

**Efecto de la temperatura y la concentración
de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) en el
pretratamiento de digestión de aserrín de
pino (*Pinus oocarpa*) para la producción de
etanol lignocelulósico**

Mario Rene Nuñez Escoto

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2011

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Efecto de la temperatura y la concentración
de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) en el
pretratamiento de digestión de aserrín de
pino (*Pinus oocarpa*) para la producción de
etanol lignocelulósico**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Mario Rene Nuñez Escoto

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2011

Efecto de la temperatura y la concentración de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) en el pretratamiento de digestión de aserrín de pino (*Pinus oocarpa*) para la producción de etanol lignocelulósico

Presentado por:

Mario Rene Nuñez Escoto

Aprobado:

Francisco Javier Bueso, Ph.D.
Asesor principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Carrera de Agroindustria Alimentaria

Timothy Roy Longwell, M.Sc.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

RESUMEN

Núñez Escoto, M. R. 2011. Efecto de la temperatura y la concentración de H_2SO_4 (ácido sulfúrico) en el pretratamiento de digestión de aserrín de pino (*Pinus oocarpa*) para la producción de etanol lignocelulósico. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 23 p.

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de dos temperaturas (110 y 130°C) y tres concentraciones de H_2SO_4 (2, 4 y 6%) en el pretratamiento de despolimerización ácido-diluido del aserrín de *Pinus oocarpa* en el proceso de elaboración de etanol lignocelulósico. Se empleó un diseño experimental de Parcelas Divididas donde las dos temperaturas evaluadas fueron las parcelas principales y las tres concentraciones de H_2SO_4 conformaron las subparcelas. Se determinó la cantidad de azúcares reductores liberados de la matriz del aserrín, fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD) en el aserrín antes y después del pretratamiento ácido-diluido. Se generó un indicador diferencial de digestibilidad de celulosa, hemicelulosa y lignina. Los resultados se analizaron en el programa estadístico SAS[®] mediante un ANDEVA, una prueba de separación de medias Tukey y una prueba t. ($P < 0.05$). La temperatura de digestión, la concentración de H_2SO_4 y la interacción de ambos factores afectaron significativamente el rendimiento de azúcares reductores y la cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina digerida. Sin embargo, la concentración de H_2SO_4 fue la principal fuente de variación para todas las variables medidas exceptuando la hemicelulosa digerida, donde la temperatura ejerció un papel más significativo. A partir de la combinación de 2% H_2SO_4 y 130°C se removió el total de hemicelulosa de la matriz. La combinación de 130°C y 6% H_2SO_4 resultó significativamente superior en el rendimiento de azúcares liberados del aserrín al digerir por completo la hemicelulosa, remover el mayor porcentaje de lignina y despolimerizar el 17.76% de celulosa.

Palabras clave: Ácido-diluido, azúcares fermentables, biomasa de pino, FAD, FND, Nelson-Somogyi.

CONTENIDO

| | | |
|----------|-------------------------------------|-----------|
| | Portadilla..... | i |
| | Página de firmas | ii |
| | Resumen | iii |
| | Contenido..... | iv |
| | Índice de cuadros y anexos..... | v |
| 1 | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2 | MATERIALES Y MÉTODOS | 3 |
| 3 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 10 |
| 4 | CONCLUSIONES | 13 |
| 5 | RECOMENDACIONES | 14 |
| 6 | LITERATURA CITADA | 15 |
| 7 | ANEXOS..... | 18 |

ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

| Cuadros | | Página |
|---------|--|--------|
| 1. | Rendimiento de azúcares reductores presentes en el hidrolizado e índice de digestibilidad total por tratamiento de despolimerización ácido-diluido. | 11 |
| 2. | Celulosa, hemicelulosa y lignina digerida durante el pretratamiento de despolimerización ácido-diluido..... | 11 |
| 3. | Efecto de la temperatura de digestión en el rendimiento de azúcares reductores y en la degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina durante el pretratamiento ácido-diluido..... | 12 |
| 4. | Efecto de la concentración de ácido sulfúrico en el rendimiento de azúcares reductores y en la degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina durante el pretratamiento ácido-diluido..... | 12 |
| | | |
| Anexos | | Página |
| 1. | Análisis de varianza de azúcares reductores liberados durante el pretratamiento. | 18 |
| 2. | Prueba t de azúcares reductores liberados durante el pretratamiento..... | 18 |
| 3. | Análisis de varianza de hemicelulosa digerida durante el pretratamiento..... | 19 |
| 4. | Prueba t de hemicelulosa digerida durante el pretratamiento..... | 19 |
| 5. | Análisis de varianza de lignina digerida durante el pretratamiento..... | 20 |
| 6. | Prueba t de lignina digerida durante el pretratamiento..... | 20 |
| 7. | Análisis de varianza de celulosa digerida durante el pretratamiento..... | 21 |
| 8. | Prueba t de celulosa digerida durante el pretratamiento..... | 21 |
| 9. | Curva de calibración de glucosa para el análisis de azúcares reductores por el método de Nelson-Somogyi. | 22 |
| 10. | Azúcares reductores liberados de la matriz de la pared celular del aserrín de <i>Pinus oocarpa</i> | 22 |
| 11. | Índice de digestibilidad total de lignocelulosa (hemicelulosa, celulosa y lignina)..... | 23 |

1. INTRODUCCIÓN

Los combustibles derivados de la biomasa lignocelulósica ofrecen una alternativa viable para las fuentes de energía convencionales que soportan el crecimiento económico y la seguridad energética global (U.S. Department of Energy, 2006). De acuerdo con Wyman *et al.* (2005), Yu *et al.* (2008) e Iranmahboob *et al.* (2002), los residuos forestales constituyen una importante fuente de energía renovable. Sin embargo, la generación y acumulación de estos residuos en los aserraderos ha ocasionado diversos obstáculos dentro del proceso de producción maderero dando como resultado el descarte de estos materiales y por ende el desaprovechamiento energético de los mismos (Godoy *et al.* 2001).

De acuerdo con el ICF (Instituto Hondureño de Conservación y Desarrollo Forestal Áreas Protegidas y Vida Silvestre), en el 2009 el 38% de la superficie cubierta de bosque correspondía a especies coníferas entre las cuales predominaba *Pinus oocarpa* (González 2008). Según Godoy *et al.* (2001), alrededor del 6% de la madera proveniente de especies coníferas se pierde durante el proceso de aserrado en forma de aserrín. Durante el 2009 se aprovecharon 499,445 m³ de madera de pino en rollo, se produjeron 113, 293.3 millones de pies tablares y se generaron 29,966.7 m³ de aserrín en todo el territorio hondureño (ICF 2009).

La biomasa lignocelulósica proveniente de maderas blandas como *Pinus oocarpa* se encuentra compuesta por una intrincada matriz de polisacáridos estructurales, pectinas, lignina y proteoglicanos (Wyman 2008). La celulosa, que representa alrededor del 50% del peso seco de la madera de pino, es un polímero lineal cristalino formado por unidades repetidas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos β -1,4, puentes de hidrogeno y fuerzas electrostáticas intramoleculares (Cuervo *et al.* 2009). De acuerdo con Saha (2003), la hemicelulosa (10% del peso de la madera de pino en base seca) es un polímero un tanto más complejo que la celulosa, este heteropolisacárido está compuesto por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) y residuos de ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, dichos compuestos se encuentran formando cadenas amorfas ramificadas unidas por enlaces β -1,4 y ocasionalmente β -1,3. La lignina representa aproximadamente el 25% del peso seco de la madera de pino (Ortíz 2008), este compuesto polifenólico tridimensional ramificado no fermentable consiste en un arreglo irregular de alcoholes aromáticos cuya principal función es proveer rigidez, impermeabilidad y protección a la célula vegetal entrelazando los polisacáridos estructurales (McMillan 1993).

Según Margeot *et al.* (2009), la conversión de los materiales lignocelulósicos en etanol requiere de 4 etapas; el proceso inicia con un pretratamiento para romper la estructura

lignocelulósica de la matriz de la biomasa, seguido por un proceso de hidrólisis enzimática que permite despolimerizar la celulosa, seguidamente el hidrolizado extraído es sometido a un proceso de fermentación a través de microorganismos y finalmente el etanol resultante es separado y purificado de acuerdo a las especificaciones de la industria (U.S Renewable Fuel Association 2009).

El proceso inicial de acondicionamiento de la biomasa ha sido identificado como el paso crucial en la elaboración de etanol lignocelulósicos. Esta fase de transformación permite un incremento en la porosidad de los materiales, reduce la cristalinidad de la celulosa y participa en la despolimerización parcial de la misma. Además, posibilita la solubilización de la hemicelulosa y la remoción de la lignina (Sun y Cheng 2005). Muchas tecnologías han sido estudiadas y desarrolladas para optimizar este proceso, resaltando el pretratamiento hidrolítico con ácido sulfúrico diluido (0.5-5% H_2SO_4) a temperaturas moderadas (100-200°C). Según Hsu (1996), el proceso de despolimerización ácido-diluido presenta la mejor aplicabilidad a nivel industrial por su factibilidad económica y técnica. Sin embargo, combinaciones erróneas de tiempo, concentración de ácido y temperatura limitan la eficiencia de los pasos posteriores al pretratamiento, causando bajos rendimientos de etanol, principalmente por la producción de sustancias inhibitoras como 5-hidroximetilfurfural (Cara *et al.* 2008), este aldehído generado durante la deshidratación catalítica-ácida de las hexosas (Zappala *et al.* 2005), es capaz de reducir el 50% del crecimiento celular de los microorganismos fermentadores cuando se encuentra presente a una concentración de 2.7 g/L de medio Laura-Bertani (Zaldívar *et al.* 1999).

Varias investigaciones han sido desarrolladas con el propósito de optimizar el pretratamiento de despolimerización de los materiales lignocelulósicos: Rosero (2008), evaluó el efecto del pretratamiento y fermentación de la fibra del palmito (*Bactris gasipaes*) para la producción de etanol; Cara *et al.* (2008), exploró la conversión de la biomasa del árbol de oliva en azúcares fermentables a través del pretratamiento ácido-diluido y sacarificación enzimática; Gámez (2008) evaluó el efecto de la temperatura y la concentración de H_2SO_4 en el pretratamiento del estiércol de ganado lechero para la producción de etanol; entre otros. Sin embargo existe muy poca información científica acerca de la obtención de etanol a partir de aserrín de maderas blandas. Por lo tanto, el presente estudio ha sido enfocado en evaluar el efecto de la temperatura y la concentración de ácido sulfúrico en el pretratamiento de digestión ácido-diluido del aserrín de *Pinus oocarpa* para la producción de etanol lignocelulósico.

- Este proyecto permitió evaluar el efecto de dos temperaturas (110 y 130°C) y tres concentraciones de H_2SO_4 (2, 4 y 6%) en el rendimiento de monómeros fermentables extraídos de la matriz del aserrín de *Pinus oocarpa*.
- También se evaluó la cantidad de hemicelulosa, lignina y celulosa digerida durante la despolimerización hidrolítica de la pared celular del aserrín de *Pinus oocarpa*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. El pretratamiento ácido-diluido del aserrín de *Pinus oocarpa* y los análisis de los materiales resultantes de la despolimerización se realizaron en el Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano (LAAZ), departamento de Francisco Morazán, Kilómetro 32 al Este de Tegucigalpa, Honduras.

Materiales

- Aserrín fresco de *Pinus oocarpa* tomado de la Unidad de Manejo de Cultivos Forestales y Aserradero de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano.
- Espátulas de metal.
- Rollo de papel estaño.
- Crisoles de porcelana, 50 mL.
- Pinza para crisol.
- Desecador de cristal con llave de paso para vacío, 5.8 L.
- Bandeja de aluminio (28 × 18 × 4 cm).
- Probetas, 25, 50 y 100 mL.
- Kitasato, 600 mL.
- Crisoles de gooch, 60 mL.
- Picetas de plástico.
- Beakers, 250 y 1000 mL.
- Bulbo para pipetas.
- Pipetas, 1 y 10 mL.
- Matraz volumétrico, capacidad 50, 100 y 1000 mL.
- Soporte universal con pinza doble para bureta.
- Bureta para titulación, 25 mL.
- Beakers Berzelius, 600 mL.
- Frasco volumétrico ámbar, capacidad 600 mL.
- Magnetos agitadores.
- Platos petri.
- Gradilla metálica para tubos de ensayo.
- Tubos de ensayo.
- Cubetas de cuarzo para espectrofotometría.

Reactivos

- Solución neutra detergente:
 - Sulfato de lauril sódico (>59%), Fisher Scientific.
 - EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (99+%), J.T Baker.
 - Hidróxido de sodio (98.4%), J.T Baker.
 - Borato de sodio 10-hidratado (99%), J.T Baker.
 - Fosfato ácido de sodio (grado reactivo), Sigma.
 - Etilen glicol (grado reactivo), J.T Baker.
- Acetona (99.8%), Merck.
- Etanol (46.07 g/mol), Merck.
- Solución ácido detergente:
 - Ácido sulfúrico (95.40%), Sigma Aldrich.
 - Bromuro de cetil trimetil amonio (grado reactivo), Fisher Scientific.
- Solución buffer de lignina:
 - Nitrato de plata (grado reactivo), J.T Baker.
 - Benzoato de potasio (grado reactivo), Supelco.
 - Nitrato de hierro 9-hidratado.
 - Butanol terciario (99.80%), Sigma Aldrich.
 - Ácido acético (100%), Merck.
- Solución saturada de permanganato.
 - Permanganato de potasio, J.T Baker.
 - Sulfato de plata (99%), Sigma.
- Solución desmineralizadora:
 - Ácido oxálico, Fisher Scientific.
 - Etanol (99%), Merck.
 - Ácido clorhídrico.
- Estándar de D-Glucosa 99+%, Sigma Aldrich.
- Solución de tartrato de cobre alcalino de Nelson-Somogyi:
 - Carbonato de sodio, J.T Baker.
 - Tartrato de sodio potasio 4-hidratado (99%), Sigma.
 - Bicarbonato de sodio, J.T Baker.
 - Sulfato de sodio, J.T Baker.
 - Sulfato cúprico 5-hidratado, Fisher Scientific.
 - Ácido sulfúrico (95.40%), Sigma Aldrich.
- Reactivo de arsenomolibdato de Nelson-Somogyi:
 - Molibdato de amonio 4-hidratado, J.T Baker.
 - Ácido sulfúrico (95.40%), Sigma Aldrich.
 - Monohidrogeno de sodio fosfato hidratado, Sigma Aldrich.
- Ácido sulfúrico (95.4%), Sigma Aldrich.
- Pellets de Hidróxido de sodio (98.4%), J. T Baker.

Equipo

- Balanza analítica Adventurer 2140, OHAUS.
- Horno Napco modelo 630.
- Mufla-Sybron, Thermolyne.
- Campana de gas 608300, Labconco.
- Aparato de reflujo labconco 30059 con calentador Thermolyne.
- Termómetro “lollipop”, Traceable.
- Higrómetro, Thomas Scientific.
- Bomba de vacío, HyperVac 2000.
- Digestor Kjeltex 8100, Foss.
- Calentador y agitador, Fisher Scientific.
- Potenciómetro Mini Lab IQ120.
- Agitador Vortex 231.
- Espectrofotómetro, Spectronic Genesys 5.

Diseño experimental. El estudio consistió en evaluar el efecto de dos temperaturas (110 y 130°C) y tres concentraciones de H₂SO₄ (2, 4 y 6%) en el pretratamiento de despolimerización ácido-diluido para el acondicionamiento del aserrín de *Pinus oocarpa* en el proceso de elaboración de etanol lignocelulósico. Se usó un Diseño de Parcelas Divididas, en el cual la parcela principal fue el factor temperatura (110 y 130°C) y las subparcelas fueron los niveles de ácido sulfúrico (2, 4 y 6%), obteniendo así dos tratamientos con tres niveles cada uno. Se realizaron tres repeticiones, para un total de 18 unidades experimentales.

Determinación de Humedad (AOAC 926.08). Para calcular la cantidad de aserrín de *Pinus oocarpa* y reactivos a emplear durante el pretratamiento ácido-diluido fue necesario medir la humedad del aserrín. Se tomó el peso de 3 crisoles de porcelana fríos previamente secados a 105°C durante 24 h en el horno Napco modelo 630. A cada crisol se le añadió 1 g de muestra y se registró su peso. Luego de 24 h de secado a 105°C los crisoles fueron depositados en el desecador de cristal con llave de paso para vacío y una vez fríos se tomó su peso. La humedad del aserrín de *Pinus oocarpa* fue determinada mediante la Ecuación 1:

$$\%H = \frac{(\text{Peso crisol} + \text{muestra}) - (\text{Peso crisol} + \text{materia seca})}{\text{Peso de la muestra}} \times 100 \quad [1]$$

Pretratamiento ácido-diluido. Se tomó una muestra de 10 kg de aserrín fresco de *Pinus oocarpa* de la Unidad de Manejo de Cultivos Forestales y Aserradero de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Un kilogramo de aserrín se secó en el horno Napco modelo 630 durante 24 h a 105°C. Después se agregó 5 gramos del material seco a nueve tubos de muestra del Digestor Kjeltex 8100 Foss rotulados por triplicado con las

concentraciones de ácido sulfúrico a emplear (2, 4 y 6%). Seguidamente, se les añadió la solución de ácido sulfúrico a una relación 1:11 (muestra seca: ácido) y se colocaron en la unidad Kjeltex 8100 Foss donde se les sometió durante 2 h al proceso de digestión térmica (Iranmahboob *et al.* 2002 y Liao *et al.* 2004) a 110°C para un tratamiento y 130°C para el restante. Una vez finalizado el pretratamiento se filtró el contenido de los tubos de muestra succionando al vacío, se registró el volumen del filtrado (hidrolizado) y después fue neutralizado a pH siete con hidróxido de sodio a 1 N y aforado en matraces volumétricos de 50 mL. La torta se lavó con agua destilada a 60°C para eliminar el exceso de ácido y posteriormente se introdujo en el horno Napco modelo 630 durante 24 h a 105°C. El peso de la torta seca fue registrado.

Determinación de azúcares reductores por el método de Nelson-Somogyi. Se preparó la curva estándar de glucosa agregando 0.1 gramos de D-glucosa a un balón que contenía un litro de agua destilada. Después de mezclar bien, se pipetearon 10, 20, 40, 60 y 80 mL de la solución madre de glucosa en balones de 100 mL posteriormente aforados con agua destilada.

Un mL de una dilución 10^{-1} del hidrolizado resultante de cada tratamiento fue pipeteado en 3 tubos de ensayo a los cuales se les agregó un mL del reactivo de tartrato de cobre alcalino de Nelson-Somogyi para luego ser agitados en el Vortex 231. Después, los tubos de ensayo fueron hervidos en baño maría durante 22 min a 100°C. Una vez fríos, se añadió a cada tubo de ensayo un mL del reactivo de arsenomolibdato de Nelson-Somogyi y se les agitó en el Vortex 231. Luego, se añadió siete mL de agua destilada y nuevamente se agitó. Se realizó el mismo procedimiento para los blancos (agua destilada) y para la curva de estándar de glucosa. Seguidamente, se registró la absorbancia del blanco, la curva estándar de glucosa y las muestras del hidrolizado en el espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 a 540 nm de longitud de onda. Finalmente, se realizó una regresión lineal entre la absorbancia y la concentración de glucosa (ppm); se empleó la pendiente y el intercepto de la Ecuación para el cálculo de azúcares reductores presentes en la muestra teniendo en cuenta el peso de la misma y las diluciones realizadas. Mediante la Ecuación 2 se determinó para cada tratamiento la cantidad de azúcares reductores presentes en el hidrolizado:

$$\% \text{Azúcares Reductores} = \frac{(\text{ppm glucosa}) \times \text{FD} \times 100}{\text{Peso de la muestra} \times 10^6} \quad [2]$$

Análisis FND (Fibra Neutro Detergente) (AOAC 2002.04). 0.5 g de aserrín de *Pinus oocarpa* fresco y 0.5 g de la torta seca^δ remanente de cada tratamiento de digestión, fueron colocados individualmente en beakers berzelius que contenían 100 mL de solución neutro detergente. Luego de hervir en el aparato de reflujo Labconco 30059 por 1 hora, el contenido de los beakers se vertió en crisoles de gooch de 60 mL donde se filtraron succionando al vacío, los residuos fueron lavados con acetona a 46.07 g/mol. Los crisoles con el FND se introdujeron en el horno Napco modelo 630 y luego de 12 h de secado a

105°C se depositaron en un desecador de cristal con llave de paso para vacío. Después, se tomó el peso de los crisoles fríos que contenían el FND. Finalmente, los crisoles se incineraron en la mufla a 580°C por 3 h para corregir el contenido de fibra por la ceniza y una vez fríos se tomó su peso. El cálculo del FND se realizó mediante la Ecuación 3:

$$\%FND = \frac{(\text{Peso crisol} + \text{FND}) - (\text{Peso crisol} + \text{cenizas})}{\text{Peso de la muestra}} \times 100 \quad [3]$$

^δEl análisis de la torta se realizó por cada una de las tres replicas de cada tratamiento.

Análisis FAD (Fibra Ácido Detergente) (AOAC 973.18). Un gramo de aserrín de *Pinus oocarpa* fresco y un gramo de la torta seca^φ remanente de cada tratamiento de digestión, se colocaron individualmente en beakers berzelius a los cuales se les añadió 100 mL de solución ácido detergente. Luego de hervir en el aparato de reflujo Labconco 30059 por 1 hora, el volumen de los beakers se vertió en crisoles de gooch fríos de 60 mL previamente secados a 105°C y luego se filtró su contenido succionando al vacío, los residuos fueron lavados con agua destilada a 60°C y acetona (46.07 g/mol). Los crisoles con el FAD se introdujeron en el horno Napco modelo 630 y luego de 12 h de secado a 105°C se depositaron en un desecador de cristal con llave de paso para vacío. Finalmente, se tomó el peso de cada crisol frío y se realizó el cálculo del FAD mediante la Ecuación 4:

$$\%FAD = \frac{(\text{Peso crisol} + \text{FAD}) - (\text{Peso crisol seco})}{\text{Peso de la muestra}} \times 100 \quad [4]$$

^φEl análisis de la torta se realizó por cada una de las tres replicas de cada tratamiento.

Para el análisis de lignina, se colocaron los crisoles con el residuo de la determinación del FAD en platos petri que contenían alrededor de un cm de altura de agua destilada. Luego se agregó 25 mL de solución buffer de permanganato (mezcla de solución saturada de permanganato con buffer de lignina, relación 2:1), con ayuda de una espátula de metal se deshicieron los grumos del FAD y se dejó reposar durante 90 min. Posteriormente, los crisoles fueron filtrados al vacío para extraer el exceso de permanganato. Luego, fueron devueltos a los platos petri limpios donde a cada crisol se le agregó 25 mL de solución desmineralizadora. Una vez que el residuo (celulosa) blanqueo, los crisoles fueron lavados con etanol al 80% v/v y acetona a 46.07 g/mol con succión al vacío para después ser secados en el horno Napco modelo 630 por un periodo de 12 h a 105°C. Los crisoles ya fríos y secos fueron pesados. Finalmente, los crisoles fueron incinerados en la mufla durante 3 h a 580°C para una vez fríos ser pesados. El cálculo de lignina se realizó mediante la Ecuación 5:

$$\%Lignina = \frac{(\text{Peso crisol} + \text{FAD}) - (\text{Peso crisol} + \text{celulosa})}{\text{Peso de la muestra}} \times 100 \quad [5]$$

La celulosa y hemicelulosa presente en el aserrín y en la torta ya digerida se determinó mediante la Ecuación 6 y 7 respectivamente:

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{(\text{Peso crisol} + \text{celulosa}) - (\text{Peso crisol} + \text{cenizas})}{\text{Peso de la muestra}} \times 100 \quad [6]$$

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \% \text{ FND} - \% \text{ FAD} \quad [7]$$

Los análisis FND y FAD revelaron que el aserrín de *Pinus oocarpa* estaba compuesto por 41.92% de celulosa, 20.12% de hemicelulosa y 17.99% de lignina. Dichos resultados concuerdan con la descripción de la biomasa de especies coníferas realizada por Hon y Shiraishi (2000).

Índice de digestibilidad. La cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina digerida durante el pretratamiento ácido-diluido se determinó a través de un índice diferencial entre los resultados del análisis FND y FAD del material inicial y los resultados de los mismos análisis para la torta seca producto de cada tratamiento de digestión (Ecuación 8, 9, 10 y 11).

$$\% \text{ Índice digestibilidad total} = \frac{\text{FND}_{\text{Aserrín } P.oocarpa} - \text{FND}_{\text{Torta digerida}}}{\text{FND}_{\text{Aserrín } P.oocarpa}} \times 100 \quad [8]$$

$$\% \text{ Celulosa digerida} = \frac{\text{Celulosa}_{\text{Aserrín } P.oocarpa} - \text{Celulosa}_{\text{Torta digerida}}}{\text{Celulosa}_{\text{Aserrín } P.oocarpa}} \times 100 \quad [9]$$

$$\% \text{ Hemicelulosa digerida} = \frac{\text{Hemicelulosa}_{\text{Aserrín } P.oocarpa} - \text{Hemicelulosa}_{\text{Torta digerida}}}{\text{Hemicelulosa}_{\text{Aserrín } P.oocarpa}} \times 100 \quad [10]$$

$$\% \text{ Lignina digerida} = \frac{\text{Lignina}_{\text{Aserrín } P.oocarpa} - \text{Lignina}_{\text{Torta digerida}}}{\text{Lignina}_{\text{Aserrín } P.oocarpa}} \times 100 \quad [11]$$

Análisis estadístico. Se empleó el programa estadístico SAS[®], versión 9.1 para hacer un análisis de varianza (ANDEVA) y mediante una separación de medias ajustadas TUKEY ($P < 0.05$) se categorizó cada tratamiento en función de los datos (previamente transformados en arcoseno) de rendimiento de azúcares reductores liberados de la matriz del aserrín de *Pinus oocarpa* y la cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina digerida durante el pretratamiento de despolimerización.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del aserrín de *Pinus oocarpa*. Los análisis de humedad, FND y FAD revelaron que el aserrín de *Pinus oocarpa* poseía 12% de humedad, 88% de sólidos secos, 41.92% de celulosa, 20.12% de hemicelulosa y 17.99% de lignina. Dichos resultados concuerdan con la descripción de la biomasa de especies coníferas realizada por Hon y Shiraishi (2000).

Análisis de varianza. A través del análisis de varianza se determinó que la temperatura y la concentración de ácido sulfúrico afectaron significativamente ($P < 0.05$) el rendimiento de azúcares reductores y la cantidad de hemicelulosa, lignina y celulosa digerida durante el pretratamiento hidrolítico. Sin embargo, la concentración de H_2SO_4 resultó ser la fuente de mayor variación para todas las variables medidas exceptuando la hemicelulosa donde la temperatura ejerció un papel más significativo en su hidrólisis. También, se encontró interacción significativa entre la temperatura de digestión y la concentración de H_2SO_4 .

Azúcares reductores y digestibilidad total. En el Cuadro 1 se observa que el tratamiento que combinó $130^\circ C$ y 6% H_2SO_4 fue estadísticamente superior al resto de los pretratamientos evaluados al liberar mayor cantidad de azúcares reductores, ya que estas condiciones permitieron digerir mas lignocelulosa (35.54%). La prueba t de la interacción entre la temperatura de digestión y la concentración de ácido sulfúrico para el rendimiento de azúcares reductores, mostró que a medida que la temperatura y la concentración del ácido aumentaron, así incrementó la cantidad de azúcares liberados de la matriz. El tratamiento de menor rendimiento de azúcares y de menor índice de digestibilidad coincidió con la temperatura y el nivel más bajo de ácido ($110^\circ C$ y 2% H_2SO_4). Dichos resultados pueden relacionarse con los estudios conducidos por Sanchez *et al.* (2004) y Liao *et al.* (2004), donde se comprobó que a medida que las condiciones del pretratamiento con ácido-diluido (temperatura y concentración de ácido) se vuelven más severas, podemos esperar un incremento en el rendimiento de carbohidratos monoméricos como resultado de la despolimerización total de la hemicelulosa y un aumento en la despolimerización parcial de la celulosa.

Cuadro 1. Rendimiento de azúcares reductores presentes en el hidrolizado e índice de digestibilidad total por tratamiento de despolimerización ácido-diluido.

| Tratamiento | Azúcares reductores (%) | Índice digestibilidad (%) ^π |
|---|---------------------------|--|
| | Media ± D.E. [£] | Media ± D.E. [£] |
| 30°C, 6% H ₂ SO ₄ | 52.47±1.03 ^a | 35.54±0.66 ^a |
| 30°C, 4% H ₂ SO ₄ | 46.15±1.39 ^b | 30.63±0.10 ^b |
| 10°C, 6% H ₂ SO ₄ | 42.32±0.28 ^c | 28.21±0.52 ^c |
| 10°C, 4% H ₂ SO ₄ | 40.22±0.29 ^c | 26.63±0.14 ^d |
| 30°C, 2% H ₂ SO ₄ | 27.61±0.89 ^d | 18.06±0.35 ^e |
| 10°C, 2% H ₂ SO ₄ | 20.69±0.28 ^e | 13.73±0.27 ^f |

^{a-f} Tratamientos seguidos de diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05).

[£] D.E. Desviación Estándar.

^π pared celular digerida.

Celulosa, hemicelulosa y lignina digerida. De acuerdo con Saha (2003) y Margeot *et al.* (2009), la celulosa existente en los materiales lignocelulósicos se encuentra en combinación con una compleja y dinámica red de polímeros de hemicelulosa y lignina que dificultan la extracción e hidrólisis de los polisacáridos que conforman dicho compuesto. Estudios realizados por Wyman *et al.* (2005 y 2008), aseguran que al solubilizar por completo la hemicelulosa y fraccionar al menos una pequeña parte del total de lignina podemos aumentar la eficiencia en la descomposición de la celulosa. En el Cuadro 2 todos los pretratamientos, con excepción de la combinación 110°C y 2% H₂SO₄, digirieron por completo la hemicelulosa presente en la matriz del aserrín. La prueba t de la interacción entre la temperatura de digestión y la concentración de ácido sulfúrico para la cantidad de hemicelulosa digerida reveló que al emplear 2% H₂SO₄ y elevar la temperatura de 110°C a 130°C, se aumentó en un 17.05% la cantidad de hemicelulosa removida, dicho incremento significó la digestión total de este heteropolisacárido estructural (Cuadro 2). Sin embargo, el tratamiento más severo (130°C y 6% H₂SO₄) despolimerizó la mayor cantidad de celulosa (17.76%) al remover el más alto porcentaje de lignina (16.64%) como resultado del aumento en la concentración de H₂SO₄ que resulto ser el factor de mayor significancia en la interacción temperatura-ácido para la cantidad de lignina y celulosa digerida.

Cuadro 2. Celulosa, hemicelulosa y lignina digerida durante el pretratamiento hidrolítico.

| Tratamiento | Celulosa (%) | Hemicelulosa (%) | Lignina (%) |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Media ± D.E. [£] | Media ± D.E. [£] | Media ± D.E. [£] |
| 30°C, 6% H ₂ SO ₄ | 17.76±0.05 ^a | 99.99±0.00 ^a | 16.64±0.01 ^a |
| 30°C, 4% H ₂ SO ₄ | 13.29±0.12 ^b | 99.99±0.00 ^a | 11.10±0.06 ^b |
| 10°C, 6% H ₂ SO ₄ | 11.27±0.61 ^c | 99.99±0.00 ^a | 10.88±0.08 ^b |
| 10°C, 4% H ₂ SO ₄ | 9.42±0.17 ^d | 99.99±0.00 ^a | 9.34±0.48 ^c |
| 30°C, 2% H ₂ SO ₄ | 0.58±0.05 ^e | 99.99±0.00 ^a | 5.20±0.20 ^d |
| 10°C, 2% H ₂ SO ₄ | 0.04±0.01 ^e | 82.94±1.57 ^b | 4.95±0.53 ^d |

^{a-e} Tratamientos seguidos de diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05).

[£] D.E. Desviación Estándar.

Efecto de la temperatura en el pretratamiento. El mayor porcentaje de azúcares reductores se obtuvo después de someter el aserrín de *Pinus oocarpa* a 130°C (Cuadro 3). El aumento en la temperatura aceleró la velocidad de hidrólisis y catalizó el efecto del H₂SO₄ en la despolimerización de la hemicelulosa y en la degradación de la pared de lignina lo que contribuyó a digerir una mayor porción de la celulosa contenida en el aserrín (Gámez 2008).

Cuadro 3. Efecto de la temperatura de digestión en el rendimiento de azúcares reductores y en la degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina durante el pretratamiento ácido-diluido.

| Temperatura (°C) | Azúcares Reductores (%) Media ± D.E. £ | Celulosa (%) Media ± D.E. £ | Hemicelulosa (%) Media ± D.E. £ | Lignina (%) Media ± D.E. £ |
|------------------|---|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| 30 | 42.08±1.10 ^a | 10.54±0.26 ^a | 99.99±0.00 ^a | 10.98±0.09 ^a |
| 10 | 34.41±0.28 ^b | 6.91±0.08 ^b | 94.29±0.53 ^b | 8.39±0.36 ^b |

^{a-b} Tratamientos seguidos de diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05).

£ D.E. Desviación Estándar.

Efecto de la concentración de H₂SO₄ en el pretratamiento. En el Cuadro 4 se observó que al igual que el factor temperatura (Cuadro 3), a medida que la concentración de H₂SO₄ aumentó en el pretratamiento, así incrementó la cantidad de hemicelulosa digerida, lignina solubilizada y celulosa despolimerizada. Esto concuerda con los resultados de Cara *et al.* (2008), donde existió una correlación entre el aumento de la concentración del reactivo ácido hidrolizante, la liberación de azúcares fermentables y la solubilización de la matriz de la pared celular del material lignocelulósico.

Cuadro 4. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico en el rendimiento de azúcares reductores y en la degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina durante el pretratamiento ácido-diluido.

| H ₂ SO ₄ (%) | Azúcares Reductores (%) Media ± D.E. £ | Celulosa (%) Media ± D.E. £ | Hemicelulosa (%) Media ± D.E. £ | Lignina (%) Media ± D.E. £ |
|------------------------------------|---|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| 6 | 47.39±0.65 ^a | 14.52±0.33 ^a | 99.99±0.00 ^a | 13.76±0.04 ^a |
| 4 | 43.19±0.84 ^b | 11.35±0.14 ^b | 99.96±0.00 ^b | 10.22±0.27 ^b |
| 2 | 24.15±0.59 ^c | 0.31±0.03 ^c | 91.47±0.79 ^c | 5.08±0.38 ^c |

^{a-c} Tratamientos seguidos de diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05).

£ D.E. Desviación Estándar.

4. CONCLUSIONES

- La interacción entre la temperatura de digestión y la concentración de H_2SO_4 permitió fraccionar la pared celular del aserrín de *Pinus oocarpa*.
- La concentración de H_2SO_4 fue el factor determinante en la digestión de la lignina y en la despolimerización de la celulosa.
- A partir de la combinación de 2% H_2SO_4 y 130°C se removió el total de hemicelulosa de la matriz de la pared celular del *Pinus oocarpa*.
- El mayor rendimiento de azúcares reductores, la totalidad de hemicelulosa removida y el mayor porcentaje de celulosa y lignina digerida se obtuvo con la combinación 130°C y 6% H_2SO_4 .

5. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio en el cual se evalué el rendimiento de etanol obtenido de la fermentación del hidrolizado resultante del pretratamiento de digestión del aserrín de *Pinus oocarpa*.
- Realizar un estudio donde se determine el perfil de azúcares liberados y la cantidad del inhibidor fermentativo 5-hidroximetilfurfural procedentes del hidrolizado producto del pretratamiento del aserrín de *Pinus oocarpa*.
- Evaluar el efecto del tiempo de digestión en el rendimiento de azúcares reductores y en la cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina digerida durante el pretratamiento del aserrín de *Pinus oocarpa*.
- Explorar el efecto de enzimas hidrolíticas en la despolimerización de la celulosa atrapada en la matriz de la torta remante del pretratamiento del aserrín de *Pinus oocarpa*.
- Realizar un montaje piloto para analizar la factibilidad técnica y financiera de una operación a escala para producir etanol lignocelulósico empleando desechos forestales como materia prima.

6. LITERATURA CITADA

Cara, C; Ruiz, E; Oliva, J; Sáez, F; Castro, E. 2008. Conversion of Olive Tree Biomass into Fermentable Sugars by Dilute Acid Pretrea.

Cuervo, L; Folch, J; Quiroz, R. 2009. Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. Biotecnología Vol. 13, No. 3, 11-25 p.

Gámez, C. 2008. Efecto de la Temperatura y la Concentración de Ácido Sulfúrico en el Pretratamiento para la Producción de Bioetanol a Partir de Estiércol de Ganado Lechero. Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria. Zamorano, Honduras. 30 p.

Godoy, E; Aguirre S; Díaz M. 2001. Rational Use of Forest Residues: Research on Methods for Making Products Such as Animal Feeds, Fertilizers, Cosmetics and Pharmaceuticals from the Foliage and Wood Residues Left Over by the Forest Industry. Forestry department FAO (en línea).

González, M. 2008. Estimación de la Biomasa Aérea y la Captura de Carbono en Regeneración Natural de *Pinus maximinoi* H. E. Moore, *Pinus oocarpa* var. *Ochoterenai* Mtz. y *Quercus* sp. en el Norte del Estado de Chiapas, México. Tesis Sometida a consideración de la Escuela de Posgrado como requisito para optar por el grado de *Magister Scientiae* en Manejo y Conservación de Bosques Naturales y Biodiversidad. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza), Escuela de posgrado. Turrialba, Costa Rica. 97 p.

Hon, D. y Shiraishi, N. 2000. Wood and Cellulosic Chemistry: Chemical Composition and Distribution. Second edition, New York and Basel. Marcel Dekker Inc. 914 p.

Hsu, T. 1996. Pretreatment of Biomass. Wyman, C. (Ed.), Handbook of Bioethanol Production and Utilization. Applied Energy Technology Series. Taylor and Francis, Chapter 10.

Instituto Hondureño de Conservación y Desarrollo Forestal Áreas Protegidas y Vida Silvestre (IFC). 2009. Anuario Estadístico Forestal. Comayagüela M.D.C. Honduras C.A. Vol. 24, 99 p.

Iranmahboob, J; Nadim, F; Monemi, S. 2002. Optimizing Acid-Hydrolysis: A Critical Step for Production of Ethanol from Mixed Wood Chips. Biomass and Bioenergy No. 22, 401–404.

- Liao, W; Liu, Y; Liu, C; Chen, S. 2004. Optimizing Dilute Acid Hydrolysis of Hemicellulose in a Nitrogen-Rich Cellulosic Material-Dairy Manure. *Bioresource Technology* No. 94, 33-41 p.
- Margeot, A; Hahn-Hagerdal, B; Edlund, M; Slade, R; Monot, F. 2009. New Improvements for Lignocellulosic Ethanol. *Biotechnology* No. 20, 372–380 p.
- McMillan, J. 1993. *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuel Production: Pretreatment of Lignocellulosic Biomass*. American Chemical Society, Washington, D.C. 292–323 p.
- Ortiz, A. 2008. Avances en Bioenergía: Pretratamiento de la Biomasa Lignocelulósica para la Producción de Biocombustibles: Aspectos Técnicos y Económicos (en línea). Consultado el 26 de junio 2010. Disponible en:
<http://www.icq.uia.mx/webicq/pdf/irmene.pdf>
- Renewable Fuel Association. 2009. E 85 Fuel Ethanol: Industry Guidelines, Specifications and Procedures. No. 090301, 26 p.
- Rosero, A. 2008. Pretratamiento y Fermentación de la Fibra del Palmito *Bactris gasipaes* para la Producción de Etanol Lignocelulósico. Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria. Zamorano, Honduras. 69 p.
- Saha, C. 2003. Hemicellulose Bioconversion. *J. Ind Microb. Biotec.* Vol. 30: p.279-291.
- Sanchez, G; Pilcher, L; Roslander, C; Modig, T; Galbe, M; Liden, G. 2004. Dilute-Acid Hydrolysis for Fermentation of the Bolivian Straw Material Paja Brava. *Bioresource Technology* No.93, 249-256 p.
- Sun, Y; Cheng, J. 2005. Dilute Acid Pretreatment of Rye Straw and Bermudagrass for Ethanol Production. *Bioresource Technology* No. 96, 1599–1606 p.
- U.S. Department of Energy. 2006. *Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol: a Joint Research Agenda*, U.S Department of Energy Office of Science and Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, DOE/SC-0095. 216 p.
- Wyman, C. 2008. Cellulosic Ethanol: A Unique Sustainable Liquid Transportation Fuel. *Harnessing Materials for Energy*. MRS bulletin Vol.33, 381-383 p.
- Wyman, C; Dale, B; Elander, R; Holtzapple, M; Ladisch; M, Lee. 2005. Coordinated Development of Leading Biomass Pretreatment Technologies. *Bioresource Technology* No. 96. 1959–1966 p.
- Yu, Y; Lou, X; Wu, H. 2008. Some Recent Advances in Hydrolysis of Biomass in Hot-Compressed Water and Its Comparisons with Other Hydrolysis Methods. *Energy & Fuels*, Vol. 22, No. 1, 46–60 p.

Zaldívar, J; Martínez, A; Ingram, L. 1999. Effect of Selected Aldehydes on the Growth and Fermentation of Ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 65, No.1, 24-33 p.

Zappala, M; Fallico, B; Arena, E; Verzera, A. 2005. Methods for the Determination of HMF in honey: A Comparison. *Food Control* No.16, 273–277 p.

7. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza de azúcares reductores liberados durante el pretratamiento.

| Fuente de variación | G.L. | C.M. | F | P* |
|--|------|--------|---------|--------|
| Temperatura | 1 | 264.64 | 318.34 | <.0001 |
| % H ₂ SO ₄ | 2 | 920.21 | 1106.93 | <.0001 |
| Temperatura*% H ₂ SO ₄ | 2 | 7.31 | 8.79 | 0.0344 |

*Probabilidades significativas a < 0.05.

G.L. Grados de Libertad.

C.M. Cuadrados Medios.

Anexo 2. Prueba t de azúcares reductores liberados durante el pretratamiento.

| Tratamiento Vs. Tratamiento | t ^λ | P* |
|---|----------------|--------|
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 110°C, 4% H ₂ SO ₄ | -19.53 | <.0001 |
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 110°C, 6% H ₂ SO ₄ | -21.63 | <.0001 |
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 2% H ₂ SO ₄ | -6.92 | 0.0007 |
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄ | -25.46 | <.0001 |
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | -31.78 | <.0001 |
| 110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 110°C, 6% H ₂ SO ₄ | -2.10 | 0.0480 |
| 110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 2% H ₂ SO ₄ | 12.61 | <.0001 |
| 110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄ | -5.93 | 0.0013 |
| 110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | -12.25 | <.0001 |
| 110°C, 6% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 2% H ₂ SO ₄ | 14.70 | <.0001 |
| 110°C, 6% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄ | -3.84 | 0.0067 |
| 110°C, 6% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | -10.15 | 0.0002 |
| 130°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄ | -18.54 | <.0001 |
| 130°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | -24.86 | <.0001 |
| 130°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | -6.32 | 0.0011 |

* Probabilidades significativas a < 0.05.

^λ diferencia entre las medias.

Anexo 3. Análisis de varianza de hemicelulosa digerida durante el pretratamiento.

| Fuente de variación | G.L. | C.M. | F | P* |
|--|-------------|-------------|----------|-----------|
| Temperatura | 1 | 354.97 | 364.82 | <.0001 |
| % H ₂ SO ₄ | 2 | 144.83 | 350.71 | <.0001 |
| Temperatura*% H ₂ SO ₄ | 2 | 144.81 | 350.68 | <.0001 |

*Probabilidades significativas a < 0.05.

G.L. Grados de Libertad.

C.M. Cuadrados Medios.

Anexo 4. Prueba t de hemicelulosa digerida durante el pretratamiento.

| Tratamiento Vs. Tratamiento | t^λ | P* |
|---|----------------------|-----------|
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 110°C, 4% H ₂ SO ₄ | -16.98 | <.0001 |
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 110°C, 6% H ₂ SO ₄ | -17.05 | <.0001 |
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 2% H ₂ SO ₄ | -17.05 | <.0001 |
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄ | -17.06 | <.0001 |
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | -17.72 | <.0001 |
| 110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 110°C, 6% H ₂ SO ₄ | -17.05 | 0.9034 |
| 110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 2% H ₂ SO ₄ | -0.07 | 0.9030 |
| 110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄ | -0.07 | 0.8997 |
| 110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | -0.07 | 0.9050 |
| 110°C, 6% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 2% H ₂ SO ₄ | 0.00 | 0.9996 |
| 110°C, 6% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄ | 0.00 | 0.9963 |
| 110°C, 6% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | 0.00 | 0.9983 |
| 130°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄ | 0.00 | 0.9967 |
| 130°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | 0.00 | 0.9980 |
| 130°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | 0.00 | 0.9947 |

*Probabilidades significativas a < 0.05.

^λ diferencia entre las medias.

Anexo 5. Análisis de varianza de lignina digerida durante el pretratamiento.

| Fuente de variación | G.L. | C.M. | F | P* |
|--|-------------|-------------|----------|-----------|
| Temperatura | 1 | 30.97 | 209.82 | 0.0001 |
| % H ₂ SO ₄ | 2 | 144.29 | 796.61 | <.0001 |
| Temperatura*% H ₂ SO ₄ | 2 | 12.15 | 84.72 | 0.0005 |

*Probabilidades significativas a < 0.05.

G.L. Grados de Libertad.

C.M. Cuadrados Medios.

Anexo 6. Prueba t de lignina digerida durante el pretratamiento.

| Tratamiento Vs. Tratamiento | t^λ | P* |
|---|----------------------|-----------|
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 110°C, 4% H ₂ SO ₄ | -4.38 | 0.0001 |
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 110°C, 6% H ₂ SO ₄ | -5.93 | <.0001 |
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 2% H ₂ SO ₄ | -0.25 | 0.4689 |
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄ | -6.14 | <.0001 |
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | -11.68 | <.0001 |
| 110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 110°C, 6% H ₂ SO ₄ | -1.54 | 0.0075 |
| 110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 2% H ₂ SO ₄ | 4.13 | 0.0002 |
| 110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄ | -1.75 | 0.0047 |
| 110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | -7.30 | <.0001 |
| 110°C, 6% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 2% H ₂ SO ₄ | -5.68 | <.0001 |
| 110°C, 6% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄ | -0.21 | 0.5304 |
| 110°C, 6% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | -5.76 | <.0001 |
| 130°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄ | -5.89 | <.0001 |
| 130°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | -11.43 | <.0001 |
| 130°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | -5.54 | <.0001 |

*Probabilidades significativas a < 0.05.

^λ diferencia entre las medias.

Anexo 7. Análisis de varianza de celulosa digerida durante el pretratamiento.

| Fuente de variación | G.L. | C.M. | F | P* |
|--|-------------|-------------|----------|-----------|
| Temperatura | 1 | 59.42 | 682.31 | <.0001 |
| % H ₂ SO ₄ | 2 | 333.94 | 3834.88 | <.0001 |
| Temperatura*% H ₂ SO ₄ | 2 | 13.37 | 153.53 | 0.0002 |

*Probabilidades significativas a < 0.05.

G.L. Grados de Libertad.

C.M. Cuadrados Medios.

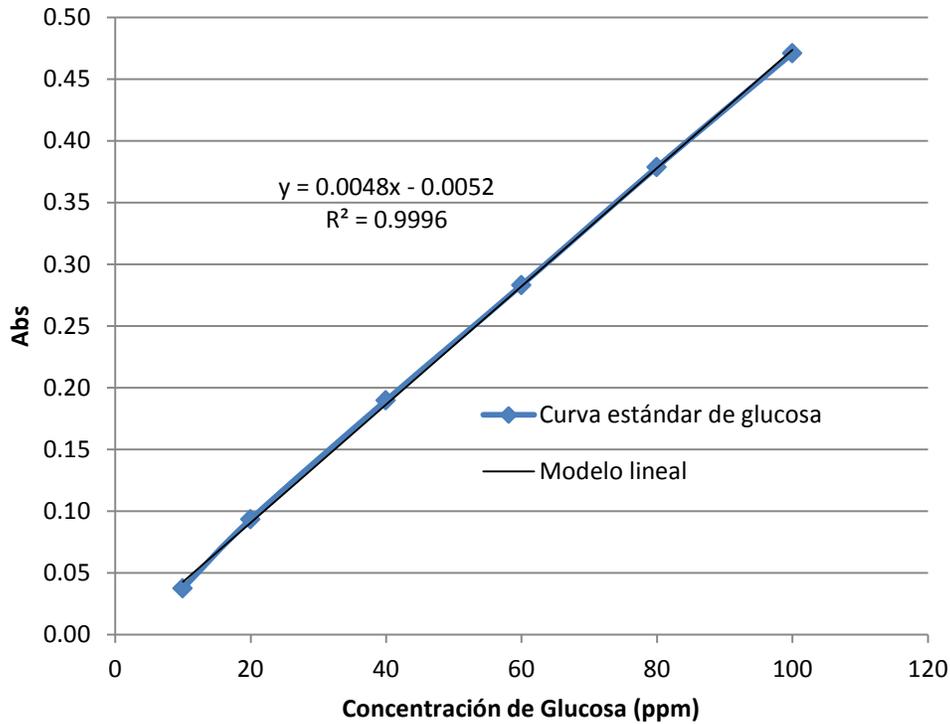
Anexo 8. Prueba t de celulosa digerida durante el pretratamiento.

| Tratamiento Vs. Tratamiento | t^λ | P* |
|---|----------------------|-----------|
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 110°C, 4% H ₂ SO ₄ | -9.39 | <.0001 |
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 110°C, 6% H ₂ SO ₄ | -11.23 | <.0001 |
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 2% H ₂ SO ₄ | -0.54 | 0.0898 |
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄ | -13.25 | <.0001 |
| 110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | -17.72 | <.0001 |
| 110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 110°C, 6% H ₂ SO ₄ | -1.85 | 0.0015 |
| 110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 2% H ₂ SO ₄ | 8.84 | <.0001 |
| 110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄ | -3.87 | <.0001 |
| 110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | -8.35 | <.0001 |
| 110°C, 6% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 2% H ₂ SO ₄ | 10.69 | <.0001 |
| 110°C, 6% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄ | -2.02 | 0.0011 |
| 110°C, 6% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | -6.49 | <.0001 |
| 130°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄ | -12.71 | <.0001 |
| 130°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | -17.19 | <.0001 |
| 130°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄ | -4.48 | <.0001 |

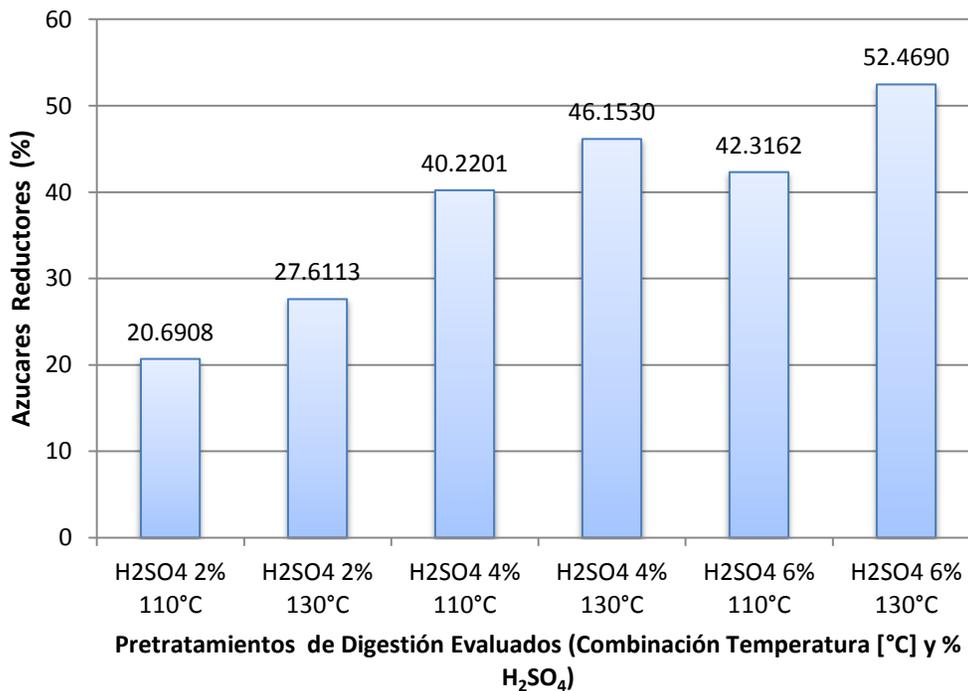
*Probabilidades significativas a < 0.05.

^λ diferencia entre las medias.

Anexo 9. Curva de calibración de glucosa para el análisis de azúcares reductores por el método de Nelson-Somogyi.



Anexo 10. Azúcares reductores liberados de la matriz de la pared celular del aserrín de *Pinus oocarpa*.



Anexo 11. Índice de digestibilidad total de lignocelulosa (hemicelulosa, celulosa y lignina).

