

Universidad de Burgos | Facultad de Ciencias

MÁSTER UNIVERSITARIO EN SEGURIDAD Y
BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIAS
Trabajo Fin de Máster 2025 -2026



UNIVERSIDAD
DE BURGOS

**Estudio de la influencia del etanol en la hidrólisis y
fraccionamiento de paja de trigo y cebada mediante agua
subcrítica.**

**Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos
Área de Ingeniería Química**

Tutores: Alba Ester Illera Gigante y María Teresa Sanz Diez

Autor: Kerly Engels Palacios Tovar



**UNIVERSIDAD
DE BURGOS** | **Facultad de Ciencias**

MÁSTER EN: SEGURIDAD Y BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIAS
CURSO: 2025/2026

“Estudio de la influencia del etanol en la hidrólisis y fraccionamiento de paja de trigo y cebada mediante agua subcrítica”

SI	X
----	---

NO *

OBSERVACIONES:

--

Burgos, a 15 de julio de 2026

Fdo.: Alba Ester Illera Gigante y María Teresa Sanz Diez

(1) Las memorias presentadas deberán contar con el visto bueno de los tutores. A tal efecto, se incluirá en la contraportada este documento con la firma de los mismos. (Regulación del reglamento interno de la Facultad de Ciencias para la gestión de la asignatura “Trabajo Fin de Máster”, aprobada en Junta de Facultad de 6 de abril de 2022)



UNIVERSIDAD
DE BURGOS

Facultad de Ciencias

ANEXO DE SOSTENIBILIZACIÓN CURRICULAR ⁽¹⁾

MÁSTER EN SEGURIDAD Y BIOTECNOLOGIA ALIMENTARIAS

CURSO: 2025 - 2026

Don. Kerly Engels Palacios Tovar estudiante matriculado en el Trabajo Fin de Máster en seguridad y biotecnología alimentarias.

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

Este Trabajo de Fin de Máster abordó la valorización de un residuo agroindustrial mixto de paja de trigo y cebada mediante agua subcrítica, sola o modificada con etanol, como alternativa a los pretratamientos convencionales que emplean disolventes orgánicos agresivos o catalizadores ácidos concentrados. El proyecto se inscribe en la línea de investigación del grupo BIOIND de la Universidad de Burgos, centrada en la valorización de subproductos agroindustriales bajo principios de economía circular, y me ha permitido desarrollar competencias técnicas, metodológicas y éticas vinculadas a varios Objetivos de Desarrollo Sostenible.

El eje central del trabajo conecta directamente con el **ODS 12: Producción y consumo responsables**. Transformar un residuo agrícola de bajo valor en una matriz fraccionable en componentes de interés, un extracto rico en carbohidratos solubles y un sólido enriquecido en celulosa, constituye un ejercicio concreto de economía circular: se evita el desperdicio de un flujo generado a gran escala por la actividad intensiva de cultivo y se reduce la dependencia de materias primas vírgenes. Esta misma elección de partida responde también al **ODS 2: Hambre cero**, ya que trabajar sobre la paja y no sobre el grano evita la competencia directa con la producción alimentaria de primera generación, un criterio que guio la selección de esta biomasa desde el planteamiento inicial del proyecto.

La tecnología empleada refuerza este mismo propósito desde otra perspectiva. El uso del agua subcrítica como medio de reacción principal, en sustitución de disolventes orgánicos los cuales exigirían procesos de purificación y tratamiento de efluentes más complejos, conecta el trabajo con el **ODS 6: Agua limpia y saneamiento**, ya que, bajo condiciones subcríticas, el agua adquiere propiedades similares a las de un disolvente orgánico sin generar los residuos asociados a su purificación, lo que representa una vía concreta hacia tecnologías de procesamiento más limpias. En la misma línea, el registro del consumo energético de cada tratamiento (entre 0,639 y 0,696 kWh) permite evaluar el coste energético como criterio de decisión junto al rendimiento de extracción, aportando vinculación operativa al **ODS 7: Energía asequible y no contaminante**; aunque este TFM no comparó dicho consumo frente a procesos convencionales de referencia, la naturaleza del agua subcrítica como tecnología

de menor huella energética frente a alternativas con catálisis química adicional respalda su alineación al objetivo.

Adicional a lo planteado el diseño experimental mismo es otro punto de unión con la sostenibilidad. Debido a que trabajar con un reactor discontinuo desarrollado por el propio grupo de investigación, capaz de controlar temperatura y presión de forma reproducible y escalable, junto con el empleo de técnicas analíticas avanzadas como HPLC, análisis elemental y TOC para caracterizar con rigor las corrientes generadas, conecta el proyecto con el **ODS 9: Industria, innovación e infraestructura**. Al presentar la capacidad de generar conocimiento técnico transferible a escala industrial, contribuye de forma central para el desarrollo futuro de biorrefinerías.

Más allá del laboratorio, el proyecto tiene una dimensión ambiental, gracias a su vinculación directa con el sector agrícola, ya que la gestión inadecuada de residuos agrícolas se resuelve con frecuencia mediante quema en campo, práctica que genera contaminación atmosférica y emisiones evitables de carbono. En este sentido se proponer una vía de valorización estructural para este residuo contribuye, de forma indirecta pero real, a reducir esa práctica, alineándose con el **ODS 11: Ciudades y comunidades sostenibles y el ODS 13: Acción por el clima**, al favorecer un balance de carbono más favorable frente a la combustión directa. Esa misma reducción de la presión sobre el suelo agrícola, evitando la acumulación o quema de un residuo que de otro modo afectaría la calidad del suelo y los ecosistemas adyacentes, conectando también con el **ODS 15: Vida de ecosistemas terrestres**.

Por último, el propio contexto en el que se desarrolló este trabajo ilustra el **ODS 17: Alianzas para lograr los objetivos**: ya que una línea de investigación consolidada dentro de un grupo universitario que integra el conocimiento académico con aplicaciones potenciales en el sector agroindustrial y bioeconómico.

Este recorrido por los distintos objetivos deja una lectura clara: la investigación aplicada puede alinearse con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de forma medible y concreta, y este trabajo, centrado en la valorización de residuos agroindustriales, ha sido para mí un ejercicio directo de esa idea, además de una oportunidad para consolidar competencias técnicas en ingeniería química y caracterización analítica.

Burgos, a 15 de julio de 2026

Fdo.:



- (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)

ÍNDICE

ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos específicos:	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS	4
3.1 Materia prima y reactivos	4
3.2 Equipos empleados y condiciones experimentales	4
3.2.1 Reactor de agua subcrítica.....	4
3.2.2 Condiciones experimentales	5
3.2.3 Equipos de análisis.....	5
3.3 Métodos analíticos.....	5
3.3.1 Análisis de fracciones líquidas	5
3.3.2 Análisis de fracción sólida.....	7
3.3.3 Cálculo de proceso y balance de materia	8
3.3.4 Análisis estadístico.....	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
4.1 Composición de la materia prima	10
4.1.1 Caracterización inicial de la matriz lignocelulósica	10
4.2 Hidrólisis en medio subcrítico	11
4.2.1 Gradiente de calentamiento y consumo energético	11
4.2.2 Composición relativa del sólido residual	12
4.2.3 Recuperación y retención de carbohidratos estructurales	13
4.2.4 Productos de degradación y severidad química del licor.....	16
4.2.5 Desacetilación y perfil autocatalítico del licor	18
4.2.6 Retención, recuperación y redistribución de lignina	19
4.2.7 Balance estructural global de materia	21
5. CONCLUSIONES.....	22
5.1 Limitaciones y recomendaciones	23
5.2 Agradecimiento	24
6. BIBLIOGRAFÍA.....	24

RESUMEN

Se evaluó el efecto del agua subcrítica, sin adición de co-solvente, así como modificada con etanol (20 % y 40 % v/v), sobre la hidrólisis de un residuo agroindustrial mixto de paja de trigo y cebada (175 °C, 40 bar, 60 min), mediante la caracterización de las corrientes líquida y sólida y un balance estructural integrado. El etanol atenuó la autohidrólisis de la hemicelulosa y redujo la formación de furfural y ácido fórmico (-60,3 % y -46,1 % frente a agua subcrítica). La remoción de lignina no varió significativamente entre tratamientos ($p = 0,09$), pero el mayor porcentaje de etanol redujo la retención de lignina insoluble en ácido ($p = 0,018$), evidencia de un segundo mecanismo independiente de la protección de carbohidratos. Los glucanos permanecieron mayoritariamente retenidos en el sólido, mientras que la remoción de pentosanos disminuyó al aumentar la proporción de etanol frente al agua subcrítica pura. El perfil con 40 % de etanol, más rico en celulosa y con lignina estructuralmente menos compleja, resultó el más afín como precursor para su posterior fraccionamiento en nanocelulosa.

ABSTRACT

The effect of subcritical water, without co-solvent addition, as well as modified with ethanol (20 % and 40 % v/v), on the hydrolysis of a mixed wheat-barley straw agro-industrial residue (175 °C, 40 bar, 60 min), was evaluated through characterization of the liquid and solid streams and an integrated structural mass balance. Ethanol attenuated hemicellulose autohydrolysis and reduced furfural and formic acid formation (-60.3 % and -46.1 % relative to subcritical water). Lignin removal did not differ significantly between treatments ($p = 0.09$), but the highest ethanol proportion reduced the retention of acid-insoluble lignin ($p = 0.018$), evidence of a second mechanism independent of carbohydrate protection. Glucans remained mostly retained in the solid, whereas pentosan removal decreased as the ethanol proportion increased relative to pure subcritical water. The profile obtained with 40 % ethanol, richer in cellulose and with a structurally less complex lignin, proved the most suitable precursor for subsequent fractionation into nanocellulose.

1. INTRODUCCIÓN

El creciente interés por los nanomateriales celulósicos y otros biomateriales de alto valor añadido ha impulsado la búsqueda de fuentes renovables que sustituyan a las materias primas vírgenes convencionales. En este contexto, los residuos agroindustriales lignocelulósicos se consideran una alternativa atractiva para la obtención de estos compuestos estructurales (Nasution et al., 2022)

Entre estos residuos, los generados por la actividad productiva de cereales destacan por su elevado volumen y disponibilidad regular. España se consolidó en 2025 como uno de los principales productores europeos de cereales de invierno, con una cosecha conjunta de trigo y cebada superior a los 18 millones de toneladas, liderada por la cebada (10,1 millones de toneladas) (Cooperativas Agro-alimentarias de España, 2025). Esta producción genera un volumen considerable de paja como residuo agrícola, cuya valorización estructural responde a la búsqueda de fuentes alternativas de biomateriales celulósicos.

Como el resto de biomasa lignocelulósica, la paja de trigo y cebada, propia de gramíneas, está compuesta estructuralmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. Esta última actúa como soporte estructural que envuelve las microfibrillas de celulosa junto con la hemicelulosa mediante enlaces de hidrógeno y covalentes, generando una reticulación estable que dificulta la penetración de disolventes y reactivos necesarios para su fraccionamiento (Sun et al., 2022). En las gramíneas, esta reticulación se ve particularmente reforzada por el mayor contenido de grupos acetilo de la hemicelulosa frente a maderas blandas, cuya acetilación residual constituye un factor adicional de recalcitrancia que limita la accesibilidad de los

disolventes a los polisacáridos estructurales (Martín et al., 2022). Esta limitación se intensifica en los complejos lignina-carbohidrato (LCC), donde los polisacáridos quedan unidos covalentemente a la lignina a través de puentes éster de ácido ferúlico y p-cumárico, enlaces que aportan rigidez a la pared celular y resultan térmicamente lábiles a partir de aproximadamente 170 °C (Cocero et al., 2018; Sun et al., 2022). Esta resistencia conjunta hace necesaria la aplicación de un pretratamiento que rompa dicha reticulación.

Frente a esta necesidad, los pretratamientos hidrotermales con agua subcrítica se plantean como alternativa verde a los disolventes orgánicos convencionales, al prescindir de reactivos agresivos. Esto es posible porque, por encima de su punto de ebullición a presión atmosférica y bajo presión suficiente para mantenerse líquida, el agua adquiere propiedades distintas: su constante dieléctrica disminuye hasta valores similares a los de disolventes orgánicos no polares y su producto iónico aumenta considerablemente, potenciando la solubilidad de compuestos orgánicos (Cocero et al., 2018). Estas propiedades le permiten solubilizar hemicelulosas, alterar parcialmente la lignina y generar corrientes enriquecidas en celulosa, según la severidad aplicada (Martín et al., 2022; Sun et al., 2022).

Esta solubilización de hemicelulosas se intensifica también mediante un mecanismo autocatalítico: donde los grupos O-acetilo se hidrolizan bajo la autoionización del agua, liberando ácido acético que cataliza in situ la hidrólisis secundaria de los enlaces glicosídicos (Sun et al., 2022). A una mayor severidad de tratamiento, se favorece que esta cascada avance hacia los productos de deshidratación como el furfural, desde pentosas, y HMF, desde las hexosas, los cuales comparten rutas de degradación relacionadas; en cambio otros compuestos como el ácido fórmico se forman tanto por descomposición del furfural y directamente desde la degradación de las pentosas (Illera et al., 2025) (**Figura 1**). Bajo condiciones severas, estos furanos pueden incluso condensar con fragmentos de lignina para formar pseudolignina.

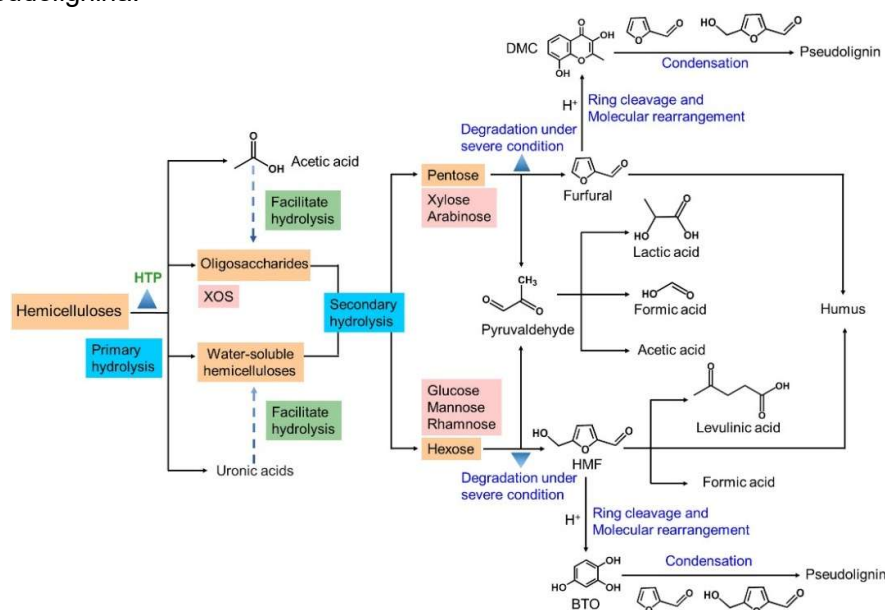


Figura 1. Rutas de hidrólisis y degradación secundaria de hemicelulosa durante el pretratamiento hidrotermal. Degradación y condensación de hemicelulosas durante el pretratamiento hidrotermal. **Fuente:** (Sun et al., 2022) https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0144861721014375-gr3_lrg.jpg

Estos fragmentos de lignina siguen una dinámica propia que determina su distribución final entre el sólido y el licor. En los tratamientos hidrotermales, la lignina se fragmenta por ruptura de los enlaces β -O-4, presentando limitaciones para disolverse en gran proporción sin la presencia de cosolvente orgánico (Martín et al., 2022) mientras que en los sistemas con la adición de organosolv sí se favorece su solubilización en la corriente líquida (Nair et al., 2023). Sin embargo, en ambos casos los fragmentos de lignina generados quedan expuestos a un

mismo inconveniente operativo: al superar su temperatura de transición vítrea durante el tratamiento, fluyen y coalescen en microgotas que migran fuera de la pared celular, pero tienden a endurecerse y redepositarse sobre las fibras del sólido residual al enfriar el sistema, fenómeno documentado en gramíneas por Selig *et al.* (2007) y, en organosolv con etanol, por Adamczyk *et al.*, (2023). Esta fracción redepositada se cuantifica junto con la lignina estructural residual en el análisis NREL, lo que puede sobredimensionar el valor de lignina insoluble medido.

Precisamente para superar esta limitación frente a la lignina, se ha propuesto el etanol como modificador del medio de reacción, el cual cumple con un doble papel: actúa como cosolvente y como agente de solubilización selectiva, debido a que su afinidad de polaridad con los fragmentos aromáticos potencia la disolución, lo que el agua subcrítica pura no logra por sí sola. A diferencia del organosolv convencional (etanol > 50 %, T > 180 °C), los sistemas hidroalcohólicos subcríticos usan el agua como disolvente principal y el etanol como aditivo a menor concentración (Ma *et al.*, 2024). Sin embargo, su efecto debe verificarse experimentalmente por las propiedades intrínsecas de cada matriz (Parchami *et al.*, 2022).

Para comparar este efecto de forma objetiva entre tratamientos, es necesaria una métrica que relacione temperatura y tiempo en un único valor. Aunque el factor de severidad suele restringirse al periodo isoterma, es más representativo estimarlo a partir del perfil completo de temperatura: Ruiz *et al.*, (2021) lo formulan bajo condiciones no isotérmicas mediante la integración de T(t), mientras que Martín *et al.*, (2022) señalan que incluir el calentamiento da una estimación más racional de la severidad real del proceso.

Estudios recientes han explorado sistemas agua-etanol subcrítico en rastrojo de maíz (Ma *et al.*, 2024), evaluado el fraccionamiento secuencial de paja de cereal (Serna-Loaiza *et al.*, 2022) y la separación de lignina en organosolv bajo el mismo enfoque (Adamczyk *et al.*, 2023). Sin embargo, la composición estructural y el grado de acetilación de la hemicelulosa varían entre especies, por lo que estos resultados no son directamente extrapolables entre matrices. En particular, ninguno aborda de forma integrada, la evaluación para un residuo mixto de trigo-cebada un balance estructural que distinga las diferentes retenciones, recuperaciones, productos de degradación y la fracción no cuantificada bajo distintas concentraciones de etanol.

Bajo este contexto y ante la necesidad de evaluar estas condiciones para el residuo mixto de trigo y cebada, el presente trabajo aborda el efecto del agua subcrítica, sola o modificada con etanol, sobre su hidrólisis, con los objetivos que se detallan a continuación.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del agua subcrítica, sin adición de cosolvente y modificada con etanol como cosolvente (20 % y 40 % v/v), sobre la hidrólisis de un residuo agroindustrial mixto de paja de trigo-cebada, a partir de la caracterización de las corrientes líquida y sólida generadas, con el fin de establecer un balance estructural integrado del destino de sus componentes.

2.2 Objetivos específicos:

- I. Determinar el efecto del modificador sobre el rendimiento y la composición del sólido residual, incluida la remoción aparente de lignina.
- II. Cuantificar la recuperación y retención de carbohidratos estructurales en las corrientes líquida y sólida.
- III. Cuantificar los productos de degradación frente a la severidad acumulada ($\log R_0$) y determinar el grado de desacetilación de la biomasa y su relación con procesos de autohidrólisis.
- IV. Integrar los resultados en un balance estructural global por componente y tratamiento.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materia prima y reactivos

Como materia prima se empleó un residuo agroindustrial mixto de paja de trigo y cebada, en una proporción no especificada por el proveedor, suministrado por la empresa Molifibra (Burgos, España). El material se trituró con un molino Retsch SM100, hasta alcanzar un tamaño de partícula inferior a 0,4 mm. Como modificadores del medio de reacción se utilizó etanol absoluto a dos concentraciones (20 % y 40 %, v/v), suministrado por VWR Chemicals. Entre los reactivos empleados para el desarrollo de las analíticas se encuentran el ácido sulfúrico (H_2SO_4), destinado tanto a la hidrólisis ácida de las muestras sólidas (98 % de pureza, Labbox, España) como a la fase móvil del HPLC (96 % de pureza, Suprapur-Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), y el carbonato cálcico (99 %, VWR, BDH Chemicals), utilizado en la neutralización de los hidrolizados. Para la identificación y cuantificación por HPLC se usaron los siguientes patrones comerciales: glucosa (99,5 %), xilosa (99 %) y arabinosa (99 %), de Sigma-Aldrich (Burlington, MA, EE. UU.); 5-hidroximetilfurfural (HMF, 97 %), de Biosynth Ltd. (Reino Unido); ácido acético (98 %), de VWR Chemicals; ácido fórmico (98 %), de Panreac AppliChem; y furfural (99 %), también de Sigma-Aldrich.

3.2 Equipos empleados y condiciones experimentales

3.2.1 Reactor de agua subcrítica

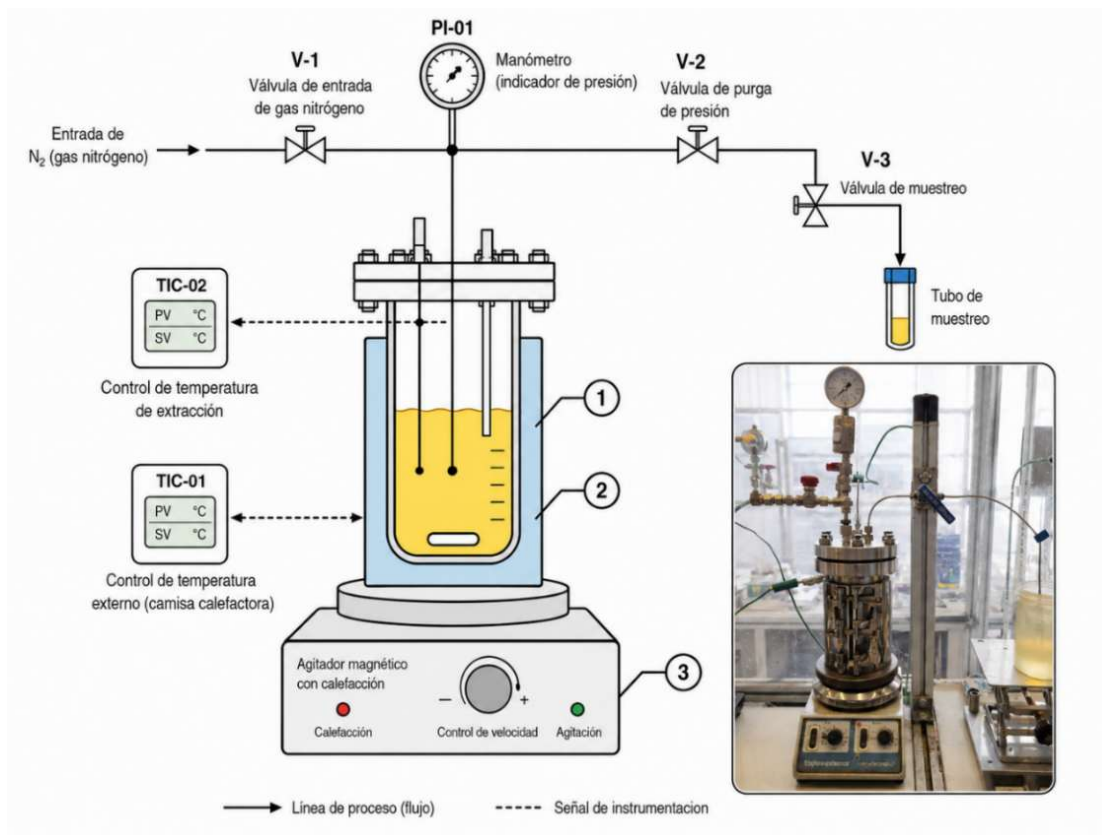


Figura 2. Esquema del reactor discontinuo de agua subcrítica grupo BIOIND. Diagrama técnico de diseño propio basado en el equipo discontinuo de agua subcrítica descrito por (Alonso-Riaño et al., 2023) (1) reactor de acero inoxidable; (2) camisa calefactora; (3) plato agitador magnético; V-1: válvula de entrada de N_2 ; V-2: válvula de purga de presión; V-3: válvula de muestreo; TIC-01: control de temperatura externo; TIC-02: control de temperatura de extracción; PI-01: manómetro. El esquema de referencia identifica el extractor de laboratorio, colector de muestras y válvulas principales del sistema de agua subcrítica.

El pretratamiento con agua subcrítica se llevó a cabo en un reactor discontinuo de tanque agitado (**Figura 2**), el cual corresponde con un diseño propio del grupo de investigación BIOIND y empleado previamente en estudios de escalado de la misma línea de trabajo (Alonso-Riaño et al., 2023). El recipiente, de acero inoxidable, tiene una capacidad máxima de 0,5 L y admite condiciones de hasta 60 bar y 250 °C. Presenta una camisa calefactora de cerámica (230 V, 4000 W, $\varnothing$ 95 mm, 160 mm de altura) que rodea el reactor, mientras que un sensor Pt100 conectado a un sistema PID controla y registra la temperatura interna durante todo el proceso. El montaje incluye, además, un plato agitador magnético, un manómetro y tres válvulas independientes destinadas a la entrada de nitrógeno, la purga de presión y la toma de muestras.

3.2.2 Condiciones experimentales

En cada experimento se cargaron $12,5 \pm 0,26$ g de biomasa de trigo y cebada junto con 250 mL de disolvente (5 %, p/v), variando su composición entre agua (T1 SW), etanol/agua al 20 % v/v (T2 20 % EtOH) y al 40 % v/v (T3 40 % EtOH). Aplicando para todos los tratamientos las mismas condiciones de operación de 175 ± 1 °C y 40 ± 2 bar, logrando estas condiciones presurizando con nitrógeno líquido en agitación constante a 500 rpm. Aplicando un periodo isoterma de 60 min, en el cual se extrajeron muestras cada 10 min a través de la válvula de muestreo, incluyendo una muestra a t_0 . Finalizado este periodo, se retiró la camisa calefactora y, una vez la temperatura descendió por debajo de 90 °C, se despresurizó el sistema y se recuperó el licor final con una muestra representativa a t_7 (fracción final) al abrir el reactor. El sólido residual se separó por filtración a vacío, se lavó y se secó a 105 °C hasta su posterior caracterización. Se registró el consumo energético tanto durante la rampa de calentamiento como en la fase isoterma (kW·h) y las muestras líquidas se almacenaron a -18 °C hasta su análisis.

3.2.3 Equipos de análisis

La cuantificación de azúcares, ácidos orgánicos y furanos se realizó mediante cromatografía líquida (HPLC Infinity II 1260, Agilent Technologies), con una columna Bio-Rad Aminex HPX-87H y su precolumna Micro-Guard Cation H⁺, acoplada a un detector de índice de refracción (RID) y un detector de longitud de onda variable (VWD). Como fase móvil se empleó ácido sulfúrico 0,005 M a un flujo de 0,6 mL/min, manteniendo columna y detector a 40 °C; el volumen de inyección fue de 10 μ L para todas las muestras. Este montaje reproduce el empleado habitualmente por el grupo BIOIND para el seguimiento de carbohidratos y productos de degradación en medio subcrítico (Alonso-Riaño et al., 2023).

El contenido de carbono, hidrógeno y nitrógeno de la materia prima se determinó en un analizador elemental FLASH 2000 (Thermo Scientific).

Para la auditoría de carbono soluble en el licor final de T1 (SW) se empleó un analizador de carbono orgánico total Shimadzu (TOC-V CSN), determinando carbono total (TC) y carbono inorgánico (IC) de cada fracción temporal.

La caracterización estructural de los sólidos, basada en el protocolo NREL/TP-510-42618, requirió además estufa de convección (105 ± 3 °C), mufla (575 ± 25 °C), autoclave (121 ± 3 °C), baño termostático (30 ± 3 °C), espectrofotómetro UV-Visible y balanza analítica con precisión de 0,1 mg.

3.3 Métodos analíticos

3.3.1 Análisis de fracciones líquidas

3.3.1.1 Cuantificación de azúcares, ácidos orgánicos y furanos por HPLC

Las fracciones líquidas correspondientes al licor se caracterizaron según el protocolo NREL/TP-510-42623 (Sluiter et al., 2008). Durante el periodo isoterma (t_0 - t_6) se extrajeron

muestras cada 10 min; al finalizar cada tratamiento se recuperó una alícuota como representación de licor final, registrando el volumen total del extracto líquido recuperado tras el enfriamiento y apertura del reactor.

Cada muestra se centrifugó (5000 rpm, 5-10 min) y se filtró (0,22 µm) antes de su inyección directa en HPLC, empleando el equipo y las condiciones descritas en los apartados 3.2.3, ajustadas para cuantificar conjuntamente azúcares, ácidos orgánicos y furanos en una sola inyección, en lugar de los métodos independientes que especifica el protocolo NREL/TP-510-42623 para cada familia de compuestos.

3.3.1.2 Hidrólisis ácida secundaria y cálculo de oligómeros

De forma paralela a la determinación en el licor no hidrolizado, una alícuota de cada muestra se sometió a hidrólisis ácida secundaria siguiendo los protocolos NREL (Sluiter et al., 2008), adicionando ácido sulfúrico e hidrolizando en autoclave a 121 °C por 1 h y, tras neutralización con carbonato cálcico hasta pH 5-6, se analizó por HPLC (las muestras hidrolizadas; Hz), obteniendo así los azúcares totales presentes en el licor. Al igual que en la caracterización de sólidos (apartado 3.3.2.1), las concentraciones monoméricas de glucosa, xilosa y arabinosa se convirtieron a su equivalente polimérico (glucanos y pentosanos) mediante el factor de corrección anhidro del protocolo NREL (0,90 para hexosas C6 y 0,88 para pentosas C5), asociado a la pérdida de una molécula de agua por cada enlace glicosídico hidrolizado.

Calculando los oligómeros hidrolizables mediante la diferencia entre ambas fracciones:

$$\text{Oligómeros} = H_z - N_H$$

(Ec. 1) **H_z**: fracción del licor hidrolizado; **N_H**: fracción del licor no hidrolizado

Representando la recuperación temporal de los azúcares como g de compuesto por 100 g de biomasa seca inicial (g.100 g⁻¹ BS), a partir de la concentración en la fracción Hz, el volumen de la fracción líquida total y la masa de la materia prima cargada.

$$\text{Recuperación}_t(100 \text{ g}^{-1}\text{BS}) = (C_{H_z} * V_t)/m_{BS}$$

(Ec. 2) **C_{H_z}**: concentración del azúcar en la fracción hidrolizada (Hz) al tiempo t; **V_t**: volumen de licor presente en el reactor inmediatamente antes de extraer la alícuota correspondiente a ese tiempo (calculado como el volumen total del licor recuperado menos la suma de las alícuotas ya extraídas en los tiempos anteriores). **m_{BS}** masa de biomasa seca cargada en el reactor.

3.3.1.3 Auditoría de carbono soluble (TOC y HPLC)

Se realizó el balance del carbono soluble únicamente para el licor final de T1(SW) (t₇), debido a que, en T2 (20 % EtOH) y T3 (40 % EtOH) el etanol residual del medio aportó una señal adicional de carbono orgánico no atribuida a la biomasa. Como la técnica de TOC no distingue el origen del carbono, el TC medido en estos tratamientos superó de forma sistemática al carbono explicado por HPLC, lo que limitó la separación analítica de la fracción de carbono procedente de la biomasa, y descartando cualquier comparación cinética entre tratamientos.

Para esta fracción se determinó el carbono total (TC) y el carbono inorgánico (IC) corrigiendo la señal frente a un blanco de agua MilliQ y aplicando el factor de dilución (FD) correspondiente (**TC_{corr}**).

$$C_{\text{soluble}} = (TC_{\text{corr}} \times V_T/1000)/m_{BS}$$

(Ec. 3) El carbono recuperado en la fracción final se normalizó respecto a la biomasa seca cargada (**m_{BS}**), a partir del volumen total del licor recuperado (**V_T**) representado como como mg C.g⁻¹BS. En relación con el IC su corrección con el blanco no resultó significativo, por lo que el TC se interpretó como carbono orgánico soluble total. El carbono explicado por HPLC se obtuvo convirtiendo cada compuesto cuantificado a su equivalente en masa de carbono mediante el múltiplo del factor (Fc), correspondiente a su fracción másica de carbono:

$$C_{HPLC}(mg\ C) = Concentración(mg) \times Fc \text{ (Ec. 4) donde } (Fc = n^{\circ}C \times 12,011) / PM \text{ (Ec. 5)}$$

El porcentaje de carbono explicado se calculó como el cociente entre el carbono total cuantificado por HPLC y el carbono soluble determinado por TOC.

3.3.2 Análisis de fracción sólida

3.3.2.1 Protocolo NREL: hidrólisis ácida analítica, AIL y ASL

La materia prima y los sólidos residuales (SR) se caracterizaron según el protocolo NREL/TP-510-42618 (Sluiter et al., 2012), aplicando una hidrólisis ácida en dos etapas: 300 mg de la muestra se trataron con 3 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 72 % (v/v) en baño térmico a 30 °C durante 1 h, aplicando agitación cada 10 min; la mezcla resultante se diluyó al 4 % (p/p) con agua destilada y se ingresó en autoclave a 121 °C durante 1 h.

Para obtener el residuo insoluble en ácido posterior al tratamiento térmico se realizó una filtración al vacío de la mezcla hidrolizada, a la cual se le realizaron lavados para retirar restos de material soluble remanente. Este sólido recuperado fue secado en estufa a 105 °C (12 h). Para la determinación de las cenizas totales se calcinó el residuo insoluble en mufla (575 °C) hasta peso constante y se calculó por diferencia gravimétrica entre el peso del crisol con residuo calcinado y el peso del crisol vacío, referido a la masa de muestra seca inicial:

$$\% \text{ Cenizas} = [(P_{crisol} + cenizas - P_{crisol}) / (m_{ODW}SR)] \times 100 \text{ (Ec. 6)}$$

$m_{ODW,SR}$ es el peso de la alícuota de la muestra corregido por su contenido de humedad ($m_{ODW,SR}$ = peso alícuota SR $\times$ (% de sólidos totales)/100). Por diferencia entre el residuo insoluble total y las cenizas se obtuvo la lignina insoluble en ácido (AIL).

La lignina soluble en ácido (ASL) se cuantificó por espectrofotometría UV-Vis a 240 nm, aplicando una constante de absorptividad de 25 L.g⁻¹.cm⁻¹, siendo este valor tabulado por el protocolo NREL para bagazo y adoptado ante la ausencia de una constante específica para mezclas trigo-cebada, criterio aplicado por tratarse igualmente de un residuo gramináceo no leñoso. En relación con los azúcares estructurales del hidrolizado se determinaron por HPLC, previa neutralización con carbonato cálcico hasta pH 5-6, con el equipo descrito en el apartado 3.2.3, y de igual forma las concentraciones monoméricas se convirtieron a su equivalente polimérico aplicando el factor anhidro.

Es importante señalar que el protocolo NREL no distingue, dentro del valor de AIL, la lignina estructural no removida de la lignina reprecipitada sobre el sólido durante el proceso de enfriamiento, fenómeno de recondensación descrito en gramíneas por Selig et al. (2007) y de forma general en tratamientos hidrotermales (Sun et al., 2022), mostrando una intensificación de su efecto en sistemas organosolv con etanol (Adamczyk et al., 2023).

3.3.2.2 Determinación de acetilos estructurales

El ácido acético cuantificado en el hidrolizado de cada muestra sólida (apartado 3.3.2.1) permitió estimar el contenido de acetilos estructurales equivalentes, mediante conversión estequiométrica a su grupo acetilo:

$$\begin{aligned} \text{Acetilos}_{eq} (mg) &= \text{ácido acético} (mg) \times ((PM\ CH_3CO^-) / (PM\ CH_3COOH)) \\ &= \text{ácido acético} (mg) \times 0,7114 \text{ (Ec. 7)} \end{aligned}$$

Estableciendo a 43,04 y 60,05 g.mol⁻¹ como las masas molares del grupo acetilo y del ácido acético, respectivamente. Este factor difiere del habitualmente empleado para convertir ácido acético a acetato (0,983), debido a que aquí se relacionó la fracción acetilo unida a la estructura de la hemicelulosa, no el acetato libre.

Para los sólidos residuales (SR), los acetilos se normalizaron respecto a la masa seca de la alícuota analizada, y se expresaron como porcentaje sobre el sólido residual seco:

$\%Acetilos_{eq}(\%SR) = (Acetilos_{eq} \text{ (mg)})/m_{ODW,SR} \times 100$ (Ec. 8) $m_{ODW,SR}$ corresponde al peso en base seca de la alícuota de sólido residual sometida a hidrólisis.

Esta composición porcentual fue la empleada para comparar los SR entre tratamientos (apartado 4.2.2).

Con respecto a la biomasa caracterizada, los acetilos se determinaron sobre una muestra independiente a la de cada sólido residual, como parte de la caracterización de la materia prima (apartado 4.1), y fueron expresados directamente como % sobre la biomasa seca inicial. Para representar la distribución de los acetilos entre sólido y licor se aplicó la misma conversión estequiométrica (Ec.7) al ácido acético cuantificado en el licor (NH, apartado 3.3.1.1), lo que permitió estimar la masa de acetilos recuperada en la fase líquida, siendo expresado como el porcentaje de la masa total de acetilos (sólido + licor) correspondiente a cada corriente.

3.3.2.3 Análisis elemental

En cuanto al contenido de carbono, hidrógeno y nitrógeno de la biomasa inicial se determinó en el analizador elemental FLASH 2000 (apartado 3.2.3), y se calculó el oxígeno por diferencia:

$$O(\%) = 100 - C(\%) - H(\%) - N(\%) - Cenizas(\%)$$
 (Ec. 9)

Este análisis se realizó únicamente sobre la materia prima inicial, de forma independiente al balance estructural de carbohidratos y lignina, con el objetivo de describir la proporción y predominio relativo de carbono y oxígeno en la composición elemental de la biomasa caracterizada.

3.3.3 Cálculo de proceso y balance de materia

3.3.3.1 Rendimiento, remoción aparente y recuperación en el licor

Para determinar el rendimiento gravimétrico de sólido residual (Y_{SR}) se estableció como el cociente entre la masa de sólido recuperado en base seca y la masa de biomasa seca cargada en el reactor:

$$Y_{SR} = (m_{SR,ODW}/m_{BS,inicial}) \times 100$$
 (Ec. 10)

La retención de cada componente estructural presentado en el balance (pentosanos, glucanos y lignina) se determinó a partir de la composición estructural del sólido residual ($\%i_{SR}$, apartado 3.3.2) y de Y_{SR} , normalizado respecto a su contenido inicial caracterizado (apartado 4.1):

$$Retención_i(\%) = ((\%i_{SR} \times Y_{SR}))/\%i_{Inicial}$$
 (Ec. 11)

En donde el $\%i_{SR} \times Y_{SR}/100$ corresponde a la masa del componente (i) retenida por cada 100 g de biomasa seca inicial; al dividirlo entre $\%i_{Inicial}$ se obtiene la fracción retenida respecto al contenido estructural de partida.

En cambio, por complemento de la retención se definió la **remoción aparente**, establecida como la fracción del componente (i) que no se cuantificó en el sólido residual:

$$Remoción_i(\%) = 100 - Retención_i(\%)$$
 (Ec. 12)

Los valores determinados para la remoción no son equivalentes a la recuperación real en el licor, ya que agrupa tanto lo transferido a la fase líquida como lo degradado o no contabilizado por ninguna de las dos vías analíticas (FNQ).

En cuanto a la recuperación total en el licor fue determinada a partir de la concentración de cada componente en la fracción hidrolizada del licor final (Hz, t_7 ; apartado 3.3.1.2) y normalizada respecto al contenido inicial del mismo componente:

$$Recuperación_{i,licor}(\%) = (m_{i,licor}/m_{i,inicial}) \times 100$$
 (Ec. 13)

En el caso de la lignina, solo se determinó su retención respecto a la biomasa seca inicial caracterizada (Ec. 11), sin descomponer el balance en recuperación en licor ni degradación, ya que no se cuantificaron polifenoles ni lignina soluble en la corriente líquida. Por este motivo,

la remoción aparente de lignina, se calculó como el complemento de esa retención (**Ec. 12**), debido a esa limitante no se interpretó como deslignificación real confirmada, sino únicamente como la pérdida de masa del componente respecto al sólido inicial.

3.3.3.2 Factor de severidad y no isotérmico, $\log R_0$

Se integró el factor de severidad para evaluar el efecto entre la temperatura y el tiempo de permanencia, lo que unifica una variable como severidad y permite comparar los diferentes tratamientos térmicos (Ruiz et al., 2021). En los tiempos de permanencia correspondientes a la fase isotérmica el factor de severidad se expresa como:

$R_0 = t \cdot \exp \left[\frac{T-100}{14,75} \right]$ (**Ec. 14**) siendo T la temperatura de operación y 14,75 °C es el parámetro empírico asociado a la energía de activación para la ruptura de los enlaces glicosídicos (78,5 kJ.mol⁻¹).

Para integrar la contribución de la severidad aportada previa a la fase isotérmica debido a que la rampa de calentamiento no es instantánea, se calculó mediante la integración no isotérmica del perfil térmico, según la formulación de Overend y Chornet (1987) revisada por Ruiz et al. (2021):

$$R_0 = \int_{100}^{t_{max}} \exp \left[\frac{(T(t)-100)}{14,75} \right] dt \quad (\text{Ec. 15})$$

Estableciendo una rampa lineal desde la temperatura ambiente ($T_0 = 23$ °C) hasta la temperatura nominal establecida a 175 °C:

$$T(t) = T_0 + \beta \cdot t \quad (\text{Ec. 16}) \text{ en donde } t_{100} = \frac{100 - T_0}{\beta}$$

Siendo β la pendiente media de calentamiento cada tratamiento, reportada en el apartado 4.2.1. Se realizó solo la integración correspondiente $T > 100$ °C, ya que se consideró despreciable la contribución por debajo de esa temperatura.

Para calcular la contribución en el periodo isoterma, se determinó el $\log R_0$ acumulado en cada fracción temporal (t_0 - t_6) y se calculó sumando la contribución isotérmica de cada intervalo Δt al $\log R_0$ de rampa, esto alineado a lo descrito por (Ruiz et al., 2021) **Ec. 13**:

$$\log R_0^{acum} = \log \left[R_0^{rampa} + \sum_i \Delta t_i \cdot \exp \left(\frac{175 - 100}{14,75} \right) \right] \quad (\text{Ec. 17})$$

La severidad acumulada calculada se empleó para representar el rendimiento de furfural y HMF (apartado 4.2.4).

3.3.3.3 Balance estructural global y fracción no cuantificada

Para los productos de degradación partiendo de la concentraciones de furfural y HMF cuantificados por HPLC en las muestras no hidrolizadas del licor de extracción (NH, apartado 3.3.1.1), se representaron mediante su equivalente estructural degradado aplicando la conversión estequiométrica con respecto a sus polisacáridos precursores, al atribuir el HMF a los glucanos estructurales y el furfural a los pentosanos estructurales, bajo la relación molar 1:1 entre cada monosacárido precursor y su producto de deshidratación:

$$Glucano_{eq}(mg) = HMF(mg) \times 1,286 \quad (\text{Ec. 18})$$

$$Pentosano_{eq}(mg) = Furfural(mg) \times 1,375 \quad (\text{Ec. 19})$$

Donde los factores 1,286 y 1,374 resultan del cociente entre la masa molar del anhidro monómero estructural (162 y 132 g.mol⁻¹ para glucano y pentosano) y la del producto de deshidratación (126,11 g.mol⁻¹ para HMF y 96,08 g.mol⁻¹ para furfural).

En donde estos equivalentes se expresaron respecto al contenido inicial de glucanos o pentosanos determinado en la caracterización de la biomasa (apartado 4.1), en:

$$\text{Degradación}_i (\%) = (i_{eq}/m_{i, inicial}) \times 100 \text{ (Ec. 20)}$$

En cuanto a la fracción no cuantificada (FNQ) se obtuvo como diferencia a partir la suma de la contribución de la remoción aparente, la recuperación en el licor y la degradación estructural cuantificada de cada componente estructural:

$$\text{FNQ}_i (\%) = \text{Remoción}_i (\%) - \text{Recuperación}_{\text{licor}, i} (\%) - \text{Degradación}_i (\%) \text{ (Ec. 21)}$$

Cuando el cierre del balance arrojó un valor de FNQ negativo en algún componente, se consideró que la muestra final (t_7) no era representativa de la recuperación real en el licor para ese tratamiento. Realizando una conciliación para calcular la recuperación en el licor mediante la relación de dos estimadores independientes: la recuperación acumulada por el muestreo temporal, obtenida como la suma del producto ponderado entre la concentración y el volumen real de cada fracción, entre t_0 y t_6 .

Nota: Esta conciliación se aplicó individualmente a monómeros y oligómeros de glucano, xilano y arabinano en T2, sin modificar las concentraciones obtenidas por HPLC, solo corrigió su contribución al balance global.

3.3.4 Análisis estadístico

Para la caracterización de las muestras, la medición se realizó por duplicado, y se expresaron los resultados como el valor medio y su SD $\pm$. Antes del análisis de significancia, se verificó la normalidad y la homogeneidad de varianza de los residuos mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene, respectivamente; ambas arrojaron valores de p superiores a 0,05, lo que indica que no se detectaron desviaciones significativas frente a los supuestos de distribución normal y varianzas homogéneas. Cumplidos estos supuestos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor (exploratorio) mediante el software Statgraphics, con el fin de identificar diferencias estadísticamente significativas en la retención de lignina y sus fracciones (soluble e insoluble) entre tratamientos. La comparación de medias y la determinación de grupos homogéneos se realizaron mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, con un nivel de confianza del 95 % ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Composición de la materia prima

4.1.1 Caracterización inicial de la matriz lignocelulósica

En la **Figura 3** se presenta la composición relativa de la biomasa inicial caracterizada, correspondiente a un residuo agroindustrial mixto de trigo y cebada. Sobre la materia en base seca, los glucanos fueron la fracción mayoritaria (38 %), seguidos de la lignina total (24,9 %) y la hemicelulosa (19,4 %) (xilanos + arabinanos). Representando un cierre de componentes cuantificados al integrar los extractivos acuosos (8,90 %) y etanólicos (1,13 %), proteínas (2,67 %) y lípidos (1,86 %), cuantificados en la caracterización, pero sin fines comparativos en el presente estudio. La humedad inicial ($2,63 \pm 0,18$ %) se usó para corregir la masa cargada y no se incorporó al cierre, expresado sobre material seco. El ácido acético cuantificado en los extractivos se incorporó al balance como acetilo estructural equivalente, por su relación con las sustituciones acetiladas de la hemicelulosa.

El análisis elemental mostró una composición dominada por carbono y oxígeno ($46,0 \pm 0,5$ % C; $42,46 \pm 0,5$ % O; $5,71 \pm 0,09$ % H; $0,29 \pm 0,07$ % N), cerrando de forma independiente al balance estructural de la **Figura 3**.

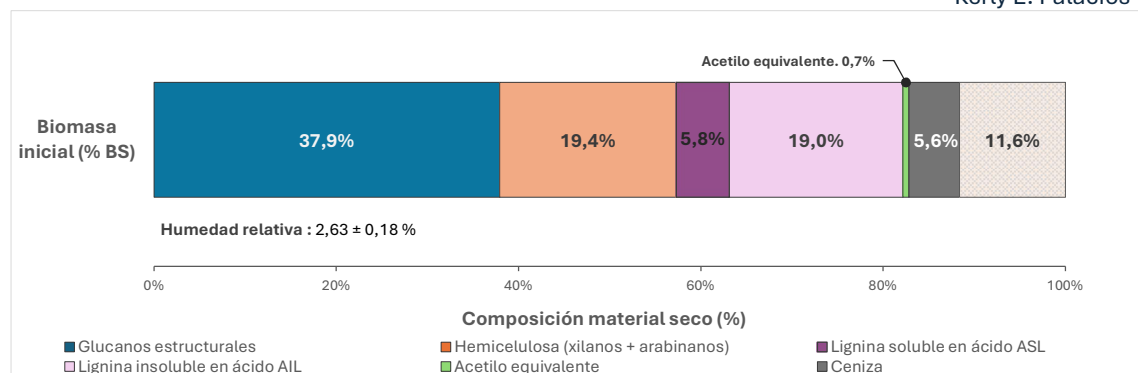


Figura 3. Composición relativa de la biomasa inicial caracterizada (Paja trigo-cebada). Los porcentajes están referidos a la biomasa seca inicial. La hemicelulosa incluye xilanos y arabinanos; la lignina se expresa como AIL y ASL. El acetilo equivalente se estimó por conversión estequiométrica del ácido acético. La fracción Otros/FNQ corresponde al remanente hasta 100 % la cual incluye los extractivos, proteínas, lípidos y otros compuestos que fueron cuantificados en la BS caracterizada y que no serán relacionados ni cuantificados en las corrientes generadas del estudio.

La composición de la BS inicial se aproxima a la de una matriz graminácea. En glucanos, la biomasa estudiada (37,92 %) resulta comparable a la paja de trigo; Cornejo *et al.* (2019), como se cita en Martín *et al.*, (2022), reportan un 34,0 % de celulosa, y Serna-Loaiza *et al.*, (2022) indican un 35,31 % de glucano. En cambio, la hemicelulosa de esta biomasa (19,4 %) fue menor que en ambas referencias (22,9 % y 21,94 % de xilano + 2,13 % de arabinano, respectivamente), mientras que la lignina total resultó más elevada (24,86 % frente al 15,0 – 17,35 % de la literatura), lo cual sugiere la presencia de una matriz potencialmente más recalcitrante, siendo esto congruente con Sun *et al.*, (2022), quienes describen que un elevado contenido de lignina inicial (24,86 %) actúa como una barrera física de recalcitrancia que limita la accesibilidad del disolvente a los polisacáridos estructurales de la pared celular.

Estas diferencias composicionales son coherentes con que el material no corresponde a paja de trigo pura, sino a una mezcla de trigo y cebada en proporciones no definidas. Frente al bagazo cervecero sin tratar Parchami *et al.*, (2022), reportan un 14,69 % de celulosa, 16,28 % de almidón, con un 22,98 % lignina total, además de proteína y grasa relevantes), esta comparación confirma que residuos asociados a cebada o malta pueden diferir de forma considerable con la paja lignocelulósica.

Esta comparación con matrices de referencia ubica la composición inicial dentro de los rangos esperados para gramíneas, estableciendo el punto de partida para evaluar cómo esta proporción relativa de lignina y hemicelulosa observada condiciona la respuesta de la matriz al pretratamiento subcrítico con y sin el modificador.

4.2 Hidrólisis en medio subcrítico

4.2.1 Gradiente de calentamiento y consumo energético

La etapa de calentamiento previa al periodo isoterma mostró variabilidad entre tratamientos, con tiempos de rampa entre 15 y 36 min y pendientes de calentamiento entre 4 y 10 °C/min para alcanzar la temperatura nominal de 175 °C. Esta variabilidad se reflejó también en la severidad acumulada durante la rampa ($\log R_0$ entre 2,37 y 2,75) y en el consumo energético total (entre 0,639 y 0,696 kW.h). Para no subestimar la exposición térmica real de cada tratamiento, esta variabilidad se incorporó al cálculo de la severidad acumulada correspondiente a la rampa más el periodo isoterma, empleada para relacionar el rendimiento de furfural y HMF con la severidad del proceso (apartado 4.2.4).

4.2.2 Composición relativa del sólido residual

Tras la extracción subcrítica, los sólidos residuales se recuperaron, secaron y corrigieron a base seca. El rendimiento gravimétrico obtenido se mantuvo en un rango similar entre tratamientos, entre 49,20 % para T2, 54,94 % en T3 y con 53,81 % en T1 (SW).

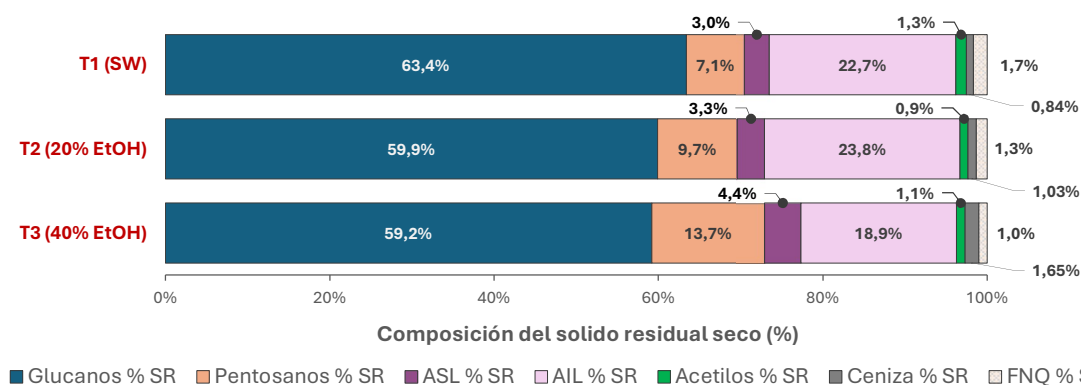


Figura 4. Composición relativa estructural del sólido residual (%SR) tras la extracción subcrítica. Los porcentajes están referidos al sólido residual seco (%SR). Los pentosanos incluyen xilanos y arabinanos. la lignina se diferencia en ASL y AIL. FNQ corresponde al remanente no cuantificado por diferencia.

La composición relativa (**Figura 4**) confirmó el predominio de glucanos en los tres tratamientos, con un mayor enriquecimiento en T1(SW) de 63,38 %. Los pentosanos aumentaron de forma progresiva con la proporción de etanol (de 7,06 % en T1 a 13,72 % en T3), indicando que el sólido de T3 quedó relativamente menos empobrecido en hemicelulosa. Este patrón es consistente con la mayor susceptibilidad de las hemicelulosas en tratamientos hidrotermales, asociada a su carácter amorfo y menor grado de polimerización frente a la celulosa (Martín et al., 2022).

En relación con la composición de la lignina total, fue mayor en T2 con un 27,12 % SR, seguida de T1 (25,75 %) y T3 (23,34 %). En todos los casos predominó AIL sobre ASL, presentando relaciones AIL/ASL similares entre T1 y T2 (7,44 y 7,12), siendo esta diferencia coherente con la incorporación moderada (20 %) de etanol al medio de reacción. En cambio, T3 mostró una relación notablemente menor de 4,27 junto con una mayor proporción de ASL (4,43 % SR), lo que sugiere una lignina relativamente más fragmentada o con mayor contribución soluble en ácido. Este comportamiento es coherente con lo descrito para tratamientos organosolv, donde la lignina puede fragmentarse y parcialmente redisolverse, pero también precipitar sobre las fibras durante el enfriamiento lo que puede sobredimensionar la fracción de AIL medida en el sólido residual (Adamcyk et al., 2023; Sun et al., 2022).

Los acetilos residuales se mantuvieron bajos en todos los casos, acorde con la elevada solubilización de la hemicelulosa a la que se encuentran mayoritariamente unidos; la ceniza y la FNQ completaron el cierre del balance al 100 % en los tres tratamientos (**Figura 4**).

Los resultados sugieren que T1(SW) produjo la matriz con mayor enriquecimiento en glucanos y menor contenido de pentosanos; T2 (20 % EtOH) generó el sólido con mayor lignina total y AIL relativa; y T3 (EtOH 40 %) conservó más pentosanos, con menor lignina total pero mayor contribución de ASL. Este patrón composicional de T3, de menor lignina y mayor retención de pentosanos, fue observado también por Ma et al. (2024) en paja de maíz tratada con sistema agua-etanol subcrítico a 220 °C, donde el contenido de lignina en el sólido residual fue 13,92 p/p menor que en el tratamiento con agua subcrítica pura.

4.2.3 Recuperación y retención de carbohidratos estructurales

4.2.3.1 Retención de glucanos y remoción de pentosanos

El destino de los carbohidratos estructurales mostró un comportamiento claramente diferenciado entre pentosanos y glucanos (**Figura 5**).

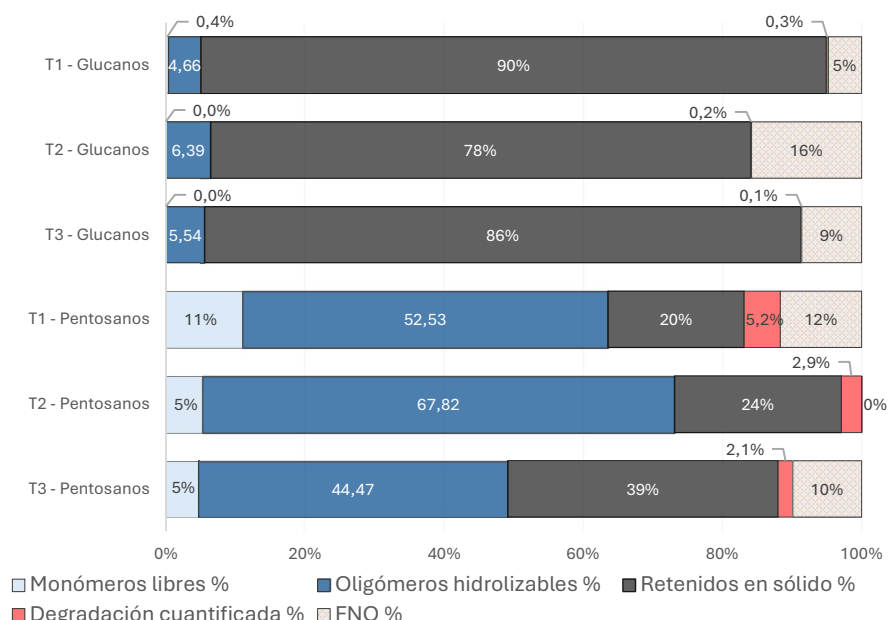


Figura 5. Balance integrado final de carbohidratos estructurales. El balance se encuentra relacionado respecto al contenido estructural inicial caracterizado de cada familia de carbohidratos (% BS) los FNQ corresponden a la fracción no cuantificada/ no asignada.

En pentosanos, T1(SW) presentó la menor retención en sólido con un 19,58 % y la mayor remoción aparente (80,42 %), aunque solo 63,56 % de esa fracción fue recuperada efectivamente en el licor. T2 (EtOH 20 %) alcanzó la mayor recuperación en licor (73,11 %), dominada principalmente por oligómeros hidrolizables, con la menor degradación cuantificada asociada como furfural (2,90 %); pero para este tratamiento el cierre del balance en pentosanos arrojó un valor de FNQ negativo (- 0,67 %), principalmente vinculado a la fracción oligomérica, lo que indicó que la muestra t_7 no resultó representativa de la recuperación real en el licor. Siendo este comportamiento consistente con la sensibilidad de los carbohidratos oligoméricos a fenómenos de insolubilización durante el enfriamiento del reactor (Adamczyk *et al.*, 2023). Por esta razón, se aplicó la conciliación descrita en el apartado 3.3.3.3 ([ver metodología](#)). T3 (40 % EtOH) conservó la mayor fracción de pentosanos en el sólido con un 38,87 %, y una recuperación en licor de 49,14 %, lo que indica que el incremento de etanol al 40 % no favoreció la transferencia de pentosanos al licor en las condiciones ensayadas.

Los glucanos permanecieron mayormente retenidos en el sólido en los tres tratamientos (**Figura 5**), con valores entre 77,64 % (T2) y 89,90 % (T1). La recuperación en licor no superó el 6,39 % en ningún caso, en donde la glucosa libre monomérica solo fue detectable en T1 (0,36 %) y la degradación atribuida a HMF se mantuvo por debajo de 0,27 %. Esta resistencia a la solubilización de los glucanos es coherente con la mayor estabilidad estructural de la celulosa frente a las hemicelulosas, que son amorfas y de menor grado de polimerización y se solubilizan con mayor facilidad entre 150 y 230 °C bajo condiciones hidrotermales (Martín *et al.*, 2022; Ruiz *et al.*, 2021).

Como resultado los tratamientos actuaron preferentemente sobre los pentosanos, con formación mayoritaria de oligómeros hidrolizables en el licor, mientras que los glucanos permanecieron retenidos al sólido residual con una mínima transferencia al licor, presentando

una degradación despreciable. T1(SW) mostró el perfil de mayor hidrólisis preferencial, con máxima remoción de pentosanos, pero moderada recuperación efectiva en el licor. T2 (20 % EtOH) logró la mayor recuperación de pentosanos como oligómeros y T3 (40 % EtOH) se diferenció por una menor transferencia de pentosanos al licor conservando la mayor proporción de pentosanos retenidos en el sólido. Esta diferencia identificada entre T1 - T3 es consistente con lo reportado por (Ma et al., 2024) quienes observaron que el agua subcrítica fue más eficiente para remover hemicelulosa que el sistema agua-etanol (bajo condiciones distintas) en paja de maíz.

4.2.3.2 Proporción monomérica y oligomérica

En el licor final (t_7), la recuperación soluble de carbohidratos estructurales estuvo dominada principalmente por formas oligoméricas hidrolizables en todos los tratamientos (**Figura 6**).

En pentosanos, T2 (20 % EtOH) presentó la mayor recuperación oligomérica respecto al contenido inicial con un 67,82 % y a su vez la mayor proporción oligomérica dentro de la fracción soluble (92,77 %).

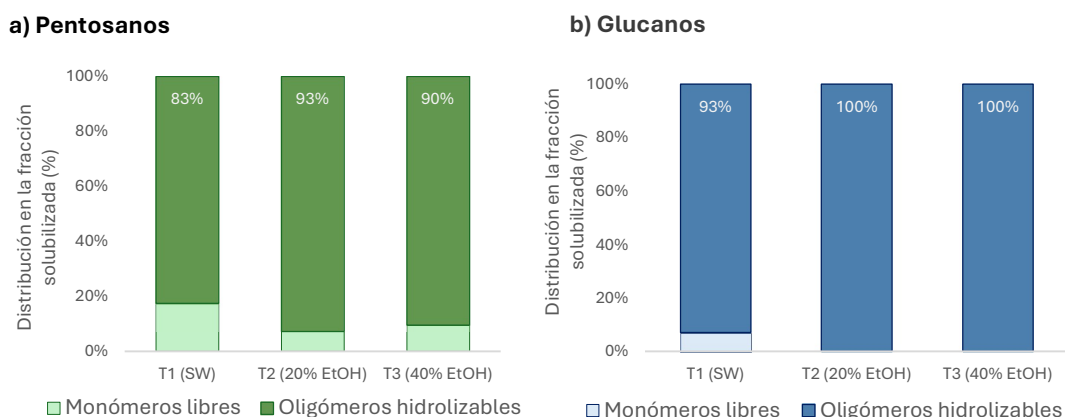


Figura 6. Proporción monomérica/oligomérica de la fracción solubilizada al tiempo final t_7 . Los valores de monómeros y oligómeros se expresan respecto al contenido estructural inicial de cada familia de carbohidratos la BS caracterizada; la distribución interna entre ambas formas se presenta como porcentaje de la fracción soluble total recuperada.

En contraste T1(SW), aunque con menor recuperación oligomérica, registró la mayor proporción de monómeros libres (17,36 % de su fracción soluble), lo que sugiere una actividad preferencial más marcada hacia hidrólisis monomérica bajo el tratamiento hidrotermal. En cambio, T3 (40 % EtOH) mantuvo un predominio oligomérico del 90,49 % de la fracción soluble, pero con menor recuperación soluble total (**Figura 6a**), lo cual es coherente con la mayor retención de pentosanos en el sólido descrita previamente.

Para los glucanos, la transferencia de soluble fue mucho menor y estuvo casi completamente asociada a glucooligómeros (**Figura 6b**). T2 y T3 no presentaron glucosa libre detectable, mientras que T1 mostró solo 7,17 % de monómeros dentro de su fracción soluble. La movilización de glucanos, cuando fue detectada, no correspondió a una hidrólisis completa hasta glucosa monomérica, sino a una liberación limitada de oligómeros. Esta liberación restringida de glucooligómeros se asocia a fracciones no cristalinas de la pared vegetal. Como lo señala Serna-Loaiza et al., (2022), los pretratamientos con agua subcrítica y organosolv no hidrolizan la fracción de celulosa.

Este predominio oligomérico es consistente con lo descrito por Martín et al., (2022), al describir que, bajo condiciones suaves o intermedias de severidad, las hemicelulosas se disuelven de forma preferencial como mezclas complejas con predominio de oligosacáridos de diferente grado de polimerización.

En conjunto, T1(SW) presentó el perfil con mayor proporción monomérica de pentosanos, favoreciendo un mayor grado de hidrólisis de la fracción soluble, en cambio T2 (20 % EtOH) concentró la mayor recuperación oligomérica y T3 (40 % EtOH) mantuvo su predominio oligomérico con menor transferencia soluble total recuperado en el licor. En glucanos, los tres tratamientos compartieron un perfil de baja solubilización y recuperación predominantemente oligomérica.

4.2.3.3 Cinética de liberación de azúcares

La cinética de liberación de azúcares totales solubilizados (monómeros + oligómeros) mostró que el medio de extracción modificó el grado y el patrón cinético de liberación al medio de reacción (**ver Figura 7, a y b**). Para este apartado los valores se expresan como g de azúcares totales hidrolizables (monómeros + oligómeros) contenidos en 100 g⁻¹ BS seca analizada y no representan recuperación respecto al contenido estructural inicial caracterizado.

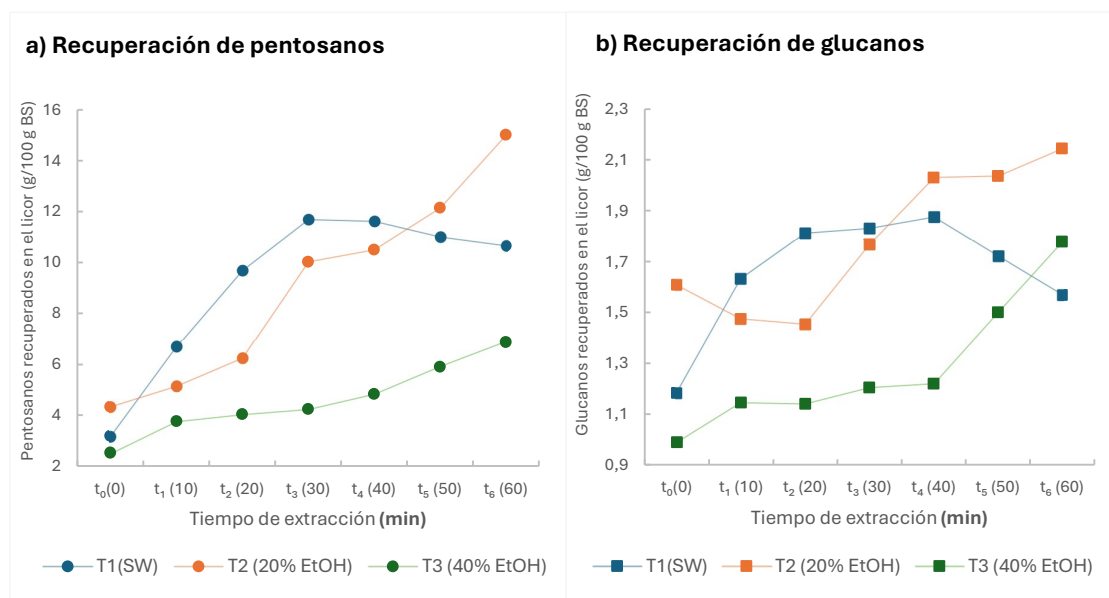


Figura 7. Recuperación temporal, distribución soluble y balance integrado de carbohidratos estructurales tras la extracción subcrítica. Cinética de recuperación de carbohidratos estructurales (**a**) Pentosanos y (**b**) glucanos recuperados durante el período isoterma, expresados como g.100 g⁻¹ BS seca analizada a partir de muestras hidrolizadas (Hz); estos valores no representan porcentaje de recuperación respecto al contenido estructural inicial caracterizado.

En relación con los pentosanos (**Figura 7a**), T1(SW) alcanzó un máximo de 11,68 g.100 g⁻¹ BS en t₃, seguido de un descenso hasta 10,65 en t₆. Esta caída es consistente con lo indicado por (Illera et al., 2025), quienes describen que en medio subcrítico la concentración de pentosas libres alcanza un máximo tras el cual la degradación hacia furfural y ácido fórmico supera la velocidad de solubilización. En contraste, T2 (20 % EtOH) mostró una liberación más gradual, pero con tendencia sostenida, sin un punto de inflexión descendente, logrando alcanzar su valor más alto en t₆ (15,01 g.100 g⁻¹ BS). Por su parte, T3 (40 % EtOH) mantuvo la menor recuperación durante todo el periodo, con un aumento continuo pero moderado hasta 6,87 g.100 g⁻¹ BS en t₆.

En relación con los glucanos (**Figura 7b**), la recuperación fue mucho menor. T1(SW) reprodujo el patrón de inflexión (máximo en t₄, con un descenso posterior), en cambio T2 (20 % EtOH) mostró un crecimiento sostenido hasta t₆ y T3 (40 % EtOH) mostro valores estables hasta t₄ con un incremento tardío.

Cabe destacar que la presencia de azúcares observadas desde t₀ confirma que parte del fraccionamiento ocurrió previo al periodo isoterma durante la rampa de calentamiento. En

contraste T1 presentó el perfil más rápido, pero con degradación evidente a partir de t_3 , T2 reflejó la mayor recuperación final sin caída por degradación; y T3 se caracterizó por una menor transferencia de azúcares solubilizados al licor.

4.2.3.4 Balance integrado de carbohidratos estructurales

El balance integrado de carbohidratos estructurales (**Figura 5**) distribuyó el 100 % de cada familia de carbohidratos entre monómeros libres, oligómeros hidrolizables, fracción retenida en sólido, degradación cuantificada y FNQ, con lo que se completó el destino de pentosanos y glucanos descrito en el apartado 4.2.3.1.

En relación con los pentosanos, el cierre del balance dejó una FNQ de 11,66 % en T1 y 10 % en T3. En T2, el balance calculado directamente sobre la muestra t_7 arrojó una FNQ negativa, por lo que se aplicó la conciliación descrita en el apartado 3.3.3.3, tras la cual la FNQ se redujo a prácticamente cero.

Para los glucanos, la FNQ alcanzó su valor más alto en T2 (15,82 %), lo que sugiere posibles pérdidas no asociadas a degradación cuantificable por las vías analíticas empleadas.

4.2.4 Productos de degradación y severidad química del licor

La formación de productos de degradación en el licor se describió mediante dos representaciones complementarias. Para el furfural y HMF, el rendimiento se representó como el porcentaje respecto al contenido estructural inicial correspondiente (pentosanos y glucanos) frente al factor de severidad acumulado (**Figura 8; a y b**). Para el ácido fórmico, debido a su origen de múltiples rutas, se representó su acumulación temporal en $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ BS}$ (**Figura 9**), resumiendo, los valores finales de t_7 en la **Tabla 1**.

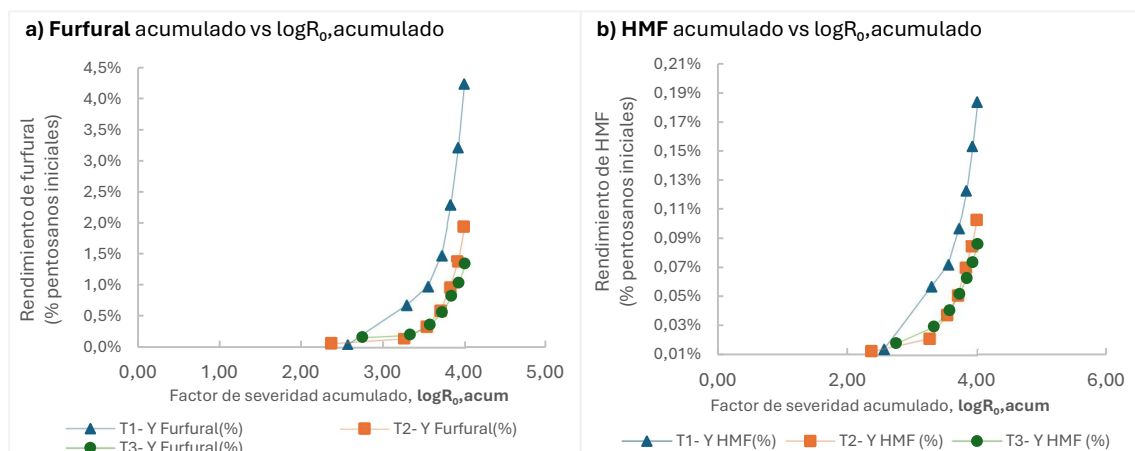


Figura 8. Cinética temporal de formación de productos de degradación en el licor durante el pretratamiento subcrítico. (a) Rendimiento de furfural (%) respecto a pentosanos iniciales) (b) Rendimiento de HMF (%) respecto a glucanos iniciales). Ambos frente al $\log R_0$ acumulado.

El furfural fue el producto de degradación principal. Evaluando los tratamientos con un igual grado de severidad, T1 (SW) generó un rendimiento considerablemente mayor que T2 (20 % EtOH) y T3 (40 % EtOH) en todo el rango de $\log R_0$ (**Figura 8a**), alcanzando hasta el 4,24 % de los pentosanos iniciales al final del del análisis temporal en t_6 ($\log R_0 \approx 4,00$). En comparación, T2 y T3 mostraron perfiles muy similares a una severidad baja, pero se identificaron diferencias a partir de un $\log R_0$ próximo a 3,7, en donde T2 superó a T3 (1,94 % vs. 1,34 % al final). Esta separación progresiva entre los tres tratamientos a igual severidad térmica sugiere que la composición del medio condicionó el grado de la deshidratación de pentosas. Siendo este patrón coherente con Illera et al., (2025), quienes describen que en medio subcrítico la xilosa se isomeriza a xilulosa y se deshidrata a furfural como ruta dominante a temperaturas próximas a los 180° C, y con Parchami et al., (2022) quienes atribuyen una menor degradación de los azúcares en medios con presencia de etanol, debido

a la reducción de la concentración de iones hidronio generado por cambios en la constante de disociación de los ácidos orgánicos liberados.

En relación con el HMF se mantuvo en valores muy bajos (**Figura 8b**), con un rendimiento final máximo de 0,18 % de los glucanos iniciales en T1, esto confirma la estabilidad de la fracción estructural de glucanos bajo las condiciones evaluadas.

En cuanto al ácido fórmico, acumuló los valores más altos en T1 (1,02 g.100 g⁻¹ BS en t₇), mientras que T2 y T3 presentaron valores finales comparables entre si (0,54 y 0,55, respectivamente) (**Tabla 1 y Figura 9**). En relación con esto Illera et al., (2025) identifican el ácido fórmico como producto de degradación tanto de pentosas como de furfural, lo que explica su mayor acumulación en T1, donde ambas rutas presentaron mayor actividad. Cabe destacar que T1 presentó el menor valor de ácido fórmico a t₀ (0,09 g.100 g⁻¹ BS frente a 0,16 y 0,18 en T2 y T3), pero a partir de t₂ su acumulación se aceleró y superó a los demás tratamientos, lo cual es consistente con la identificación de una mayor actividad de degradación secundaria en el medio hidrotermal.

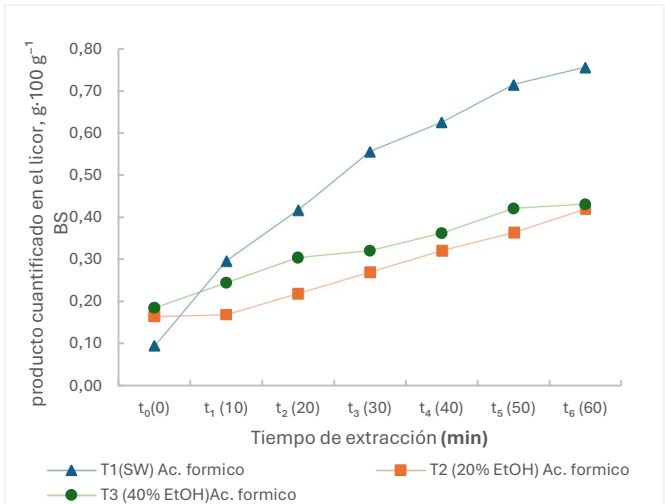


Figura 9. Formación temporal de Ácido Fórmico en el licor. Los valores representan ácido fórmico cuantificado en el licor durante la extracción subcrítica, expresado como g.100 g⁻¹ BS. Las muestras corresponden a fracciones temporales tomadas desde t₀, hasta t₆, tras 60 min de extracción.

Es importante señalar, que se observó un desacople (patrón inverso) entre la severidad de la rampa de calentamiento (T3 > T1 > T2) y la formación final de productos de degradación (T1 > T2 > T3), esta disparidad en junto con la convergencia del logR₀ acumulado a 60 min (≈ 4,00 en los tres tratamientos), indicando, que la diferencia observada no puede atribuirse únicamente a la exposición térmica.

Lo que sugiere que la composición del medio (modulada por la proporción de etanol) influyó en el grado de actividad de las reacciones de degradación, aspecto que el factor de severidad clásico no incorpora como variable química del proceso (Ruiz et al., 2021).

Tabla 1. Formación final normalizada de productos de degradación en el licor (g/100g BS seca)

Tratamiento	Furfural t ₇	Ácido fórmico t ₇	HMF t ₇
T1 (SW)	0,73	1,02	0,08
T2 (20 % EtOH)	0,42	0,54	0,05
T3 (40 % EtOH)	0,29	0,55	0,04

Nota. Productos cuantificados en el licor final (t₇) y normalizados como g.100 g⁻¹ BS. Furfural y HMF se asociaron al balance de degradación de pentosanos y glucanos, respectivamente. El ácido fórmico se interpretó como producto secundario de rutas pentosas/furfural y no se incorporó estequiométricamente al balance.

4.2.5 Desacetilación y perfil autocatalítico del licor

El ácido acético (AcOH) cuantificado en el licor no hidrolizado se empleó como indicador del grado de desacetilación de la BS y de la intensidad autocatalítica de los medios de reacción.

En el análisis cinético del periodo isoterma, se observó que T1(SW) acumuló la mayor concentración de AcOH (**Figura 10**) alcanzando en la fracción final 2,24 g.100 g⁻¹ BS (t₇), frente a 1,76 detectado en T2 (20 % EtOH) y 1,73 en T3 (40 % EtOH) (**Tabla 1**). Esta diferencia indicó que el tratamiento acuoso favoreció una desacetilación más intensa, consistente con la mayor remoción de pentosanos y la mayor formación de furfural y ácido fórmico descritas en los apartados anteriores para el T1.

En cambio, la menor acumulación en T2 y T3 es coherente con dos mecanismos relacionados: la menor disponibilidad de H₃O⁺ en presencia de etanol, que redujo la velocidad de hidrólisis de los grupos acetilo, y la menor acidez efectiva del licor. Bajo este contexto Parchami *et al.* (2022) observaron experimentalmente que el pH del licor aumento de forma consistente en presencia de 50 % de etanol. Relacionado a ello (Grunwald & Berkowitz, 1951) como fuente fundamental del comportamiento termodinámico demostraron que el pKa del ácido acético aumenta de forma progresiva con la fracción de etanol en mezclas etanol-agua (de 4,76 en agua pura a 6,29 en 65 % etanol a 25 °C), esto reduce la concentración efectiva de protones por unidad de ácido presente en el medio, aunque se requiere confirmar estos valores a las condiciones subcríticas para su confirmación lo que requeriría mediciones específicas de pKa a 175 °C y 40 bar.

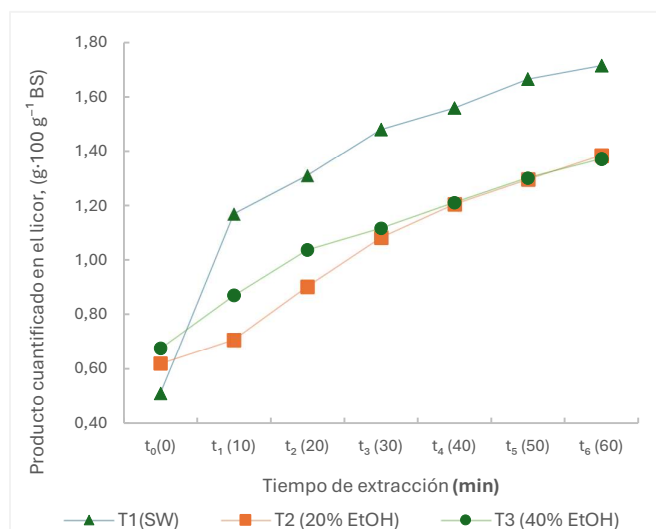


Figura 10. Formación temporal de ácido acético en el licor. Los valores representan ácido acético cuantificado en el licor durante la extracción subcrítica, expresado como g.100 g⁻¹ BS seca.

En relación con la distribución de acetilos estructurales entre el sólido y licor fue similar en los tres tratamientos (sólido: ≈30 % retenido; licor: 70 % recuperado). Esta proporción, independiente del medio de reacción, sugiere que una fracción de hemicelulosa acetilada permaneció asociada al sólido residual tras la extracción, lo que puede contribuir a la formación de posibles estructuras de tipo complejos recalcitrantes ligninas - carbohidrato (LCC) en la matriz, las cuales limitan la accesibilidad a los glucanos, evidenciada por su baja recuperación en el licor.

Cabe destacar que los valores totales de acetilos equivalentes recuperados (17 - 23 mg.g⁻¹ BS) superaron el contenido de acetilos estructurales iniciales (6,6 mg. g⁻¹ BS), lo que sugiere que parte del AcOH detectado se originó de rutas secundarias de degradación de carbohidratos, lo que limita su interpretación como indicador exclusivo de desacetilación.

El análisis del AcOH indicó que T1 presentó la mayor intensidad autocatalítica, T2 y T3 mostraron una disminución proporcional al contenido de etanol, y la distribución sólida/licor resultó independiente del medio de reacción.

4.2.6 Retención, recuperación y redistribución de lignina

La lignina total inicial caracterizada fue de $24,86 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ BS}$. En el presente estudio no se cuantificaron los polifenoles totales ni la lignina soluble en el licor, por ende, la diferencia entre la lignina inicial y la retenida en el sólido normalizada respecto al contenido de la BS inicial seca ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ BS}$) se denominó remoción aparente, y no se interpreta como recuperación por designificación real confirmada.

En relación con la lignina total retenida se observó una disminución en el orden de T1(SW) con $13,85 > \text{T2 (20 \% EtOH)} (13,33) > \text{T3 (40 \% EtOH)} (12,82 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ BS})$, con una remoción aparente inversa (**Figura 11**).

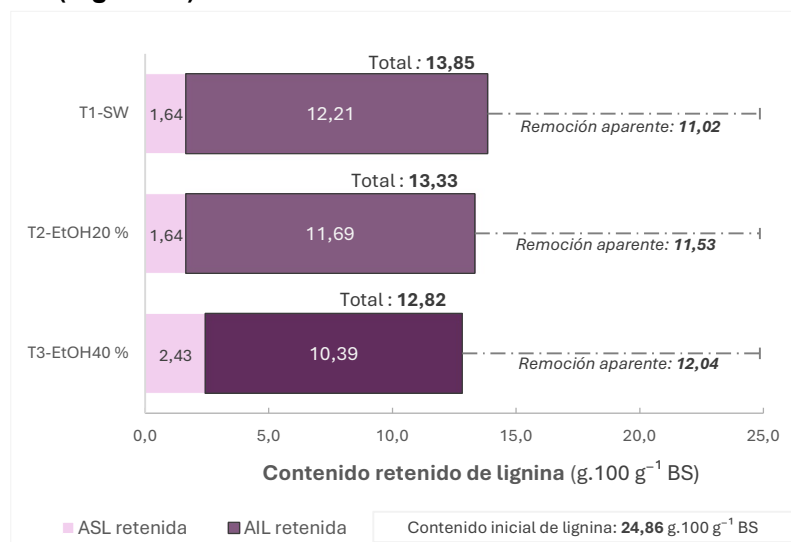


Figura 11. Retención de lignina en el sólido residual tras la extracción subcrítica. Las barras muestran ASL y AIL retenidas en el sólido residual, expresadas como $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ BS}$. Las líneas punteadas representan la remoción aparente, calculada por diferencia respecto a la lignina inicial caracterizada. Esta fracción no equivale a lignina recuperada en el licor, ya que no se cuantificó lignina soluble ni contenido aromático en la fase líquida. **ASL:** lignina soluble en ácido; **AIL:** lignina insoluble en ácido; **BS:** biomasa seca inicial

El análisis comparativo mediante ANOVA no detectó diferencias significativas en la lignina total ni en la remoción aparente ($p = 0,09$), pero sí en la redistribución interna entre fracciones (**Tabla 2**).

Tabla 2. Comparación estadística de ASL y AIL retenidas en el sólido residual tras la extracción subcrítica

Tratamiento	ASL retenida	AIL retenida	Total, retenido	Remoción aparente
T1-SW	$1,640 \pm 0,001^a$	$12,214 \pm 0,402^b$	$13,854 \pm 0,400$	$11,010 \pm 0,400$
T2-EtOH 20 %	$1,641 \pm 0,013^a$	$11,702 \pm 0,300^b$	$13,343 \pm 0,313$	$11,521 \pm 0,313$
T3-EtOH 40 %	$2,433 \pm 0,025^b$	$10,390 \pm 0,120^a$	$12,823 \pm 0,095$	$12,041 \pm 0,095$

Nota. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar en $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ BS}$. Las letras diferentes dentro de una misma variable indican diferencias significativas entre tratamientos según ANOVA de un factor y LSD de Fisher al 95 % de confianza ($p < 0,05$).

En cuanto a la ASL, T3 (**grupo b**) fue significativamente mayor que T1 y T2 (grupo a, $p < 0,001$). Lo que sugiere que la incorporación de 20 % de etanol no fue suficiente para modificar la distribución ASL/AIL respecto al agua pura usada en T1, pero para la porción de 40 % si se generó una redistribución evidente de esta fracción soluble.

Para la AIL, T3 (grupo a) presentó una retención significativamente menor que T1 y T2 (grupo b, con $p = 0,018$), lo que indica que T3 fue el único tratamiento que redujo significativamente la fracción ácida insoluble. (**Figura 11; Tabla 2**).

Esta menor retención de AIL en T3 es coherente con el efecto del etanol sobre el fraccionamiento de lignina en sistemas organosolv mencionado por Nair et al. (2023), quienes describen que, en ausencia de un catalizador externo, el proceso de hidrólisis inicia por la autoionización del agua y el ácido acético liberado de la hemicelulosa, lo que proporcionan los iones hidronio necesarios para generar la ruptura de los enlaces α - y β -aril éter de la lignina. Estos enlaces β -O-4 constituyen entre 45 y 65 % de los enlaces que unen a la lignina (Nair et al., 2023; Sun et al., 2022). En este sentido la ruptura de sus enlaces genera la formación de intermediarios reactivos, principalmente de tipo carbocationes bencílicos, los cuales en medio puramente acuoso pueden atacar a los anillos aromáticos cercanos y formar nuevos enlaces C-C, promoviendo reacciones de condensación lo cual produce lignina recondensada de mayor peso molecular cuantificada como AIL (Sun et al., 2022). En relación con esto Parchami et al., (2022) observaron que el aumento de la concentración de etanol retardó estas reacciones de condensación, y Chen et al., (2020) demostraron que el etanol actúa activamente como agente nucleofílico al insertarse en la posición α del carbocatión bencílico (α -alcoxilación) generado tras la ruptura de β -O-4, bloqueando la recondensación al evitar formación de estos nuevos enlaces C-C y permitiendo que los fragmentos de lignina permanezcan en solución. Estos hallazgos sugieren que el perfil de T3, con menor AIL y mayor ASL, es consistente con la presencia de una lignina residual menos condensada y con mayor proporción de fragmentos de menor peso molecular.

Cabe destacar que en T3, la mayor retención de pentosanos coincidió con una mayor remoción aparente de lignina, lo que indica que el medio hidroalcohólico afectó de forma distinta a ambas fracciones estructurales. Para los pentosanos la menor concentración de H_3O^+ en presencia de etanol, asociada a la menor disociación del ácido acético y a la menor autoionización del agua (Parchami et al., 2022), reduce la hidrólisis autocatalítica de la hemicelulosa, esto explica la retención de pentosanos. Adicional a lo planteado y de forma simultánea pero no acoplada, Ma et al. (2024) señalan que el etanol también ejerce un efecto solvático directo sobre la lignina, favoreciendo la solubilización de los fragmentos aromáticos por afinidad de polaridad entre el disolvente orgánico y los anillos fenólicos, siendo este efecto independiente de la ruta autocatalítica mencionada.

En relación con el mayor enriquecimiento observado en AIL para T1 y T2, este resultado observado es consistente con la formación de lignina condensada. En T1, sin cosolvente orgánico, este fenómeno es coherente con lo documentado por Selig et al. (2007) en gramíneas, quienes observaron formación y redeposición de gotas de lignina sometidas a condiciones neutras y ácidas a partir de 130 °C. Para T2, esta adición de etanol a leve proporción introduce el mecanismo específico descrito por (Adamczyk et al., 2023) en organosolv, quienes demostraron que parte de la lignina solubilizada puede reprecipitar durante el enfriamiento, depositándose sobre las fibras pretratadas.

Bajo este sentido el protocolo NREL no permite diferenciar lignina estructural residual de lignina redepositada, y para la cuantificación de ASL la señal UV/Vis según lo indicado por Martín et al., (2022), puede presentar interferencias de furánicos y otros cromóforos no lignínicos, lo que constituye una limitación interpretativa de este análisis.

Como resultado se evidencia que T1 (SW) retuvo la mayor AIL, siendo compatible con la condensación y enriquecimiento ácido insoluble. T2 (20 % EtOH) no modificó significativamente la distribución ASL/AIL respecto a T1, y en cuanto a T3 (40 % EtOH) generó el perfil más diferenciado: menor AIL, mayor ASL y con una relación AIL/ASL más próxima a la biomasa original, compatible con mayor movilización de material lignínico y menor condensación.

4.2.7 Balance estructural global de materia

Para el desarrollo del balance se tomó la cantidad de biomasa seca inicial como 100 % y se realizó su distribución entre cinco categorías (**Figura 12**): **1)** sólido residual recuperado (glucanos, pentosanos, AIL, ASL, acetilos equivalentes estructurales y ceniza retenidos), **2)** carbohidratos solubilizados (monómeros, oligómeros y ácido acético como acetilos equivalentes cuantificados en el licor), **3)** degradación primaria (furfural y HMF como equivalentes estructurales), **4)** degradación secundaria (ácido fórmico) y **5)** FNQ calculado por diferencia. Esta segmentación ofrece una lectura conjunta del destino de la biomasa.

El sólido de T2 (20 % EtOH) correspondió a la menor cantidad recuperada (48,51 %), el cual presentó simultáneamente la mayor solubilización de carbohidratos (15,89 %), consistente con la recuperación oligomérica de pentosanos descrita previamente. En T3 (40 % EtOH) se conservó la mayor fracción sólida con un 54,37 % y la menor transferencia al licor (11,50 %). En cambio, T1 (SW) mostró un tercer perfil: con una recuperación sólida intermedia (52,89 %) junto con la mayor degradación total (2,13 %), lo cual es coherente con la acumulación de furfural y ácido fórmico analizada en el apartado 4.2.4, lo que en contraste con la degradación total detectada entre T2 y T3 fue notablemente menor (1,17 % y 1,00 %), lo que resulta coherente con la menor disponibilidad de iones hidronio en presencia de etanol indicado en el apartado 4.2.5.

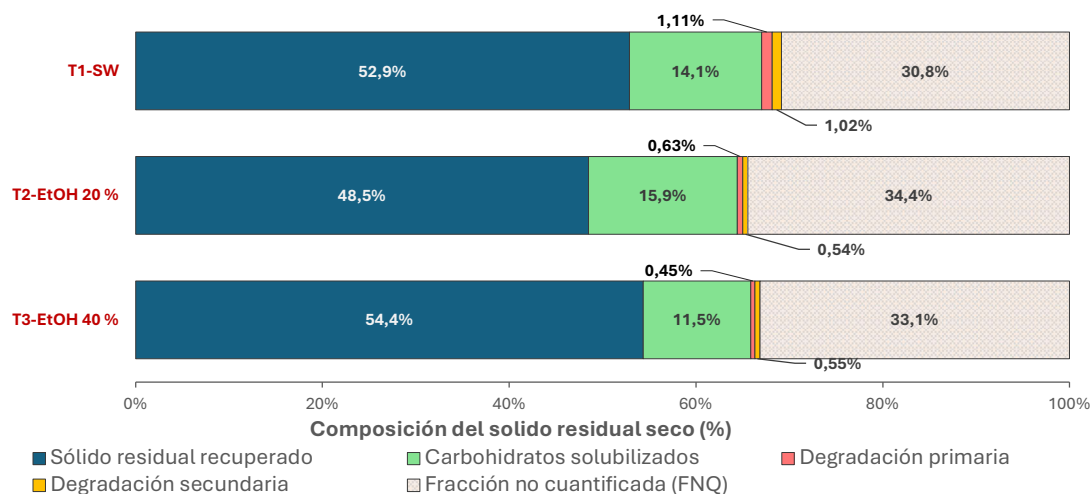


Figura 12. Rendimiento de recuperación global y balance de materia tras el pretratamiento en agua subcrítica. La biomasa seca inicial se consideró 100 % para cada tratamiento. Las barras muestran su distribución entre sólido residual recuperado, carbohidratos solubilizados, degradación primaria, degradación secundaria y fracción no cuantificada (FNQ). La degradación primaria incluye furfural y HMF expresados como equivalentes estructurales; la degradación secundaria corresponde al ácido fórmico cuantificado en el licor. La FNQ fue calculada por diferencia y no representa un compuesto específico. BS: biomasa seca inicial.

La FNQ resultó elevada en los tres tratamientos (30,8-34,4 %), si bien esta magnitud es explicable por el alcance analítico del estudio. La biomasa inicial contenía extractivos acuosos (8,90 %), extractivos etanólicos (1,13 %), proteínas (2,67 %) y lípidos (1,86 %), fracciones cuantificadas en la caracterización, pero no rastreadas tras el tratamiento, que representan ~13,9 % BS no contabilizado. A estas se suman las pérdidas operativas inherentes al reactor discontinuo, cifradas por Serna-Loaiza *et al.* (2022) en 8-13 % en pretratamientos LHW-OS de paja de trigo, y compuestos solubles no identificados, consistentes con el gap de 31-40 % reportado por Parchami *et al.* (2022) en balances de lignina de bagazo cervecero y la posible formación de productos volátiles, como acetaldehído (procedente de hemicelulosa) y formaldehído (procedente de lignina) (Martín *et al.*, 2022), que pueden escapar durante la apertura del reactor sin quedar capturados por los métodos analíticos usados para la fase líquida, tal como reconocen Illera *et al.* (2025) para sistemas subcríticos similares.

Con el fin de evaluar qué proporción de esta FNQ correspondía a material solubilizado no identificado, se realizó un balance de carbono soluble en el licor final de T1 (SW) (**Figura 13**). El licor contenía $113,25 \text{ mg C.g}^{-1} \text{ BS}$ (11,33 % BS). Los compuestos cuantificados por HPLC explicaron el 64,1 % del carbono soluble, con predominio oligomérico (45,7 %). El 35,9 % restante (4,1 % BS) quedó como carbono no asignado, lo que confirma que una proporción importante del material transferido al licor no fue cuantificada por las técnicas cromatográficas empleadas.

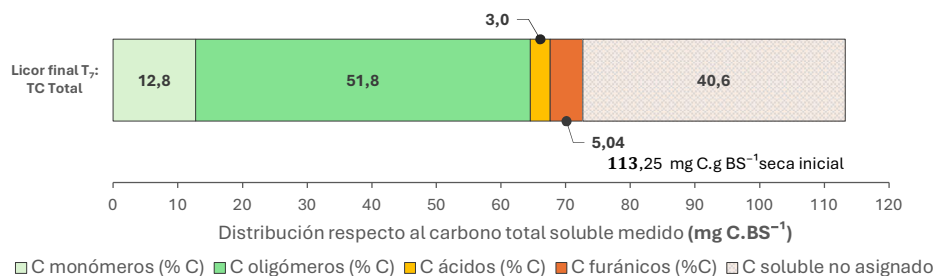


Figura 13. Recuperación de carbono soluble en el licor final t_7 . El carbono soluble del licor final t_7 de T1(SW) se expresa como $\text{mg C.g}^{-1} \text{ BS}$ y se distribuye entre carbono asociado a monómeros, oligómeros, ácidos orgánicos, compuestos furánicos y carbono soluble no asignado. Las fracciones cuantificadas por HPLC explican parcialmente el carbono total medido por TC; BS: biomasa seca inicial; TC: carbono total.

En conjunto, T2 (20 % EtOH) favoreció la mayor redistribución hacia carbohidratos solubilizados con menor degradación; T1(SW) concentró la mayor degradación junto con la menor FNQ; y T3 (40 % EtOH) conservó la mayor proporción sólida con la menor degradación total. La selección del mejor escenario requiere integrar recuperación útil, perfil de lignina, degradación, consumo energético y objetivo biotecnológico del proceso.

5. CONCLUSIONES

La biomasa inicial evaluada, corresponde a un residuo agroindustrial mixto de trigo y cebada con predominio de glucanos sobre lignina y hemicelulosa, se confirmó su idoneidad como matriz lignocelulósica para el fraccionamiento estructural evaluado. Esta caracterización constituyó, además, la base de referencia frente a la cual se cuantificó la remoción, recuperación y degradación de cada componente en los tratamientos posteriores.

El aumento de la proporción de etanol redujo la acidez del medio, siendo evidenciado por una menor acumulación de ácido acético en los tratamientos hidroalcohólicos, lo cual es coherente con el aumento de pH y de la pK_a del ácido acético reportado en la literatura para mezclas etanol-agua, aunque bajo condiciones distintas a las subcríticas evaluadas en este trabajo. Esta menor acidez atenuó la autohidrólisis de la hemicelulosa, evidenciada por la mayor retención de pentosanos en el sólido conforme se incrementó la proporción de etanol, alcanzando su máximo en el tratamiento con mayor concentración (38,87 % retenido, frente al 19,58 % en agua subcrítica pura). Consistente con esta menor hidrólisis, el furfural y el ácido fórmico, como principales productos de degradación asociados a los pentosanos, se redujeron en un 60,3 % y un 46,1 % respectivamente frente al tratamiento con agua subcrítica. Esta evidencia indica que la severidad térmica acumulada, por sí sola, no explica las diferencias de degradación observadas; ya que, a pesar de partir de aportes de severidad inicial variables, los tratamientos confluyeron hacia una severidad final similar, sin traducirse en perfiles de degradación equivalentes. Esto respalda que la degradación estuvo determinada principalmente por la composición del medio de reacción, y no por el grado de severidad térmica alcanzado.

El efecto protector del etanol sobre los carbohidratos no se tradujo en una menor remoción de lignina, aunque su acción sobre esta última no debe interpretarse como un incremento de la remoción global, sino como una modificación de su naturaleza estructural. La cantidad total

eliminada no varió de forma estadísticamente significativa entre tratamientos ($p = 0,09$); sin embargo, la fracción de lignina retenida en el sólido con mayor proporción de etanol resultó significativamente menos condensada, con una retención de lignina insoluble en ácido inferior a la de los demás tratamientos ($p = 0,018$). Este comportamiento respalda un mecanismo de acción independiente al que protege a los carbohidratos: mientras la autohidrólisis se atenúa por la menor acidez del medio, la fracción residual de lignina se ve favorecida por la afinidad de polaridad del etanol hacia sus fragmentos aromáticos y por el bloqueo nucleofílico de su recondensación, ambos descritos en la literatura. La deslignificación aparente y la protección de carbohidratos responden, en consecuencia, a mecanismos químicos distintos y desacoplados entre sí.

La celulosa se mantuvo como la fracción más recalcitrante del proceso: su retención en el sólido superó el 77 % en los tres tratamientos (77,64-89,90 %), sin diferencias sustanciales atribuibles al modificador empleado. La hemicelulosa, en cambio, mostró una respuesta más sensible a la composición del medio: el agua subcrítica pura alcanzó la mayor remoción aparente de pentosanos (80,42 %), frente al 61,13 % obtenido con la mayor proporción de etanol ensayada (40 %), lo que indica que el incremento de etanol atenuó la remoción de hemicelulosa respecto al agua subcrítica sola, en línea con lo descrito en estudios similares sobre el pretratamiento de residuos gramíneos. El hallazgo confirma que la selectividad del pretratamiento recae principalmente sobre la fracción hemicelulósica, mientras que la fracción celulósica requeriría condiciones más severas o una etapa adicional para su fraccionamiento efectivo.

El balance estructural global mostró que, el aumento de la concentración de etanol, favoreció la retención de masa en el sólido residual (54,37 % en T3) junto con una menor solubilización de carbohidratos (11,50 %) y una menor degradación cuantificada (1,0 %). Sin embargo, esta respuesta no fue estrictamente proporcional a la concentración de etanol: T2 se apartó de la tendencia esperada entre ambos extremos, combinando la mayor solubilización de carbohidratos con una degradación igualmente baja, lo que sugiere que el efecto del medio de reacción sobre el destino de la biomasa no es lineal. En contraste, T1, en ausencia de etanol, fue el único tratamiento que registró una degradación cuantificada sustancialmente mayor, lo que refuerza que la presencia del modificador, más que su concentración específica, resulta determinante para contener la degradación. La fracción no cuantificada se mantuvo elevada en los tres tratamientos (30,84-34,42 %), magnitud coherente con lo reportado para este tipo de pretratamientos hidrotermales y organosolv en sistemas discontinuos. En conjunto, ningún tratamiento resultó superior en todas las variables evaluadas: T2 favoreció la recuperación de carbohidratos solubles y oligoméricos, T1 presentó la mayor degradación, y T3 conservó la matriz sólida más rica en celulosa junto con una fracción de lignina residual menos condensada, siendo este perfil el más afín al aprovechamiento de la biomasa como precursor de biomateriales celulósicos.

5.1 Limitaciones y recomendaciones

Las tendencias comparativas entre T1 y T3 son consistentes con los fundamentos mecanísticos de la extracción hidroalcohólica subcrítica de material lignocelulósico descritos en la literatura, sin que la conciliación aplicada en T2 invalide este núcleo de resultados; su mayor recuperación oligomérica de pentosanos requiere confirmarse con réplicas adicionales. La auditoría de carbono, limitada a T1 por interferencia del etanol, sugiere que parte de la FNQ corresponde a carbono disuelto no resuelto cromatográficamente, por lo que se recomienda extenderla a T2 y T3. Este estudio tampoco permite confirmar una deslignificación real, al no haberse cuantificado polifenoles ni lignina soluble en el licor.

Dado que el incremento de etanol favoreció la liberación de pentosanos sin inflexión por degradación hasta t_6 , y que el perfil de T3 fue el más cercano a una matriz enriquecida en celulosa apta para su posterior fraccionamiento en nanocelulosa, sería de interés evaluar temperaturas más altas y tiempos de permanencia más cortos, ampliando el rango de concentración de etanol entre 20 y 50 %. Ya que el efecto de la concentración de etanol sobre

la accesibilidad celulósica depende significativamente de la temperatura (Ma et al., 2024), lo que respalda la exploración de concentraciones mayores bajo temperaturas más elevadas.

5.2 Agradecimiento

Agradezco especialmente a Pedro Barea Gómez por su guía cercana y generosa durante el desarrollo experimental de este TFM. Su apoyo fue clave para comprender y aplicar de forma práctica los procedimientos analíticos, y para ganar seguridad en el trabajo de laboratorio. Gracias por enseñar con paciencia, criterio y disposición constante.

Asimismo, este trabajo se ha desarrollado en el seno del Grupo de Investigación Biotecnología Industrial y Medioambiental, reconocido por la Universidad de Burgos (GIR-UBU BIOIND) y por la Junta de Castilla y León como Unidad de Investigación Consolidada UIC-128, en el marco de los proyectos PID2022-136385OB-I00 ("Nuevas estrategias para la producción de ácido láctico de segunda generación empleando tecnologías emergentes basadas en fluidos presurizados") y PID2025-170051OB-I00 ("Valorización de residuos de cereales: estrategia de biorrefinería en cascada para el aislamiento de biopolímeros mediante fluidos presurizados"), ambos financiados por la Agencia Estatal de Investigación.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adamcyk, J., Beisl, S., & Friedl, A. (2023). High temperature lignin separation for improved yields in ethanol organosolv pre-treatment. *Sustainability*, 15(4), Article 3006. <https://doi.org/10.3390/su15043006>
- Alonso-Riaño, P., Ramos, C., Trigueros, E., Beltrán, S., & Sanz, M. T. (2023). Study of subcritical water scale-up from laboratory to pilot system for brewer's spent grain valorization. *Industrial Crops and Products*, 191, Article 115927. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115927>
- Chen, M., Malaret, F., Firth, A. E. J., Verdía, P., Abouelela, A. R., Chen, Y., & Hallett, J. P. (2020). Design of a combined ionosolv-organosolv biomass fractionation process for biofuel production and high value-added lignin valorisation. *Green Chemistry*, 22(15), 5161-5178. <https://doi.org/10.1039/d0gc01143f>
- Cocero, M. J., Cabeza, Á., Abad, N., Adamovic, T., Vaquerizo, L., Martínez, C. M., & Pazo-Cepeda, M. V. (2018). Understanding biomass fractionation in subcritical & supercritical water. *Journal of Supercritical Fluids*, 133, 550-565. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.08.012>
- Cooperativas Agro-alimentarias de España. (2025). *Cereales 2025: Primera estimación de la cosecha* [Informe técnico]. Consejo Sectorial de Cereales. https://www.agro-alimentarias.coop/docs_download/cereales-primera-estimacion-de-cosecha-mayo-2025
- Grunwald, E., & Berkowitz, B. J. (1951). The measurement and correlation of acid dissociation constants for carboxylic acids in the system ethanol-water. Activity coefficients and empirical activity functions. *Journal of the American Chemical Society*, 73(10), 4939-4944. <https://doi.org/10.1021/ja01154a139>
- Illera, A. E., Candela, H., Beltrán, S., & Sanz, M. T. (2025). Insights into the kinetics of furfural production from different monomers and polymers derived from biomass in a subcritical water reaction medium intensified by CO₂ as pressurization agent. *Biomass and Bioenergy*, 193, Article 107550. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2024.107550>
- Ma, X., Zhao, Y., Lü, J., Jia, Y., Ma, Y., Zheng, X., Nan, W., Chen, Q., Lü, X., & Wang, X. (2024). Enhanced subcritical water pretreatment by water-ethanol system for bioethanol production from corn straw. *Industrial Crops and Products*, 210, Article 118165. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118165>

- Martín, C., Dixit, P., Momayez, F., & Jönsson, L. J. (2022). Hydrothermal pretreatment of lignocellulosic feedstocks to facilitate biochemical conversion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, Article 846592. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.846592>
- Nair, L. G., Agrawal, K., & Verma, P. (2023). Organosolv pretreatment: An in-depth purview of mechanics of the system. *Bioresources and Bioprocessing*, 10(1), Article 50. <https://doi.org/10.1186/s40643-023-00673-0>
- Nasution, H., Yahya, E. B., Abdul Khalil, H. P. S., Shaah, M. A., Suriani, A. B., Mohamed, A., Alfatah, T., & Abdullah, C. K. (2022). Extraction and isolation of cellulose nanofibers from carpet wastes using supercritical carbon dioxide approach. *Polymers*, 14(2), Article 326. <https://doi.org/10.3390/polym14020326>
- Parchami, M., Agnihotri, S., & Taherzadeh, M. J. (2022). Aqueous ethanol organosolv process for the valorization of brewer's spent grain (BSG). *Bioresource Technology*, 362, Article 127764. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127764>
- Ruiz, H. A., Galbe, M., Garrote, G., Ramirez-Gutierrez, D. M., Ximenes, E., Sun, S. N., Lachos-Perez, D., Rodríguez-Jasso, R. M., Sun, R. C., Yang, B., & Ladisch, M. R. (2021). Severity factor kinetic model as a strategic parameter of hydrothermal processing (steam explosion and liquid hot water) for biomass fractionation under biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 342, Article 125961. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125961>
- Selig, M. J., Viamajala, S., Decker, S. R., Tucker, M. P., Himmel, M. E., & Vinzant, T. B. (2007). Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology Progress*, 23(6), 1333–1339. <https://doi.org/10.1021/bp0702018>
- Serna-Loaiza, S., Adamczyk, J., Beisl, S., Miltner, M., & Friedl, A. (2022). Sequential pretreatment of wheat straw: Liquid hot water followed by organosolv for the production of hemicellulosic sugars, lignin, and a cellulose-enriched pulp. *Waste and Biomass Valorization*, 13(12), 4771–4784. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01824-8>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). *Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples: Laboratory analytical procedure (LAP)* (Technical Report NREL/TP-510-42623). National Renewable Energy Laboratory. <https://www.nrl.gov/docs/gen/fy08/42623.pdf>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2012). *Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: Laboratory analytical procedure (LAP)* (Technical Report NREL/TP-510-42618). National Renewable Energy Laboratory. <https://docs.nrl.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>
- Sun, D., Lv, Z. W., Rao, J., Tian, R., Sun, S. N., & Peng, F. (2022). Effects of hydrothermal pretreatment on the dissolution and structural evolution of hemicelluloses and lignin: A review. *Carbohydrate Polymers*, 281, Article 119050. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.119050>