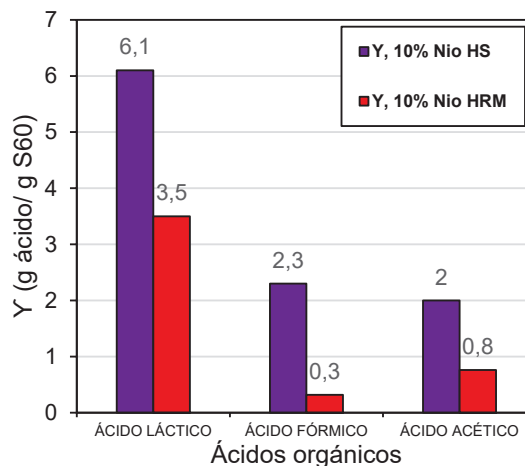


Figura 14. Resultados de  $Y$  para los experimentos de la Figura 13.

Para evaluar la necesidad de incluir unas etapas de refrigeración, centrifugación y filtración (**Etapas 2 y 3**, Figura 6) previas al proceso de ultrafiltración asistida con niosomas (Figura 6 del apartado 4.2.4) se ha estudiado la capacidad de filtración de la membrana utilizando como alimentación agua pura y las siguientes disoluciones: HS al 10 % de niosomas (v/v), el HRM al 10 % de niosomas (v/v) sin tratamiento previo y el HRM al 10 y 30 % de niosomas (v/v) sometido a refrigeración, centrifugación y filtración. En la Figura 15 se muestran los resultados de la densidad de flujo de permeado ( $J$ , Ecuación 2) frente al tiempo de ultrafiltración ( $t$ ) para los experimentos realizados.

Con estos resultados se demuestra que la incorporación de las etapas de refrigeración, centrifugación y filtración permite eliminar una gran parte de los sólidos y de la materia coloidal presentes en la muestra, reduciéndose la cantidad total de materia orgánica de 18,2 a 12,1 g/L. La eliminación de estos componentes reduce significativamente el ensuciamiento de la membrana, lo que se traduce en menores tiempos de filtración y una mejora de  $J$  durante el proceso de ultrafiltración, que resultan constantes y de un valor relativamente alto de 32-35 L/m<sup>2</sup> h. Cabe destacar que estas etapas previas de pretratamiento resultaron fundamentales para reducir la disminución de  $J$  debido al ensuciamiento de la membrana provocado fundamentalmente por el material coloidal que se ha retirado por centrifugación.

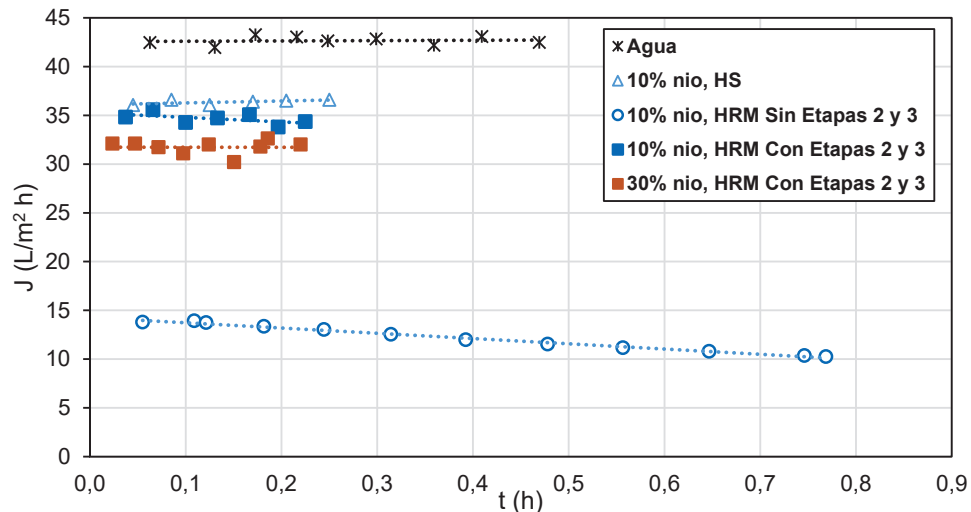


Figura 15. Resultados de la densidad de flujo de permeado ( $J$ , L/m<sup>2</sup> h) frente al tiempo de ultrafiltración ( $t$ ) para los experimentos con agua pura y HS al 10 % de niosomas (v/v), el HRM al 10 % de niosomas (v/v) sin tratamiento previo y el HRM al 10 % y 30 % de niosomas (v/v) sometido a refrigeración, centrifugación y filtración.

Estos resultados evidencian la importancia de aplicar etapas de pretratamiento en disoluciones complejas como el hidrolizado de rastrojo de maíz, ya que permiten mejorar la filtrabilidad del sistema y optimizar el rendimiento del proceso de ultrafiltración.

## 6.- CONCLUSIONES

En este estudio se evaluó la viabilidad operativa del proceso de ultrafiltración asistida con niosomas como proceso alternativo para la recuperación del ácido láctico obtenido por un tratamiento con agua subcrítica a partir de residuos de rastrojos de maíz.

A continuación, se presentan las conclusiones derivadas del análisis de los resultados experimentales:

- Se han formulado diferentes tipos de **niosomas basados en tensioactivos no iónicos (Span 60, Span 80 y mezclas con Tween 80)**, evaluándose su tamaño de partícula y potencial zeta. Los resultados mostraron que **un tiempo de sonicación de 60 minutos permite obtener vesículas estables y con tamaño adecuado** para su aplicación en procesos de extracción.
- En los ensayos de extracción con disoluciones acuosas, se observó que **la forma no disociada del ácido láctico presenta mayores eficiencias de encapsulación**,

destacando especialmente las formulaciones basadas en **Span 60**, que alcanzaron los mayores valores de eficacia de extracción.

- La **concentración inicial del ácido láctico influye en la eficacia de extracción**, obteniéndose mejores resultados a concentraciones más bajas debido a posibles fenómenos de saturación de los niosomas.
- En mezclas ternarias de ácidos orgánicos (ácido láctico, fórmico y acético), **la presencia de compuestos competidores reduce la eficacia de encapsulación**, lo que evidencia una disminución de la selectividad del sistema en medios más complejos.
- Los experimentos de **ultrafiltración asistida con niosomas de Span 60** mostraron que el **pH del medio es un parámetro clave**, observándose mayores valores de retención de los ácidos orgánicos al disminuir el pH del medio.
- El estudio del **tiempo de contacto entre los niosomas y la fase acuosa** indicó que **1,5 horas son suficientes para alcanzar el equilibrio**.
- El aumento de la **concentración de niosomas del 10 % al 30 % (v/v)** incrementa notablemente la retención de los ácidos orgánicos, lo que demuestra que una mayor disponibilidad de vesículas favorece el proceso de encapsulación.
- Al comparar el **hidrolizado sintético con el hidrolizado real de rastrojo de maíz**, se observó una disminución en la eficiencia de extracción en este último, debido probablemente a la presencia de **compuestos coloidales y otros productos de degradación de la lignina** que interfieren en el proceso de encapsulación.
- La incorporación de **etapas de pretratamiento (refrigeración, centrifugación y filtración)** antes de la ultrafiltración permitió reducir el contenido de sólidos y materia coloidal, **disminuyendo el ensuciamiento de la membrana y mejorando la densidad de flujo de permeado**.
- En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que **la ultrafiltración asistida con niosomas, especialmente basados en Span 60, constituye una estrategia prometedora para la recuperación de ácido láctico a partir de hidrolizados lignocelulósicos**, aunque la presencia de compuestos interferentes en hidrolizados reales puede afectar al rendimiento del proceso.

## 7.- AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el marco de los proyectos financiados por la Agencia Estatal de Investigación [referencia de la subvención PID2022-136385OB-I00] y por la Junta de Castilla y León (JCyL) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) [referencia de la subvención BU027P23].

## 8.- BIBLIOGRAFÍA

[1]. Grasa, E. T., Ögmundarson, Ó., Gavala, H. N., & Sukumara, S. (2020). Commodity chemical production from third-generation biomass: a techno-economic assessment of lactic acid production. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 15 (1), 257–281.

[2]. Khan, M. F. S., Akbar, M., Xu, Z., & Wang, H. (2021). A review on the role of pretreatment technologies in the hydrolysis of lignocellulosic biomass of corn stover. *Biomass and Bioenergy*, 155, 106276.

- [3]. Takkellapati S, Li T, Gonzalez MA. (2018). An overview of biorefinery derived platform chemicals from lignocellulosic biomass. *ChemBioEng, Rev.* 5:146–166.
- [4]. USDA. (2024). World Agricultural Supply and Demand Estimates (WASDE). United States Department of Agriculture. Disponible en: <https://www.usda.gov/oce/commodity/wasde>
- [5]. FAO. (2023). FAOSTAT Statistical Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/>
- [6]. MAPA. (2023). Anuario de Estadística Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/>
- [7]. Cooperativas Agro-alimentarias de España. Resultados de la red de ensayos de variedades de maíz en Castilla y León – campaña 2024, 2025. Informe técnico. Disponible en: <https://www.interempresas.net/Grandes-cultivos>
- [8]. Kim S, Dale BE. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenergy*, 26 (4):361–375.
- [9]. 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.
- [10]. Wee, Y., Kim, J., & Ryu, H. (2006). Review. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications *Food Technol*, 44 (2) 163-172 82006.
- [11]. Datta R, Henry M. (2006). Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review. *J Chem Technol Biotechnol*, 81:1119–1129.
- [12]. Abd Alsaheb, R. A., Aladdin, A., Othman, N. Z., Abd Malek, R., Leng, O. M., Aziz, R., & El Enshasy, H. A. (2015). Lactic acid applications in pharmaceutical and cosmeceutical industries. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7 (10), 729–735.
- [13]. Grasa, E. T., Ögmundarson, Ó., Gavala, H. N., & Sukumara, S. (2020). Commodity chemical production from third-generation biomass: a techno-economic assessment of lactic acid production. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 15(1), 257–281.
- [14]. Alves de Oliveira R, Komesu A, Vaz Rossell CE, Maciel Filho R. (2018). Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. *Biochem Eng J*, 133:219–239.
- [15]. Cubas-Cano E, González-Fernández C, Ballesteros M, Tomás-Pejó E. (2018). Biotechnological advances in lactic acid production by lignocellulose fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102: 5327–5341.
- [16]. Kumar AK, Sharma S. (2017). Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks. *Bioresour Bioprocess*, 4:7.
- [17]. Byrd AJ, Pant D, Gupta R. (2018). Advances in subcritical and supercritical water technologies for biomass conversion. *Curr Opin Green Sustain Chem*,10:1–7.
- [18]. Tang X, Zeng X, Sun Y, et al. (2019). Catalytic conversion of carbohydrates into lactic acid under hydrothermal conditions. *Green Chem*, 21: 2362–2372.
- [19]. López-Garzón CS, Straathof AJJ. (2014). Recovery of carboxylic acids produced by fermentation. *Biotechnol Adv*, 32:873–904.
- [20]. Morselli, E., Notarfrancesco, S., Martinez, G. A., Domingos, J. M. B., Negroni, A., Mancini, M., Fava, F., & Bertin, L. (2024). Recovery of carboxylic acids from actual effluent by using

---

sequential cationic-anionic adsorption steps at semi pilot scale. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12(5), 114089.

[21]. Sprakel, L. M. J., & Schuur, B. (2019). Solvent developments for liquid-liquid extraction of carboxylic acids in perspective. *Separation and Purification Technology*, 211, 935–957.

[22]. Escudero, I., Roque, L., & Benito, J. M. (2015). Lactic acid recovery by microfiltration using niosomes as extraction agents. *Separation and Purification Technology*, 140, 16-25.

[23]. Uchegbu IF, Florence AT. (1995). Non-ionic surfactant vesicles (niosomes): physical and pharmaceutical chemistry. *Adv Colloid Interface Sci*, 58:1–55.

[24]. Moghassemi S, Hadjizadeh A. (2014). Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review. *J Control Release*, 185:22–36.

[25]. Manosroi A, Wongtrakul P, Manosroi J. (2003). Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 30:129–138.

[26]. Liga, S., Paul, C., Moacă, E., & Péter, F. (2024). Niosomes: Composition, Formulation Techniques, and Recent Progress as Delivery Systems in Cancer Therapy. *Pharmaceutics*, 16.

[27]. Owodeha-Ashaka, K., Ilomuanya, M. O., & Iyire, A. (2021). Evaluation of sonication on stability-indicating properties of optimized pilocarpine hydrochloride-loaded niosomes in ocular drug delivery. *Progress in Biomaterials*, 10 (3), 207–220.

[28]. Souza, I. D., Saez, V., & Mansur, C. R. (2023). Lipid nanoparticles containing coenzyme Q10 for topical applications: An overview of their characterization. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 230, 113491, 5.

[29]. Trigueros, E., Sanz, M. T., Beltrán, S., & Ruiz, M. O. (2022). Filtration of subcritical water hydrolysates from red macroalgae byproducts with ultraporous ceramic membranes for oligosaccharide and peptide fractionation. *Journal of Membrane Science*, 660, 120822.