

Efecto de la temperatura y concentración de ácido sulfúrico de pretratamiento de aserrín de *Pinus* spp. en la producción de azúcares y 5-hidroximetilfurfural

Eddy Rodolfo Ixcotoyac Cabrera

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2013

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efecto de la temperatura y concentración de ácido sulfúrico de pretratamiento de aserrín de *Pinus* spp. en la producción de azúcares y 5-hidroximetilfurfural

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

Eddy Rodolfo Ixcotoyac Cabrera

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2013

Efecto de la temperatura y concentración de ácido sulfúrico de pretratamiento de aserrín de *Pinus* spp. en la producción de azúcares y 5-hidroximetilfurfural

Presentado por:

Eddy Rodolfo Ixcotoyac Cabrera

Aprobado:

Francisco Javier Bueso, Ph.D.
Asesor Principal

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

Jorge Cardona, Ph.D.
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Efecto de la temperatura y concentración de ácido sulfúrico de pretratamiento de aserrín de *Pinus* spp. en la producción de azúcares y 5-hidroximetilfurfural

Eddy Rodolfo Ixcotoyac Cabrera

Resumen: Se evaluó el efecto de dos temperaturas (120 y 150 °C) y cuatro concentraciones de H₂SO₄ (0, 5, 7 y 10%) en el pretratamiento ácido para la hidrólisis de los componentes de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y lignina) del aserrín de *Pinus* spp., y la producción de azúcares fermentables y del inhibidor de levadura 5-hidroximetilfurfural. Se evaluó un factorial 2 × 4 con un diseño de parcelas divididas, donde las temperaturas fueron las parcelas principales y las concentraciones de H₂SO₄ las subparcelas. Se determinó la fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y lignina antes y después del tratamiento ácido para calcular los cambios en celulosa, hemicelulosa y lignina. La identificación y cuantificación de azúcares y 5-hidroximetilfurfural se hizo por HPLC. Los resultados se analizaron en el programa estadístico SAS[®] mediante un análisis de varianza y separación de medias mediante LSMeans. La temperatura, concentración de ácido y la interacción de ambos tuvieron efecto significativo en la producción de azúcares, la formación de 5-hidroximetilfurfural, la despolimerización de celulosa y hemicelulosa, pero no para lignina. El tratamiento de 150 °C y 5% H₂SO₄ cumplió el objetivo del pretratamiento al hidrolizar el total de hemicelulosa, sin sobrepasar el límite de 5-hidroximetilfurfural. El tratamiento más severo (150 °C y 10% H₂SO₄), produjo la mayor cantidad de azúcares y la cantidad de 5-hidroximetilfurfural que se formó estuvo dentro del límite de tolerancia de los microorganismos fermentadores (*S. cerevisiae*, *E. coli* LY180 y *K. marxianus*). Los monómeros de azúcar obtenidos fueron glucosa, galactosa y manosa.

Palabras clave: Celulosa, galactosa, glucosa, hemicelulosa, hidrólisis y HPLC.

Abstract: The present study objective was to evaluate the effect of two different temperatures (120 °C and 150 °C) and four concentrations of H₂SO₄ (5, 7 and 10%) in acid pretreatment for hydrolysis of cell wall components (cellulose, hemicellulose and lignin) of *Pinus* spp. sawdust, and the production of fermentable sugars and the yeast inhibitor 5-hydroxymethylfurfural. A split plot design was used with a 2 × 4 factorial arrangement, where temperatures were the main plots and the subplots were the H₂SO₄ concentrations. Neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), and lignin were determined before and after acid treatment to calculate changes in hemicellulose, cellulose and lignin. The identification and quantification of sugars and 5-hydroxymethylfurfural was made by HPLC. The results were analyzed with the statistical program SAS[®] by an analysis of variance and mean separation using LSMeans. Temperature, acid concentration and the interaction of both had significant effect on the production of sugars, the production of 5-hydroxymethylfurfural and the depolymerization of cellulose and hemicellulose. Treatment of 150 °C and 5% H₂SO₄ achieved the objective of the pretreatment by hydrolyzing the total hemicellulose without exceeding the limit of 5-hydroxymethylfurfural. A more severe treatment (150 °C and 10% H₂SO₄), produced the largest amount of sugars and the amount of 5-hydroxymethylfurfural formed, but did not surpass the tolerance limit of the fermenting microorganisms (*S. cerevisiae*, *E. coli* LY180 and *K. marxianus*). Sugar monomers obtained were glucose, galactose and mannose.

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..... | 7 |
| 4 CONCLUSIONES..... | 13 |
| 5 RECOMENDACIONES..... | 14 |
| 6 LITERATURA CITADA..... | 15 |
| 7 ANEXOS..... | 19 |

ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

| Cuadro | Página |
|---|--------|
| 1. Análisis de varianza de los componentes de la torta digerida producto del pretratamiento ácido. | 7 |
| 2. Componentes de la fibra en la torta hidrolizada (g/100 g M.S.). | 8 |
| 3. Análisis de varianza para los azúcares contenidos en el hidrolizado obtenido del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido..... | 9 |
| 4. Azúcares contenidos en el hidrolizado obtenido del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido (g/100 g M.S.) | 9 |
| 5. Análisis de varianza para 5-hidroximetilfurfural en el hidrolizado obtenido del pretratamiento con ácido sulfúrico. | 10 |
| 6. Cantidad de 5-hidroximetilfurfural en el hidrolizado obtenido del pretratamiento con ácido sulfúrico (g/L de hidrolizado)..... | 11 |

| Anexo | Página |
|---|--------|
| 1. Reacciones secundarias de degradación de los azúcares obtenidos del pretratamiento ácido (Jönsson <i>et al.</i> 2013). | 19 |
| 2. Curvas de calibración para la cuantificación de azúcares, utilizando la columna Hi-plex Ca (Contreras 2011). | 19 |
| 3. Curva de calibración para la cuantificación de 5-hidroximetilfurfural, utilizando la columna LC ZORBAX Eclipse XDB-C 18 (Ixcotoyac y Tuyuc 2013). | 20 |
| 4. Cromatograma de azúcares obtenidos con 120 °C y 5% H ₂ SO ₄ | 20 |
| 5. Cromatograma de azúcares obtenidos con 120 °C y 7% H ₂ SO ₄ | 21 |
| 6. Cromatograma de azúcares obtenidos con 120 °C y 10% H ₂ SO ₄ | 21 |
| 7. Cromatograma de azúcares obtenidos con 150 °C y 5% H ₂ SO ₄ | 22 |
| 8. Cromatograma de azúcares obtenidos con 150 °C y 7% H ₂ SO ₄ | 22 |
| 9. Cromatograma de azúcares obtenidos con 150 °C y 10% H ₂ SO ₄ | 23 |
| 10. Cromatograma de 5-hidroximetilfurfural con 150 °C. | 23 |
| 11. Cromatograma de 5-hidroximetilfurfural con 120 °C. | 24 |
| 12. Lista de materiales, equipos y reactivos utilizados durante el estudio. | 24 |

1. INTRODUCCIÓN

Para evitar generar un desbalance en la seguridad alimentaria, se debe producir biocombustibles de segunda generación producidos a base de materias primas que no son fuentes alimenticias. El inconveniente es que se emplean tecnologías que todavía se encuentran en etapas de investigación y desarrollo, y con costos de producción elevados (IICA 2007). En el caso particular de la producción de etanol lignocelulósico, en su elaboración se emplean restos de cosechas, tallos de maíz, bagazo de caña, arboles de rápido crecimiento y residuos de la industria maderera (aserrín) (IICA 2007). Estas materias primas están compuestas de tres clases de polímeros: celulosa, lignina y hemicelulosa. La composición química de especies coníferas oscila entre (41-50%) celulosa, (15-25%) hemicelulosa y lignina (10-25%) (Nuñez 2011 y Orozco *et al.* 2011). Las fuentes de biomasa lignocelulósica son más amigables con el ambiente, ya que sus emisiones de gases se consideran como un gas neutro de efecto invernadero, debido a que la cantidad de CO₂ que emiten en la combustión, es la misma cantidad que secuestran durante la fotosíntesis (Rudie 2007).

Para poder extraer los azúcares de los materiales lignocelulósico, existen tres procesos: hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática y el proceso termoquímico (Lloyd y Wyman 2005). En la hidrólisis se fragmentan los enlaces entre la celulosa, hemicelulosa y lignina, para formar azúcares fermentables como glucosa, xilosa, arabinosa, manosa, galactosa y compuestos fenólicos. De los monómeros de azúcar producidos, como resultado de la alta temperatura y condiciones ácidas que se utiliza en el pretratamiento algunos de ellos se pueden transformar durante el proceso y formar compuestos tóxicos que afectan el desarrollo de los microorganismos fermentadores, como 5-hidroximetilfurfural (HMF) a partir de las hexosas, y furfural de las pentosas. HMF y furfural pueden también descomponerse en ácido levulínico y ácido fórmico (Cortínez 2010).

La producción de inhibidores en el pretratamiento es un factor crítico, para la siguiente etapa que es la fermentación. Por ello se debe de utilizar la mejor combinación de temperatura y ácido para que el pretratamiento sea efectivo en la hidrólisis de la hemicelulosa, la producción de azúcar y que la formación de inhibidores sea mínima. La resistencia a compuestos inhibidores varía según el tipo de microorganismo fermentador. En *Saccharomyces cerevisiae* se produce retardo en el crecimiento celular cuando el hidrolizado contiene concentraciones de 3 g/L de HMF (Wan *et al.* 2012), para *Escherichia coli* LY180 la tasa de crecimiento se afectó a una concentración de 1 g/L de HMF (Miller *et al.* 2010). Con una concentración de 3.5 g/L se redujo la producción de etanol en un 50% para *Kluyveromyces marxianus* y con una concentración superior a 7 g/L de HMF se inhibió totalmente la fermentación (Oliva 2003).

Para mejorar la eficiencia del proceso de hidrólisis del material lignocelulósico, se puede hacer uso de pretratamientos físicos, físicos-químicos, químicos y biológicos. De los pretratamientos químicos, el ácido es el más utilizado. En este se emplean temperaturas altas (140-170 °C) y bajas concentraciones de ácido (0.5-5 %), el objetivo del pretratamiento es romper el complejo de lignina, hidrolizar la hemicelulosa y reducir el grado de cristalinidad de la celulosa, para mejorar el rendimiento en etapas siguientes (Ruiz 2004).

El uso de ácido sulfúrico en el pretratamiento de maderas suaves ha dado resultados aceptables, Nguyen *et al.* (2000), combinó en el pretratamiento ácido de viruta de maderas suaves 0.4% ácido sulfúrico con vapor a 200-230 °C durante 1-5 minutos y logró después del pretratamiento solubilizar en agua un 90-95% de hemicelulosa y un 20% celulosa. Nuñez (2011), evaluó el efecto de la temperatura y la concentración de ácido sulfúrico en el pretratamiento de digestión de aserrín de pino *Pinus oocarpa* para la producción de etanol lignocelulósico, en la cual se determinó que la combinación de 130 °C y 6% H₂SO₄, fue el mejor tratamiento para obtener el mayor rendimiento de azúcares reductores, la totalidad de hemicelulosa removida y el mayor porcentaje de celulosa y lignina digerida. Gámez (2008) evaluó el 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, en la investigación realizada por Gámez (2008) se puede decir que la temperatura y la concentración del ácido sulfúrico son dos parámetros que deben considerarse juntos para definir las condiciones de pretratamiento de materiales lignocelulósicos e hidrólisis de estos. Rosero (2008) evaluó el pretratamiento y fermentación de la fibra del palmito *Bactris gasipaes* para la producción de etanol lignocelulósico, Rosero (2008) determinó que la fibra de palmito, es una buena fuente de materia prima para producción de etanol lignocelulósico, también encontró que la mejor concentración de ácido para el pretratamiento con ácido diluido de la fibra de palmito fue 0.5% de H₂SO₄. Sin embargo dentro de los estudios realizados en el laboratorio de análisis de alimentos de Zamorano, no se ha determinado la cantidad de inhibidores producidos después del pretratamiento.

Este estudio tuvo los siguientes objetivos:

- Evaluar el efecto de cuatro concentraciones de ácido sulfúrico (0, 5, 7 y 10%) y dos temperaturas (120 y 150 °C), en la producción de azúcares fermentables y del inhibidor de microorganismos fermentadores 5-hidroximetilfurfural.
- Determinar el factor de mayor influencia en la hidrolisis de los componentes de la pared celular del aserrín (celulosa, hemicelulosa y lignina).
- Determinar el tratamiento óptimo para el pretratamiento de aserrín de *Pinus* spp.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ), de la Escuela Agrícola Panamericana, ubicada en el departamento de Francisco Morazán, a 32 kilómetros al Este de Tegucigalpa, Honduras.

Diseño experimental. La investigación se desarrolló bajo el diseño de parcelas divididas. Las parcelas principales fueron las temperaturas del pretratamiento (120 y 150 °C) y como subparcelas las concentraciones de ácido sulfúrico (0, 5, 7 y 10%) diluido en agua destilada v/v, obteniendo una combinación de ocho tratamientos y tres repeticiones, dando un total de 24 unidades experimentales.

Acondicionamiento del aserrín. El aserrín fresco de pino, por su alto contenido de humedad (43%) fue sometido a un proceso de secado en un horno por convección durante tres días a una temperatura de 60 °C y posteriormente se tomó tres muestras representativas de dos kilogramos cada una, constituyendo las tres repeticiones, estas fueron almacenadas en un congelador.

Caracterización del aserrín.

Determinación de humedad, AOAC 934.01. Para determinar la humedad se tomó el peso de seis crisoles de porcelana previamente secados a 105 °C por un periodo de tiempo de 24 horas en el horno Napco modelo 630. A cada crisol se le añadió 3 ± 0.0009 gramos de muestra y se registró el peso de la muestra, dos muestras por cada repetición. Luego se metieron al horno durante 24 horas a 105 °C, una vez finalizado el periodo de secado se enfriaron en el desecador con llave de paso para vacío y una vez fríos se tomó su peso. La humedad contenida en la muestra fue determinada mediante la ecuación 1, en porcentaje (g agua/100 g de aserrín):

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

Análisis de FND (Fibra Neutro Detergente) (AOAC 2002.04 modificado por ANKOM Technology). Se rotuló debidamente las bolsitas filtrantes, dos por cada repetición y una para blanco. Se pesó las bolsitas filtrantes y se registró el peso del blanco (w1), se llevó a cero la balanza. Se pesó 0.5 de aserrín de la muestra en cada bolsita (w2). Se sellaron mediante calor y se distribuyó uniformemente la muestra dentro de la bolsita, se colocaron las bolsitas en la gradilla. Se agregó 100 mL de solución neutro detergente, dentro de la cámara de digestión por bolsa. Se agregó 4 mL de alfa amilasa termoestable y 0.5 g de sulfito de sodio por cada 50 mL de solución neutro detergente, dentro de la

cámara de digestión. Se cerró herméticamente la cámara de digestión y se encendió en el aparato la agitación y calentamiento a 100 ± 0.5 °C, durante 75 minutos. Después de la extracción se apagó la agitación y calentamiento. Se abrió la válvula de drenaje lentamente al principio debido a que la cámara de digestión se encuentra bajo presión (10-25 psi), una vez drenada la solución se procedió a abrir la cámara. Se agregó 1900 mL de agua destilada (70-90 °C) y 4 mL de alfa amilasa al primero y segundo lavado, se encendió la agitación por 5 minutos. Se repitió el lavado tres veces. Se exprimió el exceso de agua en las bolsitas. Se colocaron en un beaker de 250 mL y se agregó suficiente acetona para cubrir las bolsas y se dejó durante 3-5 minutos. Se removió las bolsitas de la acetona y se dejaron secando durante 2-4 horas en el horno a 105 °C. Después del secado, se dejaron enfriar en un desecador y se registró su peso (w3). La FND se obtuvo mediante la ecuación 2, en porcentaje (g FND/100 g de aserrín):

$$\%FND = \frac{(w3 - (w1 \times c1))}{w2} \times 100 \quad [2]$$

Dónde:

W1= Peso de la bolsa (g).

W2= Peso de la muestra (g).

W3= Peso seco de la bolsa con fibra después del proceso de extracción (g).

C1= Corrección de la bolsa del blanco. (peso seco de la bolsa del blanco dividido por el peso original de la bolsa del blanco)

Análisis de FAD (Fibra Ácido Detergente) (AOAC 973.18 modificado por ANKOM Technology). Se rotuló debidamente las bolsitas filtrantes, dos por cada repetición y una para blanco. Se pesó las bolsitas filtrantes y se registró el peso del blanco (w1), se llevó a cero la balanza. Se pesó 0.5 de aserrín de la muestra en cada bolsita (w2). Se sellaron mediante calor y se distribuyó uniformemente la muestra dentro de la bolsita, se colocaron las bolsitas en la gradilla. Se agregó 100 mL de solución ácido detergente, dentro de la cámara de digestión por bolsa. Se cerró herméticamente la cámara de digestión y se encendió en el aparato la agitación y calentamiento a 100 ± 0.5 °C, durante 60 minutos. Después de la extracción se apagó la agitación y calentamiento. Se abrió la válvula de drenaje lentamente al principio debido a que la cámara de digestión se encuentra bajo presión (10-25 psi), una vez drenada la solución se procedió a abrir la cámara. Se agregó 1900 mL de agua destilada (70-90 °C) para el lavado, se encendió la agitación por 5 minutos. Se repitió el lavado tres veces. Se exprimió el exceso de agua en las bolsitas. Se colocaron en un beaker de 250 mL y se agregó suficiente acetona para cubrir las bolsas y se dejó durante 3-5 minutos. Se removió las bolsitas de la acetona y se dejaron secando durante 2-4 horas en el horno a 105 °C. Después del secado, se dejaron enfriar en un desecador y se registró su peso (w3). La FAD se obtuvo mediante la ecuación 3, en porcentaje (g FAD/100 g de aserrín):

$$\%FAD = \frac{(w3 - (w1 \times c1))}{w2} \times 100 \quad [3]$$

Dónde:

W1= Peso de la bolsa (g).

W2= Peso de la muestra (g).

W3= Peso seco de la bolsa con fibra después del proceso de extracción (g).

C1= Corrección de la bolsa del blanco. (Peso seco de la bolsa del blanco dividido por el peso original de la bolsa del blanco)

Análisis de LAD (Lignina Ácido Detergente) en beakers (AOAC 949.04 modificado por ANKOM Technology). Las bolsas secas con muestra, empleadas en el análisis de fibra ácido detergente, se colocaron en un beaker de 3 L y se cubrió completamente las bolsas con una solución de 72% de ácido sulfúrico (w/w). Se colocó un beaker de 2 L dentro del beaker de 3 L para mantener las bolsas sumergidas. Se agitaron las bolsas dentro de la solución al inicio, y a intervalos de 30 minutos, empujando suavemente y levantando el beaker de 2 L de arriba a abajo unas 30 veces. Después de 3 horas se vierte fuera el ácido. Se lavó con agua destilada (70-90 °C), se repitió el lavado tres veces. Se colocaron en un beaker de 250 mL y se agregó suficiente acetona para cubrir las bolsas y se dejó durante 3-5 minutos. Se removió las bolsitas de la acetona y se dejaron secando durante 2-4 horas en el horno a 105 °C. Se tomaron crisoles previamente secados en el horno a 105 °C durante 24 horas, se registró el peso de cada crisol, y se introdujo cada bolsa en un crisol, se introdujo el crisol incluyendo la bolsa en la mufla a 525 °C durante 3 horas. Finalizado el tiempo, se dejaron enfriar en un desecador y se registró su peso (w4). La LAD se determinó mediante la ecuación 4, en porcentaje (g LAD/100 g de aserrín):

$$\%LAD = \frac{(w4 - (w1 \times c2))}{w2} \times 100 \quad [4]$$

Dónde:

W1= Peso de la bolsa (g).

W2= Peso de la muestra (g).

W3= Peso seco de la bolsa con fibra después del proceso de extracción (g).

W4= Peso de la materia orgánica (g).

C1= Corrección de la bolsa del blanco. (peso seco de la bolsa del blanco dividido por el peso original de la bolsa del blanco)

C2= Corrección de la ceniza de la bolsa del blanco (pérdida de peso por incineración de la bolsa del blanco dividido por el peso original del blanco)

Para la determinación de celulosa, hemicelulosa y lignina del aserrín. Se determinó mediante las ecuaciones 5, 6 y 7:

$$\%Hemicelulosa = \%FND - \%FAD \quad [5]$$

$$\%Celulosa = \%FAD - \%LAD \quad [6]$$

$$\%Lignina = \%LAD \quad [7]$$

Pretratamiento ácido. Se pesó 5 g de muestra seca de aserrín y se depositó dentro de los tubos del digestor Kjeltex 8100 Foss, se añadió 55 mL de H₂SO₄ diluido a las diferentes concentraciones evaluadas (0, 5, 7 y 10%) a cada tubo en relación 1:11 (materia seca:

solución de ácido sulfúrico). Se llevó el digestor a las temperaturas evaluadas (120 y 150 °C), una vez alcanzada la temperatura se colocaron los tubos en el digestor. Se sometió a digestión durante dos horas. Se dejó enfriar los tubos y luego se filtró al vacío en crisoles Gooch, para separar el hidrolizado (fracción líquida compuesta de los azúcares e inhibidores) y la torta (componentes sin hidrolizar). Se registró el volumen obtenido del hidrolizado y la torta fue lavada con agua destilada a 70 °C para remover el remanente de la solución ácida, luego se secó en el horno al vacío Napco 630 durante 24 horas a 60 °C, posteriormente se registró el peso de la torta seca. Se tomó un volumen de 2.5 mL de hidrolizado, se hizo la medición de pH y se neutralizó a pH 7 con una solución de hidróxido de sodio 3N, seguidamente se aforo en un matraz volumétrico de 50 mL con agua destilada, la muestra se almacenó congelada a 0 °C hasta el momento del análisis de perfil de azúcares y 5-hidroximetilfurfural por HPLC.

Determinación de azúcares del hidrolizado obtenido (AOAC 982.14). El hidrolizado se llevó a temperatura ambiente y se verificó el pH (7.0), luego las muestras fueron filtradas a través de un filtro de jeringa de 0.45 µm PTFE, se colocaron en un vial para muestras de 1.5 mL y se realizó el análisis en el HPLC. Las condiciones cromatográficas fueron: columna Hi-plex Ca 300 x 7.7 mm, volumen de 20 µL temperatura de la columna 85 °C, fase móvil H₂O desionizada (DI), velocidad de flujo 0.6 mL/min, tiempo de corrida 30 min y detector IR (Contreras, 2011). La cuantificación se hizo reemplazando el área bajo la curva (y) en la ecuación de la curva de calibración correspondiente al compuesto, el resultado obtenido (x) en mg/mL de hidrolizado se multiplicó por el factor de dilución para hacer la conversión a mg de azúcar/g de materia seca de aserrín de pino, posteriormente se dividió dentro de 10 para pasar el resultado y reportarlo como g de azúcar/100 g de aserrín. El factor de dilución (220), es la relación 1:11 (aserrín: solución ácido) y 1:20 (hidrolizado: agua más NaOH utilizado en la neutralización)

Determinación de 5-hidroximetilfurfural por HPLC (Li y Xiu-yang 2005, Rufian *et al.* 2001, Xu *et al.* 2007 y Windsor *et al.* 2012). El vial se preparó de igual forma que el empleado para el análisis de azúcares. Las condiciones cromatográficas fueron las descritas en el plan del LAAZ de calibración y validación interna de determinación de 5-hidroximetilfurfural por HPLC: columna LC ZORBAX Eclipse XDB-C 18, 4.6 × 150 mm, 5 µm, *guard column* Eclipse XDB-C 18, 4.6 × 12.5 mm, 5 µm, volumen de inyección de 20 µl, fase móvil 95% H₂O DI y 5% acetonitrilo, velocidad de flujo 0.7 mL/min, tiempo de corrida 10 min y detector DAD (Ixcotoyac y Tuyuc 2013). La cuantificación del compuesto se hizo reemplazando el área bajo la curva (y) en la ecuación de obtenida de la calibración correspondiente al compuesto, el resultado obtenido (x) en mg /mL de hidrolizado se multiplicó por el factor de dilución para hacer la conversión a mg de HMF/g de materia seca de aserrín de pino, posteriormente se multiplicó por 5 para obtener el resultado en mg HMF/5 g de aserrín, posteriormente se dividió en 55 para convertir este resultado a g HMF/L de hidrolizado. El factor de dilución (220) es el mismo utilizado en el análisis de azúcares.

Análisis estadístico. Se usó el programa estadístico SAS® versión 9.1, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con una prueba de separación de medias Tukey, con la opción de Tukey ajustado. En el caso de existir efecto significativo de la interacción se usó LSMmeans, con un nivel de significancia de P<0.05.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del aserrín de pino *Pinus* spp. El aserrín de *Pinus* spp. utilizado en este estudio contenía inicialmente 43% de humedad, después del proceso de secado se obtuvo una humedad final de 2.4%. La composición en base seca fue 50% de celulosa, 15.2% hemicelulosa, 27.7% lignina y 7% otros. Los resultados obtenidos en la composición química del aserrín utilizado, concuerdan con los obtenidos en otros estudios similares utilizando biomasa proveniente de especies de coníferas (Maldonado 2006, Orozco *et al.* 2011 y Stoffel *et al.* 2012).

Efecto de la temperatura y la hidrólisis ácida. La temperatura y la concentración de ácido sulfúrico afectaron significativamente ($P=0.01$) la cantidad de hemicelulosa y celulosa digerida durante el pretratamiento, siendo la concentración de H_2SO_4 el factor que ejerció mayor efecto en la hemicelulosa (Cuadro 1). La temperatura tuvo mayor efecto en la digestión de la celulosa comparado con la concentración de H_2SO_4 . Al haber un incremento de temperatura del pretratamiento disminuye el grado de cristalinidad en la estructura de la celulosa (Martínez *et al.* 2011). La interacción entre temperatura y concentración de H_2SO_4 fue significativa para hemicelulosa y celulosa digerida. El ácido sulfúrico conjunto con temperatura alta digiere la hemicelulosa, modifica la estructura de la lignina, dando mayor exposición a la matriz de celulosa (Venkatesh *et al.* 2010). La temperatura ($P=0.25$), la concentración de H_2SO_4 ($P=0.69$) y la interacción entre ambos factores ($P=0.92$) no afectaron significativamente el contenido de lignina (Cuadro 1).

Cuadro 1. Análisis de varianza de los componentes de la torta digerida producto del pretratamiento ácido.

| Fuente de variación | Hemicelulosa | | Celulosa | | Lignina | |
|----------------------------------|--------------|-------|----------|-------|---------|------|
| | F | P | F | P | F | P |
| Temperatura | 853.83 | <0.01 | 861.19 | <0.01 | 1.43 | 0.25 |
| % H_2SO_4 | 1450.40 | <0.01 | 483.87 | <0.01 | 0.49 | 0.69 |
| Temperatura \times % H_2SO_4 | 16.05 | <0.01 | 16.32 | <0.01 | 0.17 | 0.92 |

Cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina residual en la torta digerida. El control (0% H_2SO_4 a 120 °C), causó el menor grado de digestión en el contenido de hemicelulosa, celulosa y lignina.

Utilizando la mayor concentración de ácido a 120 °C no fue posible digerir totalmente la hemicelulosa, pero se puede observar claramente al comparar con el control que la concentración de ácido fue el factor que marco más diferencia en la cantidad de hemicelulosa hidrolizada, a pesar de que también la temperatura y la interacción de ambos ejercieron un efecto significativo sobre la hemicelulosa. Con 150 °C y por lo menos 5% H₂SO₄ se logró digerir totalmente el contenido de hemicelulosa (Cuadro 2). El incremento en la temperatura potencializa el efecto del ácido y aumenta la digestión de hemicelulosa. De igual forma permite digerir la mayor cantidad de celulosa en materiales lignocelulósicos. Los resultados obtenidos concuerdan con estudios similares de pretratamiento ácido de biomasa realizados por Mateus *et al.* 2012 y Nuñez 2011. A partir del tratamiento con 150 °C y 5% H₂SO₄ se logró hidrolizar totalmente la hemicelulosa, por lo que con la menor concentración de ácido se cumplió con la finalidad del pretratamiento.

La hemicelulosa por su estructura heterogénea resulta más fácil su hidrólisis por la acción de ácidos y temperatura, comparada con la celulosa que posee una estructura homogénea y un grado de polimerización que varía según el tipo de plantas (Taherzadeh y Karimi 2007). El incremento en la digestibilidad de celulosa está ligado principalmente a la remoción total de la hemicelulosa comparado con la eliminación de la lignina, según lo determinado en el estudio de Um *et al.* (2003).

La cantidad de lignina removida en el aserrín de *Pinus* spp., no tuvo diferencias significativas en todos los tratamientos, la lignina por su grado de complejidad estructural y enlaces covalentes muestra una remoción mínima después del pretratamiento con ácido diluido, esta presenta una alta resistencia a degradación química y enzimática (Ramírez *et al.* 2013, Taherzadeh y Karimi 2007 y University of Borås 2012).

Cuadro 2. Componentes de la fibra en la torta hidrolizada (g/100 g M.S.).

| Tratamiento | Hemicelulosa Media ± D.E. [‡] | Celulosa Media ± D.E. [‡] | Lignina Media ± D.E. [‡] |
|--|---|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 120 °C, 0% H ₂ SO ₄ | 10.13±0.54 ^a | 45.73±0.85 ^a | 27.26±0.37 ^a |
| 150 °C, 0% H ₂ SO ₄ | 8.30±0.36 ^b | 37.99±0.18 ^b | 27.17±0.17 ^a |
| 120 °C, 5% H ₂ SO ₄ | 3.64±0.09 ^c | 39.44±0.15 ^b | 27.24±0.14 ^a |
| 120 °C, 7% H ₂ SO ₄ | 3.39±0.12 ^{cd} | 37.77±0.17 ^b | 27.08±0.13 ^a |
| 120 °C, 10% H ₂ SO ₄ | 2.79±0.17 ^d | 27.02±0.61 ^c | 27.02±0.61 ^a |
| 150 °C, 5% H ₂ SO ₄ | 0.02±0.00 ^e | 28.36±1.15 ^c | 26.81±1.45 ^a |
| 150 °C, 7% H ₂ SO ₄ | 0.00±0.00 ^e | 22.55±1.79 ^d | 26.70±1.59 ^a |
| 150 °C, 10% H ₂ SO ₄ | 0.00±0.00 ^e | 16.34±1.13 ^e | 26.20±1.03 ^a |
| Coefficiente de variación (%) | 6.93 | 2.92 | 3.35 |

[‡] Desviación estándar.

^{a-e} Tratamientos con diferente letra en la misma columna son diferentes estadísticamente (P<0.05).

Azúcares obtenidos en el hidrolizado producto del pretratamiento. Según lo obtenido en el análisis de varianza los factores evaluados (temperatura y concentración de H₂SO₄) y

la interacción entre ambos, afectaron de manera significativa ($P=0.01$) la cantidad de azúcares totales, glucosa, galactosa y manosa (Janga *et al.* 2012). Sin embargo el factor que ejerció mayor influencia en la producción de azúcares fue la concentración de ácido sulfúrico (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis de varianza para los azúcares contenidos en el hidrolizado obtenido del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido

| Fuente de variación | Total Azúcares | | Glucosa | | Galactosa | | Manosa | |
|---|----------------|-------|---------|-------|-----------|-------|---------|-------|
| | F | P | F | P | F | P | F | P |
| Temperatura | 393.42 | <0.01 | 408.90 | <0.01 | 110.91 | <0.01 | 1345.96 | <0.01 |
| %H ₂ SO ₄ | 1885.58 | <0.01 | 714.91 | <0.01 | 2280.70 | <0.01 | 1649.92 | <0.01 |
| Temperatura × %H ₂ SO ₄ | 58.31 | <0.01 | 60.34 | <0.01 | 13.22 | <0.01 | 344.04 | <0.01 |

Cuadro 4. Azúcares contenidos en el hidrolizado obtenido del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido (g/100 g M.S.)

| Tratamiento | Total Azúcares | Glucosa | Galactosa | Manosa |
|--|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Media ± D.E. [‡] | Media ± D.E. [‡] | Media ± D.E. [‡] | Media ± D.E. [‡] |
| 150 °C, 0% H ₂ SO ₄ | 0.32±0.00 ^e | 0.00±0.00 ^f | 0.00±0.00 ^d | 0.32±0.00 ^f |
| 120 °C, 0% H ₂ SO ₄ | 0.78±0.00 ^e | 0.08±0.00 ^f | 0.00±0.00 ^d | 0.70±0.00 ^e |
| 120 °C, 5% H ₂ SO ₄ | 12.37±0.25 ^d | 3.15±0.16 ^e | 7.72±0.07 ^c | 1.50±0.25 ^d |
| 120 °C, 7% H ₂ SO ₄ | 13.26±0.22 ^d | 3.37±0.19 ^e | 8.30±0.13 ^c | 1.59±0.22 ^{cd} |
| 120 °C, 10% H ₂ SO ₄ | 15.68±0.20 ^c | 4.09±0.07 ^d | 9.89±0.08 ^b | 1.70±0.20 ^c |
| 150 °C, 5% H ₂ SO ₄ | 16.84±0.10 ^{bc} | 4.90±0.10 ^c | 9.33±0.12 ^b | 2.61±0.10 ^b |
| 150 °C, 7% H ₂ SO ₄ | 17.98±0.95 ^b | 5.95±0.37 ^b | 9.45±0.57 ^b | 2.59±0.95 ^b |
| 150 °C, 10% H ₂ SO ₄ | 21.67±0.77 ^a | 7.36±0.45 ^a | 11.32±0.32 ^a | 3.00±0.77 ^a |
| Coefficiente de variación (%) | 3.73 | 6.35 | 3.54 | 2.91 |

[‡]Desviación estándar.

^{a-f} Tratamientos con diferente letra en la misma columna son diferentes estadísticamente ($P<0.05$).

Los azúcares presentes en el hidrolizado obtenido del pretratamiento ácido fueron glucosa, galactosa y manosa. Estos resultados concuerdan con estudios de pretratamiento ácido realizado en residuos de maderas suaves (Contreras 2011 y Eckholt 2011).

En el Cuadro 4 se observa que el tratamiento con 150 °C y 5% H₂SO₄ hidrolizó completamente la hemicelulosa con la menor concentración de ácido no fue el que produjo la mayor cantidad de azúcares totales, pero según la prueba estadística LSmeans

ocupa el segundo lugar junto a 150 °C con 7% H₂SO₄ y 120 °C con 10% H₂SO₄. La mayor producción de azúcares se dio a 150 °C y 10% H₂SO₄ y fue significativamente diferente al resto de tratamientos. Las condiciones más severas de ácido produjeron el mayor rendimiento de azúcares totales que coincide con Nuñez (2011) y Contreras (2011). Bajo condiciones de pretratamiento ácido la velocidad de degradación de los monómeros de azúcar es variante presentando más susceptibilidad en el siguiente orden: xilosa, arabinosa, glucosa, manosa y galactosa (Tahezadeh y Karimi 2007).

Para las dos temperaturas y los tres niveles de H₂SO₄, la cantidad de galactosa obtenida fue superior a la cantidad de glucosa esto se dio a que con el incremento de la temperatura y ácido se logró la digestión total de los galactomananos (Contreras 2011), esto indica que a partir de 120 °C la tasa de degradación de la glucosa se incrementa considerablemente comparado con galactosa. En un estudio utilizando material lignocelulósico proveniente de micro alga marina, se evaluaron tres concentraciones de ácido (0.5, 3.5 y 7% H₂SO₄), se determinó que a mayor concentración de ácido y mayor temperatura, el contenido de galactosa fue superior al de glucosa (Yazdani *et al.* 2011), otro estudio determinó que al incrementar la concentración de ácido y manteniendo la temperatura, la cantidad de galactosa obtenida en el hidrolizado fue superior que la glucosa, esto ligado también al aumento en el tiempo de hidrolisis (Sun y Cheng 2005).

Estudios similares efectuados con materiales lignocelulósicos reportan que existe una relación positiva en el aumento de temperatura y concentración de ácido, reflejada en el incremento de glucosa obtenida en el hidrolizado, esto debido a que cuando las condiciones de ácido y temperatura son más severas, hidrolizan con mayor facilidad y por completo la hemicelulosa, dejando expuesta la celulosa para ser hidrolizada (Redding *et al.* 2010). Sin embargo en un estudio similar se evaluó el pretratamiento con ácido sulfúrico del pasto maralfalfa *Pennisetum glaucum x Pennisetum purpureum*, a diferentes temperaturas (110, 130, 150, 170, y 190 °C) se determinó que la máxima producción de glucosa se dio a 150 °C, a temperaturas mayores el contenido de glucosa fue reduciendo drásticamente debido a su degradación en 5-hidroximetilfurfural (Donohoe *et al.* 2011, Lloyd y Wyman 2005 y Mateus *et al.* 2012).

Para obtener la máxima cantidad de glucosa se debe tomar en cuenta la combinación de los factores temperatura y tiempo de pretratamiento, ya que el mayor rendimiento se da cuando hay una temperatura alta de pretratamiento y un periodo de tiempo corto, o a una baja temperatura pero un largo periodo de pretratamiento, la temperatura a la que se obtienen los mayores rendimientos de glucosa es crítica para la xilosa ya que provoca su degradación (Garlock *et al.* 2011).

Producción de 5-hidroximetilfurfural. Según el análisis de varianza, la temperatura, concentración de ácido y la interacción entre ambos factores afectaron de manera significativa (P=0.01) la producción de 5-hidroximetilfurfural (Redding *et al.* 2010), sin embargo la concentración de H₂SO₄ fue el factor de mayor importancia (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza para 5-hidroximetilfurfural en el hidrolizado obtenido del pretratamiento con ácido sulfúrico.

Fuente de variación

5-Hidroximetilfurfural

| | F | P |
|---|----------|----------|
| Temperatura | 856.49 | <0.01 |
| Concentración %H ₂ SO ₄ | 1360.65 | <0.01 |
| Temperatura*%H ₂ SO ₄ | 108.99 | <0.01 |

En el Cuadro 6 se puede observar que en los tratamientos con una temperatura de 150 °C y los niveles de H₂SO₄ evaluados se formó una mayor cantidad de 5-hidroximetilfurfural comparado con los de 120 °C. En el control (0% H₂SO₄) no se detectó la presencia de 5-hidromimetilfurfural debido a que las cantidades de azúcar (glucosa, galactosa, manosa) obtenidas del pretratamiento fueron relativamente bajas. La formación de compuestos inhibidores y productos de degradación a partir de azúcares se ve favorecida durante el pretratamiento por el aumento de temperatura y concentración de ácido (Mateus *et al.* 2012).

El tratamiento más severo (150 °C, 10% H₂SO₄) formó una cantidad máxima de 5-hidroximetilfurfural de 0.065 g/L de hidrolizado, pero según la prueba de LSMeans no hubo diferencia estadística con los tratamiento de 150 °C con 5 y 7%. Esto es relativamente bajo, en otro estudio de pretratamiento de material lignocelulósico se determinó que la formación máxima de 5-hidroximetilfurfural fue 0.31 g/L de hidrolizado en las condiciones más severas de temperatura y ácido (Janga *et al.* 2012). Durante la hidrólisis por efecto del ácido y temperatura las pentosas (xilosa y arabinosa) son degradadas a furfural, y las hexosas (glucosa, galactosa y manosa) son degradadas a 5-hidroximetilfurfural, posteriormente tanto el furfural como el 5-hidroximetilfurfural al ser sometidos a condiciones ácidas y temperatura elevada se degradan a otros productos como ácido fórmico y levulínico (Cortínez 2010, Janga *et al.* 2012 y Jönsson *et al.* 2013 y Oliva 2003).

El contenido de 5-hidroximetilfurfural presente en el hidrolizado es un factor determinante para la etapa de fermentación posterior al pretratamiento, ya que este tiene efectos negativos en la actividad de los microorganismos fermentadores. En un estudio específico con *Saccharomyces cerevisiae* se determinó que a concentraciones mayores a 3 g/L de 5-hidroximetilfurfural se produce retardo en el crecimiento celular (Wan *et al.* 2012), para *Escherichia coli* LY180 la tasa de crecimiento se afectó a una concentración de 1 g/L de HMF (Miller *et al.* 2010) y para *Kluyveromyces marxianus* con una concentración de 3.5 g/L se redujo la producción de etanol en un 50% (Oliva 2003). La concentración máxima determinada en este estudio fue de 0.065 g/L, es una concentración apta para el desarrollo adecuado de los microorganismos fermentadores mencionados anteriormente. Otros autores coinciden que el efecto inhibitor del 5-hidroximetilfurfural es menor que el del furfural (Ask *et al.* 2013 y Cortínez 2010).

Cuadro 6. Cantidad de 5-hidroximetilfurfural en el hidrolizado obtenido del pretratamiento con ácido sulfúrico (g/L de hidrolizado)

| Tratamiento | 5-Hidroximetilfurfural (g/L) |
|--------------------|-------------------------------------|
|--------------------|-------------------------------------|

| | Media ± D.E.[‡] |
|--|---------------------------------|
| 120 °C, 0% H ₂ SO ₄ | 0.000±0.000 ^d |
| 150 °C, 0% H ₂ SO ₄ | 0.000±0.000 ^d |
| 120 °C, 5% H ₂ SO ₄ | 0.030±0.001 ^c |
| 120 °C, 7% H ₂ SO ₄ | 0.038±0.003 ^b |
| 120 °C, 10% H ₂ SO ₄ | 0.043±0.002 ^b |
| 150 °C, 5% H ₂ SO ₄ | 0.064±0.000 ^a |
| 150 °C, 7% H ₂ SO ₄ | 0.064±0.001 ^a |
| 150 °C, 10% H ₂ SO ₄ | 0.065±0.002 ^a |
| Coefficiente de variación (%) | 1.53 |

[‡]Desviación estándar.

^{a-d} Tratamientos con diferente letra en la misma columna son diferentes estadísticamente (P<0.05).

4. CONCLUSIONES

- El factor determinante en la hidrólisis de la hemicelulosa fue la concentración de H_2SO_4 , y para la celulosa fue la temperatura.
- El tratamiento de 150 °C y 5% H_2SO_4 logró hidrolizar el total de hemicelulosa, sin sobrepasar el límite de HMF.
- Con el tratamiento de 150 °C y 10% se obtuvo el mayor rendimiento de azúcares y se formó la mayor cantidad de HMF.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio en el cual se determine la cantidad de otros inhibidores fermentativos como furfural, ácido levulínico y ácido fórmico formados durante el pretratamiento ácido del aserrín de *Pinus* spp.
- Realiza un estudio para evaluar el efecto de la hidrólisis enzimática en la despolimerización de la celulosa contenida en el aserrín de *Pinus* spp. pretratado con 150 °C y 5% H₂SO₄.
- Realizar un estudio en el cual se evalué el rendimiento de etanol producto de la fermentación del hidrolizado obtenido del pretratamiento ácido del aserrín de *Pinus* spp.
- Adquirir el “Thermostatted Column Compartment” G1316B SL para mantener una temperatura constante en el análisis de azúcares por HPLC y evitar variaciones por efecto de la temperatura.

6. LITERATURA CITADA

ANKOM TECHNOLOGY. 2011. Métodos para determinar fibra neutro detergente, ácido detergente y lignina (en línea). Consultado 18 de octubre de 2013. Disponible en <http://www.ankom.com/procedures.aspx>

Ask, M., M. Bettiga, V. Mapelli y L. Olsson. 2013. The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* (en línea). Consultado el 19 de octubre de 2012. Disponible en <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/22>

Contreras, J. 2011. Efecto de la temperatura y concentración de ácido sulfúrico en el perfil de azúcares obtenido del pretratamiento de aserrín de *Pinus oocarpa*. Tesis Ing. Agroindustrial, Zamorano, Honduras. 20 p.

Cortínez, V. 2010. Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación. Tesis Ing. químico, Santiago de Chile, Chile, Universidad de Chile. 122 p.

Donohoe, T. Vinzant, R. Elander, B. Hames, S. Thomas y R. Warner. 2011. Comparative material balances around pretreatment technologies for the conversion of switchgrass to soluble sugar. *Journal of Bioresource Technology* 102(2011):11063-11071.

Eckholt, M. 2011. Utilización de la madera de *P. radiata* para producción integrada de etanol y pulpa de celulosa kraft blanqueada (en línea). Consultado el 19 de octubre de 2013. Disponible en http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/54/TDE-2012-02-02T112655Z-3545/Publico/texto%20completo/3

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. Tesis Ing. Agroindustrial, Zamorano, Honduras. 24 p.

Garlock, R., V. Balan, B.E. Dale, V. Ramesh, Y. Lee, Y. Kim, N. Nosier, M. Ladisch, M. Holtzaple, M. Falls, R. Sierra, J. Shi, M. Ebrik, T. Redmond, B. Yang, C. Wyman, B.

IICA. 2007. Preguntas y respuestas más frecuentes sobre biocombustibles, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (en línea). Consultado 19 de agosto de

2013. Disponible en <http://www.iica.int/Esp/organizacion/LTGC/agroenergia/Documentos%20Agroenergia%20y%20Biocombustibles/Preguntas%20y%20respuestas%20m%C3%A1s%20frecuentes%20sobre%20biocombustibles/23>

Janga, K., M. Hagg y S.T. Moe. 2012. Influence of acid concentration, temperature, and time on decrystallization in two-stage concentrated sulfuric acid hydrolysis of pinewood and aspenwood: A statistical approach. *Journal of Bioresources Technology* 7(1):391-411.

Jönsson, L., B. Alriksson y N. Nilvebrant. 2013. Bioconversion of lignocellulose: Inhibitors and detoxification (en línea). Consultado el 19 de octubre de 2013. Disponible en <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/1754-6834-6-16/2013>

Li Ying-hua, Lu Xiu-yang. 2005. Investigation on the origin of 5-HMF in Shengmaiyin decoction by RP-HPLC method. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B.* 6(10):1015-1021.

Lloyd, T. y C.E. Wyman. 2005. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Journal of Bioresource Technology* 96(2005):1967-1977.

Maldonado, M. 2006. Determinación de la composición química de la madera de pino candelillo (*Pinus maximoi* H. E. Moore) procedente de la finca río frío, Tactic, Alta Verapaz. Tesis Ing. Químico. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. 125 p.

Martínez, D., Garriga, L. y Suárez, E. 2011. Efecto del pretratamiento químico en el aserrín de *Pinus sp.* Con vistas a la obtención de etanol. *Centro Azúcar* 38(4):67-71.

Mateus, L., O. Hernández, M. Velásquez y J. Díaz. 2012. Evaluación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido del pasto maralfalfa (*Pennisetum glaucum x Pennisetum purpureum*) para la producción de etanol. *Revista colombiana de biotecnología* 1(4):146-156.

Miller, E., P. Turner, L. Jarboe y L. Ingram. 2010. Genetic changes that increase 5-hydroxymethyl furfural resistance in ethanol-producing *Escherichia coli* LY180 32(5):661-667.

Nguyen, A., P. Tucker, L. Boynton, A. Keller y J. Schell. 2000. Pretratamiento ácido diluido en maderas suaves. *Jornal de bioquímica y biotecnología* 70(72):77-87.

Nuñez, M. 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. Tesis Ing. Agroindustrial, Zamorano, Honduras. 23 p.

Oliva, J. 2003. Efecto de los productos de degradación originados por la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *kleyveromyces marxianus*. Tesis para optar al grado de doctor, Universidad Complutense de Madrid, España. 166 p.

Orozco, A., A. Al-Muhtaseb, A. Albadarin, D. Rooney, G. Walker y M. Ahmad. 2011. Dilute phosphoric acid-catalysed hydrolysis of municipal bio-waste wood shavings using autoclave parr reactor system. *Journal of Bioresource Technology* 102(2011):9076-9082.

Ramírez, D., Y. Hernández, V. León, E. Bordallo. 2013. Líquidos iónicos para la transformación de biomasa lignocelulósica. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar* 47(1):26-37.

Redding, A., Z. Wang, D.R. Keshwani y J.J. Cheng. 2010. High temperature dilute acid pretreatment of coastal Bermuda grass for enzymatic hydrolysis. *Journal of Bioresource Technology* 102(2011):1415-1424.

Rosero, A. 2008. Pretratamiento y fermentación de la fibra del palmito *Bactris gasipaes* para la producción de etanol lignocelulósico. Tesis Ing. Agroindustrial, Zamorano, Honduras. 62 p.

Rudie, A. 2007. Producción de etanol de madera. USDA, Servicios Forestales (en línea). Consultado 22 de agosto de 2013. Disponible en <http://www.csrees.usda.gov/nea/plants/rudie/3>

Rufian, J., B. Garcia y E. Guerra. 2001. Determination of furfural compounds in enteral formula. *Journal of liquid chromatography*. 24(19):3049-3061.

Ruiz, E. 2004. Hidrólisis y fermentación de residuos de tallos de girasol. Tesis doctoral. Andalucía, Universidad de Jaén. 370 p.

Stoffel, R., F.E. Felissia, A. Curvelo, L.M. Gassa y M.C. Area. 2012. Desresinación alcalina y tratamiento ácido de aserrín de pino destinado a biorrefinería. Congreso Internacional de papel, Sao Paulo Brazil. 10 p.

Sun Y. y J.J. Cheng. 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Journal of Bioresource Technology* 96(2005):1599-1606.

Taherzadeh, M. y K. Karimi. 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials. *Journal of Bioethanol review Bio Resources* 2(3):472-499.

Ixcotoyac, E., L. Tuyuc. 2013. Plan de calibración y validación para determinar 5-Hidroximetilfurfural por HPLC, Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ). 17 p.

Um, B., M. Karim y L. Henk. 2003. Effect of sulfuric and phosphoric acid pretreatments on enzymatic hydrolysis of corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 115(25):105-108.

University of Borås. 2012. Biogas from lignocellulosic biomass (en línea). Consultado 16 de octubre de 2013. Disponible en <http://www.avfallsverige.se/fileadmin/uploads/Rapporter/U2012-07/2>

Venkatesh, P., S.U. Volker, W.T. Heller, J. McGuaghey, S. Miller and R. Hester. 2010. Concentrated acid conversion of pine softwood to sugar. Part I: Use of a Twin-Screw Reactor for Hydrolysis Pretreatment. *Chemical Engineering Communications* 194:85–102.

Wan, P., D. Zhai, Z. Wang, X. Yang y S. Tian. 2012. Ethanol Production from Nondetoxified Dilute-Acid Lignocellulosic Hydrolysate by Cocultures of *Saccharomyces cerevisiae* Y5 and *Pichia stipites* CBS6054. *Journal of Biotechnology* 4(2012):520-632.

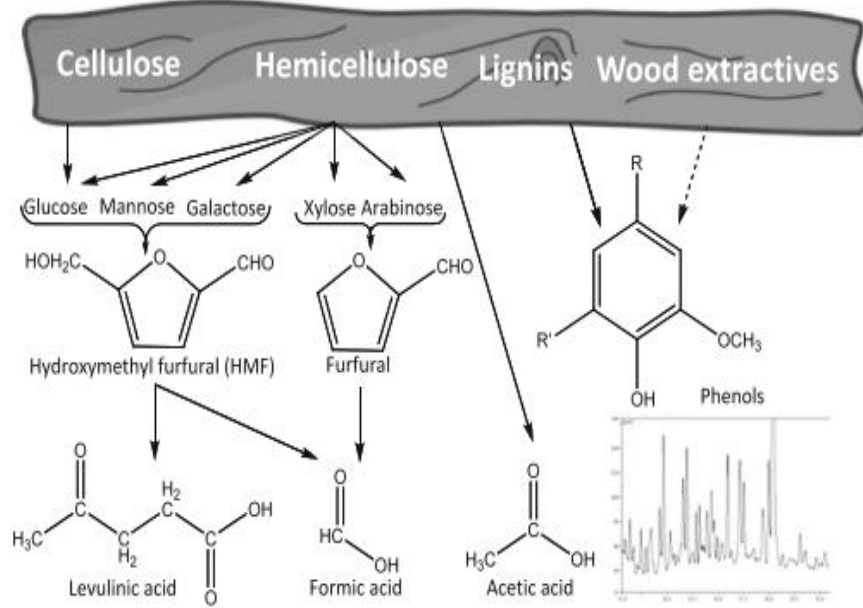
Windsor, S., K. Kavazos y P. Brooks. 2012. The quantitation of hydroxymethylfurfural in Australian *Leptospermum* honeys. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 5(1):21-25.

Xu Qing, Li Ying-hua, Lu Xiu-yang. 2007. Investigation on influencing factors of 5-HMF content in Schisandra. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 8(6):439-445.

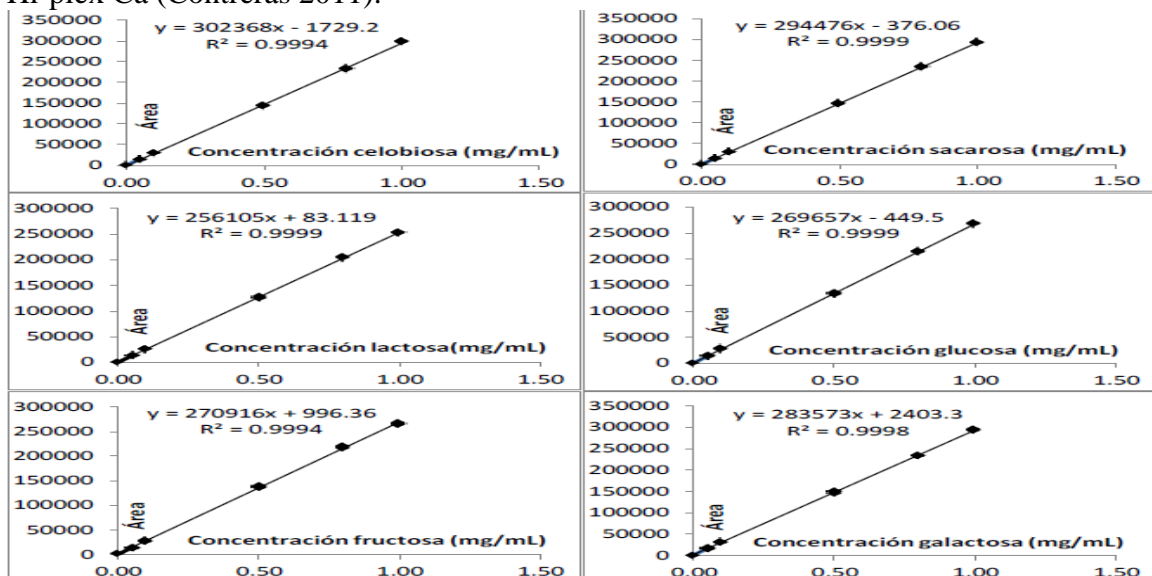
Yazdani, P., K. Karimi y M. Taherzadeh. 2011. Improvement of enzymatic hydrolysis of a marine micro-alga by dilute acid hydrolysis pretreatment (en línea). *Journal of Bioenergy Technology* 25(1):186-191.

7. ANEXOS

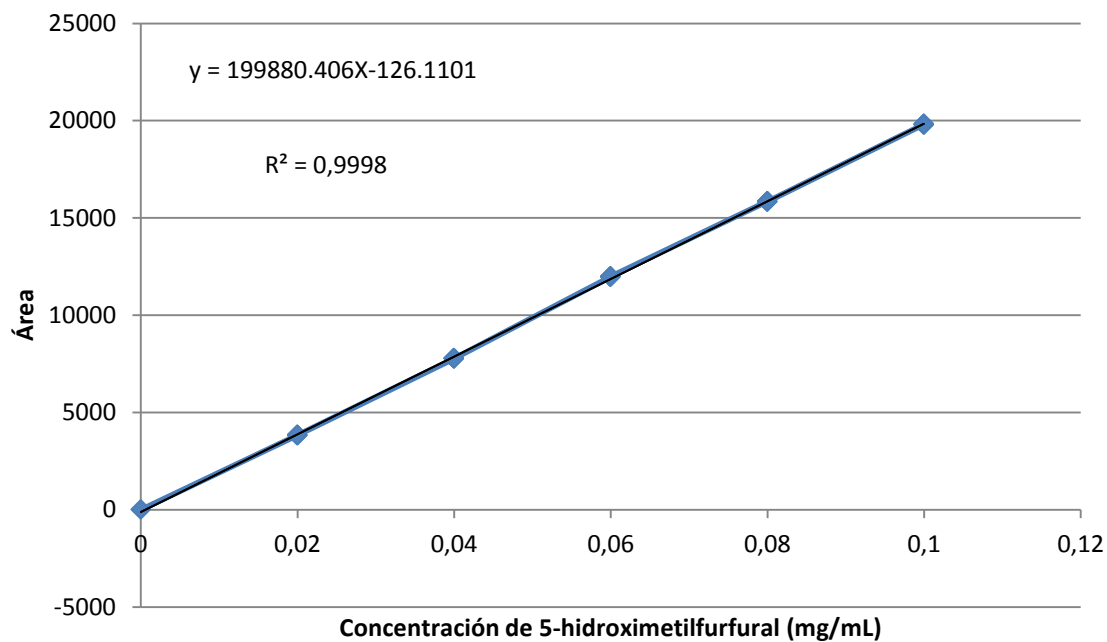
Anexo 1. Reacciones secundarias de degradación de los azúcares obtenidos del pretratamiento ácido (Jönsson *et al.* 2013).



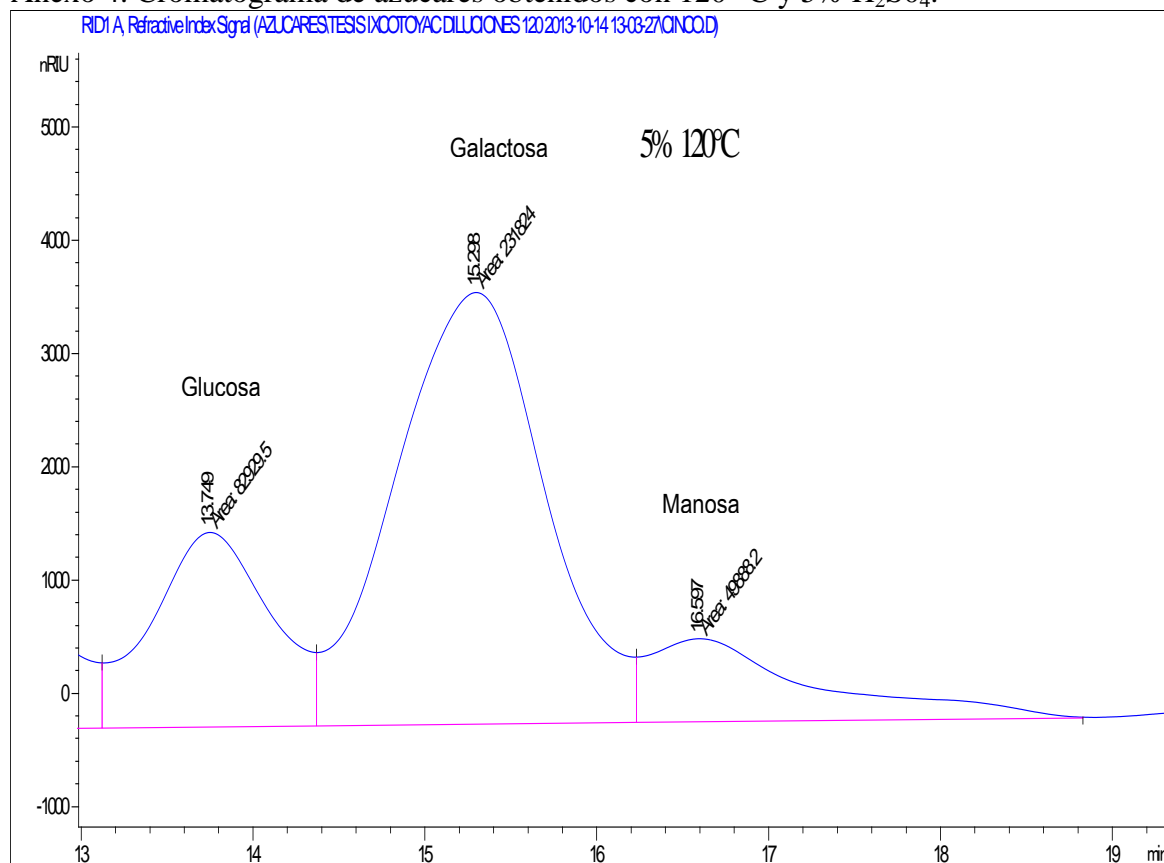
Anexo 2. Curvas de calibración para la cuantificación de azúcares, utilizando la columna Hi-plex Ca (Contreras 2011).



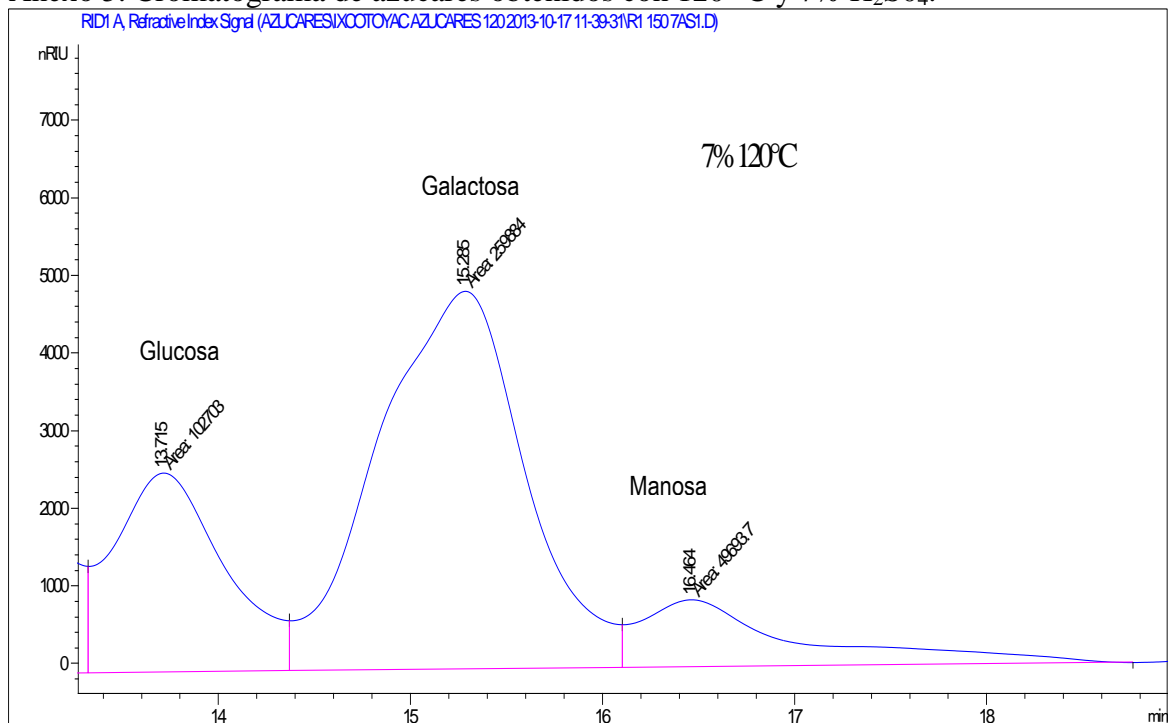
Anexo 3. Curva de calibración para la cuantificación de 5-hidroximetilfurfural, utilizando la columna LC ZORBAX Eclipse XDB-C 18 (Ixcotoyac y Tuyuc 2013).



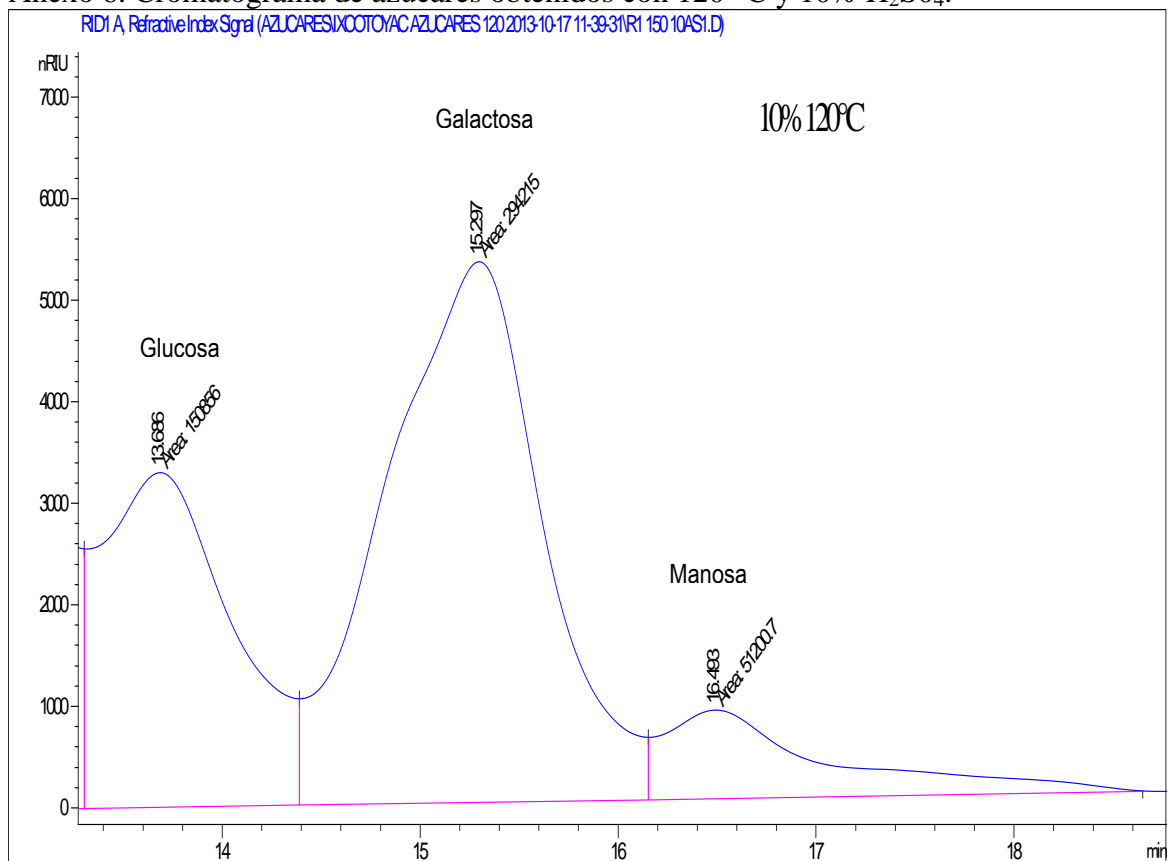
Anexo 4. Cromatograma de azúcares obtenidos con 120 °C y 5% H₂SO₄.



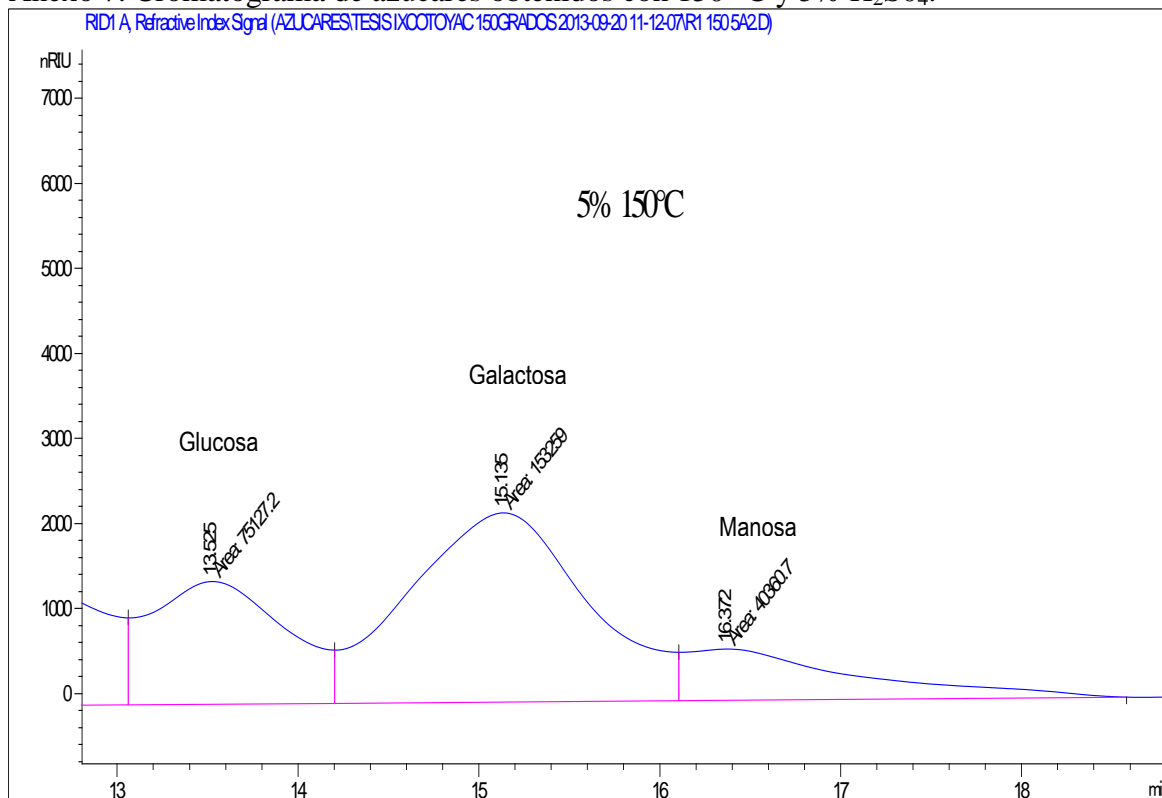
Anexo 5. Cromatograma de azúcares obtenidos con 120 °C y 7% H₂SO₄.



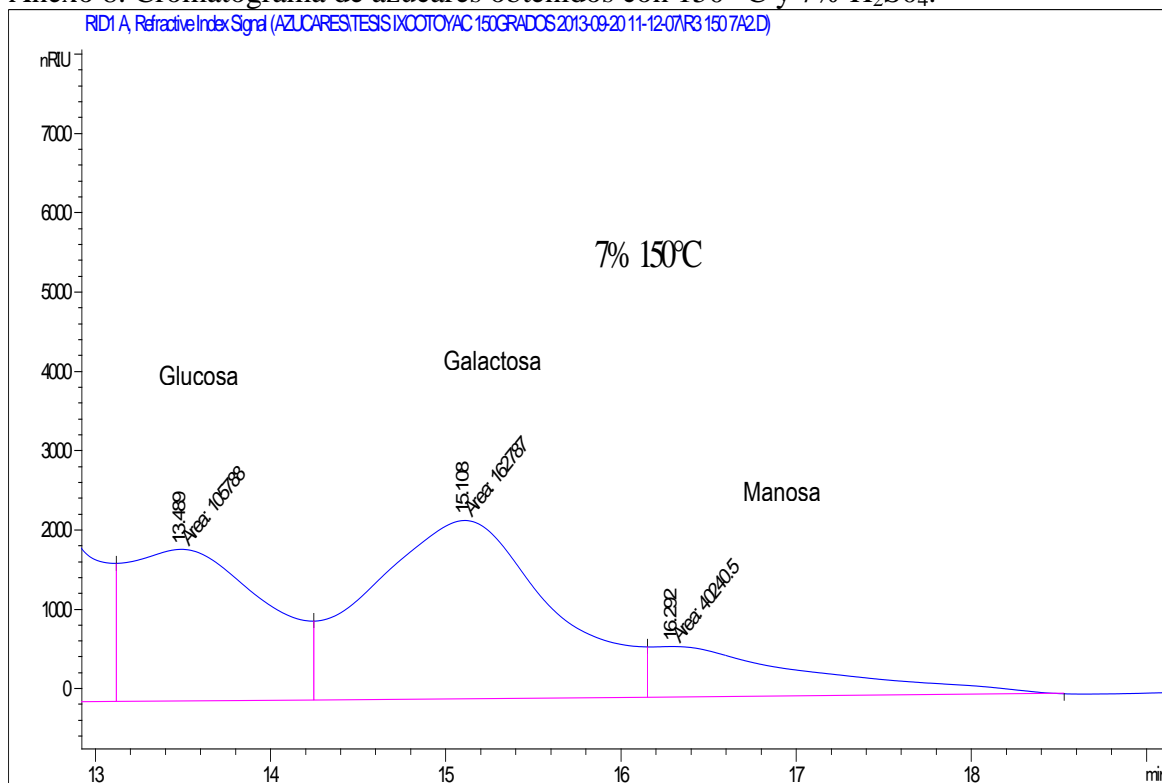
Anexo 6. Cromatograma de azúcares obtenidos con 120 °C y 10% H₂SO₄.



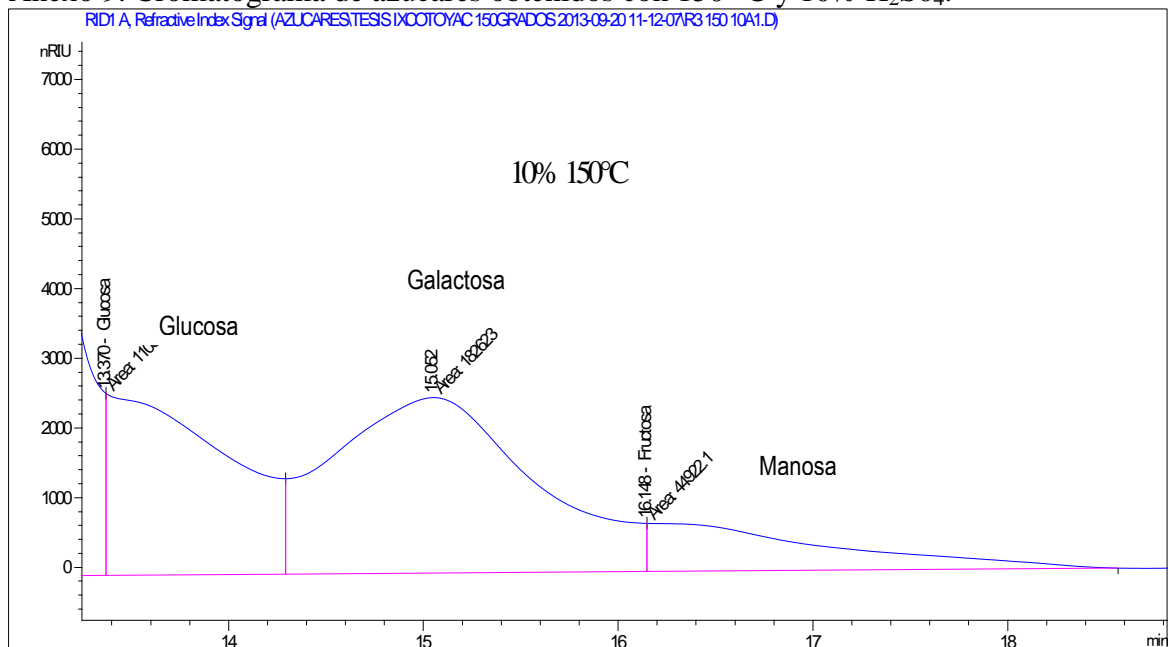
Anexo 7. Cromatograma de azúcares obtenidos con 150 °C y 5% H₂SO₄.



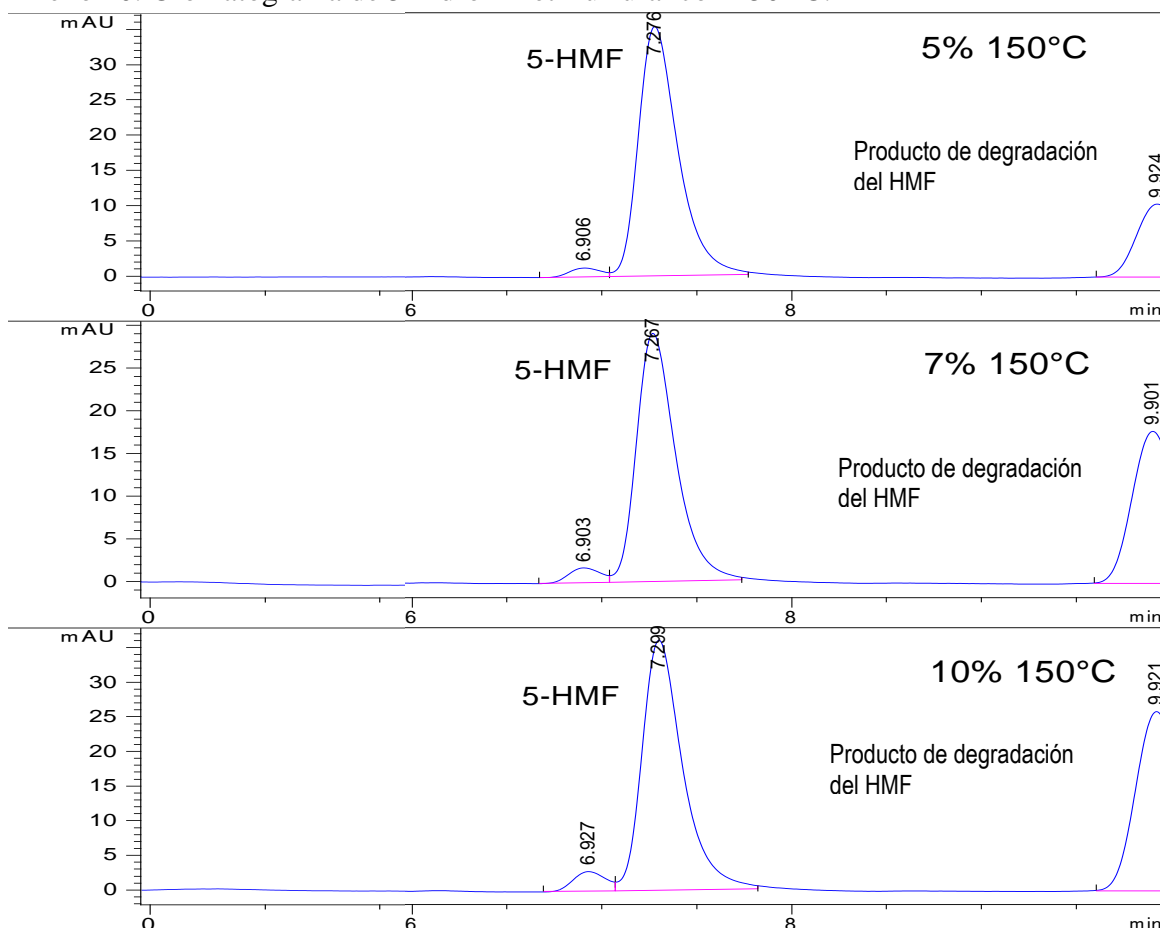
Anexo 8. Cromatograma de azúcares obtenidos con 150 °C y 7% H₂SO₄.



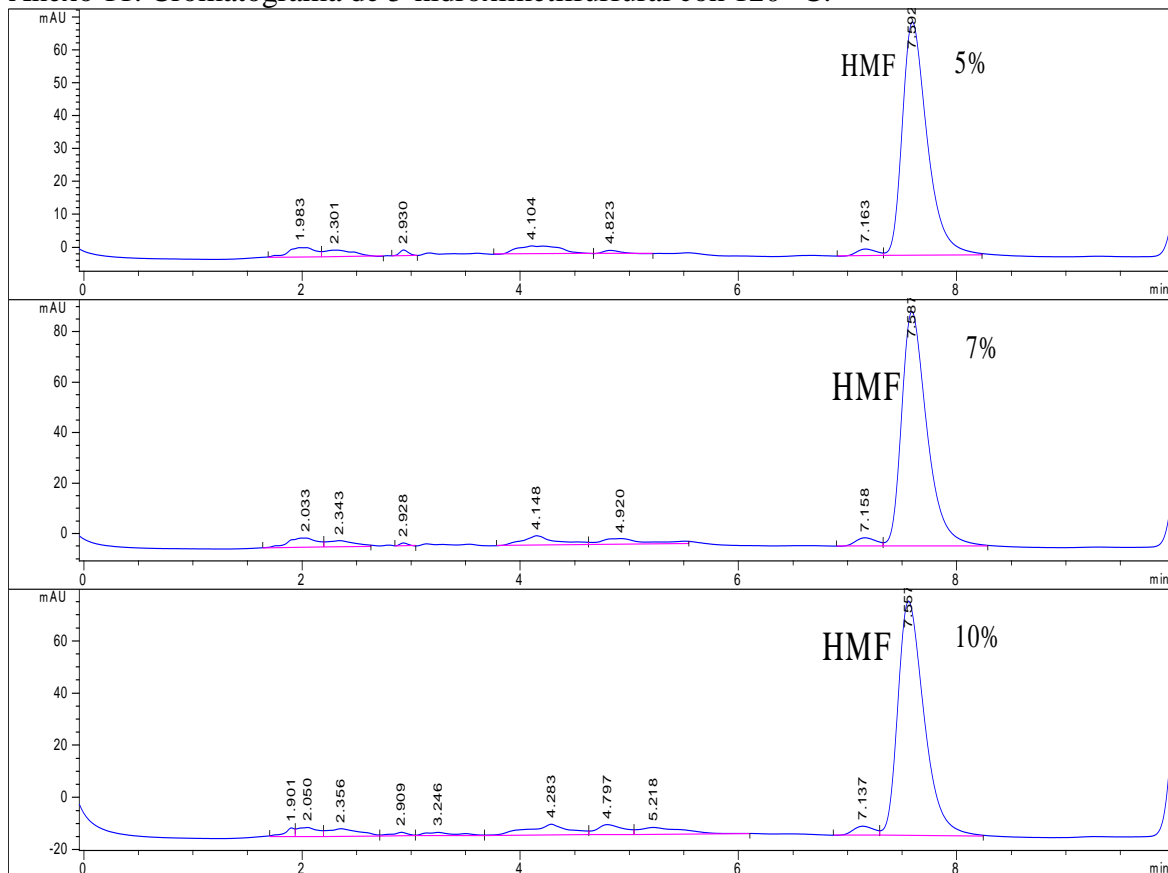
Anexo 9. Cromatograma de azúcares obtenidos con 150 °C y 10% H₂SO₄.



Anexo 10. Cromatograma de 5-hidroximetilfurfural con 150 °C.



Anexo 11. Cromatograma de 5-hidroximetilfurfural con 120 °C.



Anexo 12. Lista de materiales, equipos y reactivos utilizados durante el estudio.

Materiales

- Aserrín de pino *Pinus* spp., procedente del aserradero La Montañita, ubicado en Danlí, departamento de El Paraíso, Honduras. Se obtuvo un saco de 75 libras aproximadamente para cada repetición en tres días diferentes de aserrado.
- Crisoles de porcelana
- Pinzas para crisol.
- Desecador con llave de paso para vacío, 5.8 L.
- Bandeja de aluminio (30 × 24 × 6 cm).
- Probetas, 25, 50 y 100 mL.
- Beakers, 50, 1000 mL.
- Erlenmeyer, 1000 mL y 2000 mL.
- Kitasato, 600 mL.
- Crisoles de gooch, 60 mL.
- Picetas de plástico, 900 mL.
- Bulbo para picetas.
- Pipetas, 1 y 10 mL.

- Pipetas pasteur de vidrio, 1.5 mL.
- Matraz volumétrico, 50, 100 y 1000 mL.
- Agitadores magnéticos.
- Tubos de ensayo, 15 mL.
- Gradilla metálica para tubos de ensayo.
- Papel filtro, 125 mm.
- Papel cera.
- Filtro de jeringa Econofiltro, 0.45 μm , PTFE.
- Bolsitas filtrantes ANKON
- Jeringa, 3 mL.
- Viales, 1.5 mL.

Equipos

- Balanza analítica Adventurer AR2140, OHAUS.
- Horno Napco modelo 630.
- Mufla-Sybron, Thermolyne.
- Campana de gas 608300, Labconco.
- Bomba de vacío, HyperVac 2000.
- Digestor Kjeltex 8100, Foss.
- Calentador y agitador, Fisher Scientific
- Potenciómetro, Thermo Scientific ORION 3 Star.
- Analizador de fibra ANKOM 220, ANKOM Technology.
- Fiber filter bag F58, obtenidos de ANKOM Technology.
- Sellador por calor.
- Desionizador, Thermo Scientific Nanopure 7140 4695-6992.
- Baño maría, Precision 180 GCA Corporation.

HPLC 1100, Agilent Technologies.

- Bomba Cuaternaria G1311A .
- Automuestreador ALS G1329A
- Detector de índice de refracción, modelo G1362A 1100 Series.
- Detector DAD.
- Columna de análisis de azúcares, Hi-Plex Ca $300 \times 7.7 \text{ mm}$ $8 \mu\text{m}$, “guard cartridge column” $3 \times 0.5 \text{ mm}$, “guard column” $7.7 \times 50 \text{ mm}$, capilar Peek 0.007” id.
- Columna de análisis de HMF, LC ZORBAX Eclipse XDB-C 18, $4.6 \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$; guard cartridge column empacado con analytical guard column Eclipse XDB-C 18, $4.6 \times 12.5 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$; capilar Peek 0.007” id.

Reactivos

Solución ácido detergente:

- Ácido sulfúrico, Fisher Scientific, 97%, clase GR, No. de catálogo 320501.
- Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), Aldrich, clase A.C.S., No. de catálogo 85582-0.

Solución neutro detergente:

- Sulfato de lauril sódico, Sigma-aldrich, >59%, clase GR, No. de catálogo L-4509.
- Etilendiaminotetraacético sal disódica (EDTA), J.T. Baker, 99%, clase GR, No. de catálogo 899101.
- Hidróxido de sodio, J.T. Baker, 98.4%, clase A.C.S., No. de catálogo 3722-19.
- Borato de sodio 10-hidratado, J.T. Baker, clase A.C.S., No. de catálogo 3570-01.
- Fosfato de sodio dibásico, Sigma-aldrich, clase A.C.S., No. de catálogo S9763.
- Etilenglicol, Sigma-aldrich, 99%, clase GR, No. de catálogo 102466.
- Alfa-amilasa bacteriana estable al calor, Sigma Aldrich.

Lignina Ácido Detergente:

- Ácido sulfúrico (95-97%), Merck.

Estándares de azúcares

- Agua desionizada para cromatografía LiChrosolv® Merck.
- D-(+)-Glucosa, Sigma-aldrich, 99.5 %, clase A.C.S., No. de catálogo G5400.
- D-(-)-Fructosa, Sigma-aldrich, 99 %, clase A.C.S., No. de catálogo F-0127.
- Sacarosa, Sigma-aldrich, 99.5%, clase A.C.S., No. de catálogo S5016.
- α -D-Lactosa monohidratado, Sigma-aldrich, 99%, Clase A.C.S., No. de catálogo L254.
- D-(+)-Maltosa monohidratado, Sigma-aldrich, 98%, clase A.C.S., No. de catálogo M5885.
- D-(+)-Galactosa, Sigma-aldrich, 99%, clase A.C.S., No. de catálogo G0750.
- D-(+)-Celobiosa, Sigma-aldrich, 98%, clase A.C.S., No. de catálogo C7252.

Estándar para medir 5-Hidroximetilfurfural por HPLC

- 5-Hidroximetilfurfural, SAFC, 99%, clase GR, No. de catálogo W501808.
- Agua desionizada para cromatografía LiChrosolv® Merck.
- Ácido sulfúrico, Fisher Scientific, 97%, clase GR, No. de catálogo 320501.
- Acetona, Merck, 99.8%, clase A.C.S. No. de catálogo 1000145000.
- Alcohol etílico, Labhospy R.L., 99%, clase GR.
- Metanol, Merck, 99.9%, clase HPLC, No. de catálogo 1060351000.
- Acetonitrilo, Sigma-aldrich, 99.9%, clase HPLC, No. de catálogo 34851.