

**Efecto de la temperatura y la concentración  
de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en la producción de azúcares y 5-  
hidroximetilfurfural en el pretratamiento de  
bagazo de caña de azúcar**

**Departamento de Agroindustria Alimentaria**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**

**Honduras**

Noviembre, 2013

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

# **Efecto de la temperatura y la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en la producción de azúcares y 5-hidroximetilfurfural en el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar**

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

**Carlos Vinicio Mazariegos Tello**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 2013

# **Efecto de la temperatura y la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en la producción de azúcares y 5-hidroximetilfurfural en el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar**

Presentado por:

Carlos Vinicio Mazariegos Tello

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 la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en la producción de azúcares y 5-hidroximetilfurfural en el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar**

Carlos Vinicio Mazariegos Tello

**Resumen.** El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de dos temperaturas (120 y 150 °C) y cuatro concentraciones de ácido sulfúrico (0, 3, 6 y 12% v/v) en el pretratamiento ácido diluido para la despolimerización del bagazo de caña de azúcar en la primera etapa del proceso de producción de etanol lignocelulósico. Se empleó un diseño experimental de parcelas divididas donde la temperatura fue la parcela principal y las concentraciones de ácido fueron las subparcelas. Se determinó el contenido de hemicelulosa, celulosa y lignina en el bagazo antes después del pretratamiento, así como la cantidad de azúcares fermentables y 5-hidroximetilfurfural solubilizados en el hidrolizado del bagazo a través de HPLC. Los resultados se analizaron en el paquete estadístico SAS<sup>®</sup> 9.2 mediante un ANDEVA y separación de medias LSmeans con la opción `stderr pdiff adjust tukey` (P<0.05). La interacción de los factores fue significativa (P<0.05). Sin embargo la concentración de ácido sulfúrico determinó el nivel de hemicelulosa y celulosa solubilizada. Aunque los pretratamientos a 150 °C produjeron la mayor cantidad de hemicelulosa y celulosa solubilizada, el pretratamiento óptimo en cuanto a maximización de azúcares fermentables y minimización de 5-hidroximetilfurfural fue la combinación 6% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-120°C. Por lo tanto para investigaciones futuras se recomienda evaluar tratamientos químicos o enzimáticos y determinar la eficiencia del proceso de producción de etanol lignocelulósico.

**Palabras clave:** Celulosa, degradación de azúcares, hemicelulosa, inhibidores.

**Abstract:** The aim of the study was to evaluate the effect of two temperatures (120 and 150 °C) and four concentrations of sulfuric acid (0, 3, 6 and 12 % v/v ) in dilute acid pretreatment for the depolymerization of sugarcane bagasse in the first stage of lignocellulosic ethanol production. An experimental design of Parcel Split was used, where the temperature was the main plot and acid concentrations were the subplots. Hemicellulose, cellulose and lignin content were determined in the bagasse before and after the pretreatment, in addition to also the amount of solubilized fermentable sugars and 5hydroxymethylfurfural on bagasse hydrolyzate by HPLC. The results were analyzed in the statistical program SAS 9.2<sup>®</sup> by ANOVA and LSmeans separation with `adjust pdiff stderr tukey` (P<0.05). Factors interaction was significant (P<0.05). However, sulfuric acid concentration determined the level of solubilized hemicellulose and cellulose. Although pretreatment at 150 °C produced the largest amount of solubilized hemicellulose and cellulose, the optimal treatment in terms of maximizing the combination fermentable sugars and 5-hydroxymethylfurfural minimization was 6% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-120°C. Therefore future research is recommended to evaluate chemical or enzymatic treatments and determine the efficiency of the lignocellulosic ethanol production.

**Key words** Cellulose, hemicellulose, inhibitors, sugars degradation.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido .....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos .....	v
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>4 CONCLUSIONES.....</b>	<b>13</b>
<b>5 RECOMENDACIONES.....</b>	<b>14</b>
<b>6 LITERATURA CITADA.....</b>	<b>15</b>
<b>7 ANEXOS.....</b>	<b>19</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadro	Página
1. Efecto de los factores sobre los componentes de fibra del bagazo de caña.....	7
2. Contenido de componentes de fibra en el bagazo de caña después del pretratamiento (g/100g M.S.).....	8
3. Cuantificación de azúcares fermentables presentes en el hidrolizado (g/100g M.S.).....	10
4. Cuantificación de 5-Hidroximetilfurfural en el hidrolizado del bagazo de caña de azúcar (g/100g M.S.).....	11

Figura	Página
1. Comparación entre la suma de hemicelulosa y celulosa solubilizada y la producción de azúcares fermentables.....	9
2. Efecto de la concentración de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> en la producción de HMF y el producto de degradación a 120°C.....	11

Anexo	Página
1. Resumen de Análisis de Varianza de las variables evaluadas.....	19
2. Balance de materia de los componentes analizados (g/100 g M.S.).....	20
3. Cambios en el contenido de hemicelulosa, celulosa y lignina después del pretratamiento.....	21
4. Comportamiento a 120°C de azúcares fermentables en el hidrolizado de bagazo de caña de azúcar comparado con el comportamiento de HMF.....	22
5. Comportamiento a 150°C de azúcares fermentables en el hidrolizado de caña de azúcar comparado con el comportamiento de HMF.....	22
6. Curvas de calibración de azúcares incluidos en el método de medición de azúcares por HPLC.....	23
7. Curva de calibración de 5-hidroximetilfurfural para el método de medición de HMF por HPLC.....	23
8. Cromatograma de azúcares presentes en el hidrolizado de caña de azúcar del tratamiento 3% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -120°C.....	24

9. Cromatograma de azúcares presentes en el hidrolizado de caña de azúcar del tratamiento 3% $H_2SO_4$ -150°C. Nótese la reducción del número de azúcares fermentables.....	24
10. Cromatograma de HMF presente en el hidrolizado de bagazo de caña de azúcar de los tratamientos 0% $H_2SO_4$ -120°C y 3% $H_2SO_4$ -120°C. ....	25
11. Cromatograma de HMF presente en el hidrolizado de bagazo de caña de azúcar del tratamiento 6% $H_2SO_4$ -150°C. Nótese el incremento del pico a 9.8 min. ....	25
12. Diagrama de los productos de degradación de la biomasa lignocelulósica.....	26
13. Flujo de proceso para la determinación de los componentes de fibra, HMF y azúcares después del pretratamiento. ....	26
14. Solución obtenida del pretratamiento (hidrolizado) a 120°C de bagazo de caña de azúcar. De izquierda a derecha: 0, 3, 6 y 12% de ácido sulfúrico, respectivamente. ....	27
15. Bagazo seco de caña de azúcar después del pretratamiento ácido diluído. Arriba los tratamientos a 150°C, abajo a 120°C. De izquierda a derecha 3%, 6%, 12% y 0% de $H_2SO_4$ . ....	27
16. Lista de materiales, equipo y reactivos utilizados durante el estudio.....	28

## 1. INTRODUCCIÓN

El etanol es una de las alternativas más prometedoras de energía química que puede ser usada como combustible (Coletta *et al.* 2013). El etanol de segunda generación puede ser producido a partir de materiales lignocelulósicos, el proceso común de obtención consiste de dos etapas: convertir los polisacáridos de la biomasa en monosacáridos, utilizando hidrólisis ácida o enzimática, para luego convertir los monosacáridos en etanol por fermentación (Barroso 2010).

El bagazo de caña es uno de los materiales lignocelulósicos más abundantes en países tropicales para ser considerados en la producción de etanol, principalmente por su alto contenido de carbohidratos, bajo contenido de lignina y su bajo costo (Pandey and Soccol 2000). Se estima que 186 millones de toneladas métricas de bagazo de caña por año son generadas en Brasil, de las cuales, la mitad no tiene un uso definido (Cardona *et al.* 2010; Soccol *et al.* 2010). En México este subproducto es de 13.6 millones de toneladas por año y solo el 3% se procesa (González 2002).

El pretratamiento químico tiene como objetivo solubilizar la hemicelulosa como azúcares fermentables, remover las interacciones que hay entre los tres componentes de la fibra y mejorar la accesibilidad de la celulosa para ser hidrolizada (Turley *et al.* 2008). El principal problema del etanol de material lignocelulósico es que el producto de la hidrólisis no solo contiene azúcares fermentables, sino también una gama de compuestos que tienen efecto inhibitorio en microorganismos fermentadores (Caidian *et al.* 2001). El efecto inhibitorio es el mayor impedimento para la comercialización, porque reduce significativamente la producción de etanol, obliga a procesos de detoxificación e incrementa costos (Caidian *et al.* 2001). Los inhibidores del hidrolizado incluyen principalmente compuestos furaldehídos como 2-furaldehído (furfural) y 5-hidroximetil furfural (HMF) producidos por la degradación de pentosas y hexosas respectivamente; también ácidos alifáticos como ácido fórmico, acético y levulínico (Larsson *et al.* 1999). Varios autores han reportado el grado de inhibición de los principales compuestos. Banergee *et al.* (2001), reportó que el furfural y el HMF afectan la producción de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de 0.5 g L<sup>-1</sup> y la inhibición completa ocurre a 4 g L<sup>-1</sup>; Palmqvist *et al.* (1999 a, b), reportaron que HMF a 4 g L<sup>-1</sup> causó un decrecimiento de 32% en la tasa de producción de CO<sub>2</sub> de *S. cerevisiae*. Oliva Domínguez (2003), reportó para *S. cerevisiae* que una concentración de HMF de 3 g L<sup>-1</sup> produce una inhibición de 83 % de producción de etanol; para *E. coli* la concentración de 8 g L<sup>-1</sup> de HMF produce 30 % de inhibición; para el caso de furfural entre 3 -4 % reducen a 79 % la producción de etanol de *S. cerevisiae*.

En Zamorano se han realizado investigaciones con el fin de mejorar el pretratamiento de materiales lignocelulósicos pero ninguno en bagazo de caña de azúcar y la mayoría no contemplan la dinámica de HMF. Nuñez (2011), determinó que el mayor rendimiento de azúcares reductores en aserrín de *Pinus oocarpa* se obtuvo de la combinación de 130°C, 6% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 2 horas. Rosero (2008) concluyó que el mejor pretratamiento para la fibra de palmito fue 0.5% de ácido sulfúrico a 145°C por 1 hora. Gámez (2008) determinó que el mayor rendimiento de etanol de estiércol de ganado lechero se obtuvo con las combinaciones de 121° C y 2% de ácido sulfúrico y 110°C con 2.5% de ácido sulfúrico.

Existe poca información científica acerca de la producción de HMF en el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar en América Central. Por lo tanto los objetivos de este estudio fueron los siguientes:

- Evaluar el efecto de dos temperaturas (120 y 150°C) y cuatro concentraciones de ácido sulfúrico (0, 3, 6 y 12% v/v) sobre la producción de azúcares fermentables y la producción de HMF.
- Determinar el pretratamiento óptimo para la producción de etanol a partir de bagazo de caña de azúcar
- Determinar el factor de mayor influencia en la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

**Ubicación.** El bagazo de caña de azúcar se obtuvo del Ingenio Azucarero “Tres Valles”, localizado en Cantarranas, departamento Francisco Morazán. Los análisis de fibra, digestión y cromatografía se realizaron en el laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ), localizado en el Valle del Yeguaré, departamento Francisco Morazán, 32 km al este de Tegucigalpa, Honduras.

**Diseño experimental.** Se usó el diseño de parcelas divididas, en el cual la parcela principal fue la temperatura (120 y 150°C) y las subparcelas fueron los niveles de ácido sulfúrico (0, 3, 6 y 12%). Se realizaron 3 repeticiones, para un total de 24 unidades experimentales.

**Caracterización del bagazo de caña.** Se obtuvieron dos sacos diarios por tres días de bagazo de caña de azúcar del Ingenio Tres Valles, con 47.5% de humedad saliente del proceso de extracción de jugo, se distribuyó en bandejas de aluminio y se secó en un horno de convección por 72 horas a 60°C, luego pasó por un proceso de reducción de partícula de 2 a 5 mm. Se obtuvieron 3 muestras representativas (una para cada repetición, 5 kg/muestra), a cada muestra se le determinó contenido de humedad, hemicelulosa, celulosa y lignina.

**Determinación de humedad.** El análisis se realizó por duplicado según el método AOAC 926.08, los resultados se reportaron en g/100g M.S., se usó la ecuación 1:

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

**Análisis de fibra neutro detergente (FND) (AOAC 2002.04 modificado por ANKOM).** Se pesó la bolsa filtro por duplicado (específica para el método ANKOM), se taró, se depositó dentro de la bolsa 0.5 g de materia seca de bagazo y se selló. Las bolsas selladas se colocaron en el interior del analizador de fibra ANKOM A200, se preparó 1.5 L de solución neutro detergente y se vertió sobre las bolsas filtro, luego se agregaron 4 mL de la enzima alfa amilasa termoresistente. El proceso de extracción consistió en exponer las muestras a la solución neutro detergente y alfa amilasa a 100±0.5°C y 10-25 psi, agitándose por 75 minutos dentro del ANKOM A200.

Después del proceso de extracción se retiró la solución caliente y se realizaron 3 lavados con 1900 mL de agua destilada a 70°C y 4 mL de alfa-amilasa por 5 minutos. Se retiraron las muestras del interior del ANKOM y suavemente se retiró el exceso de agua en las muestras. Las muestras se colocaron dentro de un beaker de 250 mL, se agregó suficiente acetona para cubrir todas las muestras y se remojaron por 4 minutos. Se removió el exceso de acetona en las muestras y luego se secaron en horno de convección a 105°C por 4 horas.

Después del proceso de secado, las muestras se colocaron en desecadores convencionales. Se tomó el peso seco de cada muestra a temperatura ambiente (21°C), los resultados se obtuvieron en g/100g M.S., mediante la ecuación 2:

$$\%FND = \frac{(W3 - (W1 \times C1))}{W2} \times 100 \quad [2]$$

Dónde: W3 es peso seco de la muestra después del proceso de extracción, W1 es peso de la bolsa, C1 es la corrección de la bolsa blanco (peso seco final de la bolsa blanco dividido por el peso original de la bolsa blanco), W2 es el peso del bagazo.

#### **Análisis de fibra ácido detergente (FAD) (AOAC 973.18 modificado por ANKOM).**

Se pesó la bolsa filtro por duplicado (específica para el método ANKOM), se taró y se depositó dentro de la bolsa 0.5 g de materia seca de bagazo y se selló. Las bolsas selladas se colocaron en el interior del analizador de fibra ANKOM A200, se preparó 1.5 L de solución ácido detergente y se vertió sobre las bolsas filtro. El proceso de extracción consistió en exponer las bolsas filtro a la solución ácido detergente a 100±0.5°C y 10-25 psi, agitándose por 60 minutos dentro del ANKOM A200.

Después del proceso de extracción se retiró la solución caliente y se realizaron 3 lavados con 1900 mL de agua destilada a 70°C por 5 minutos. Se retiraron las muestras del interior del ANKOM y suavemente se retiró el exceso de agua. Luego se colocaron dentro de un beaker de 250 mL y se agregó suficiente acetona para cubrir todas las muestras, se remojaron por 4 minutos. Se removió el exceso de acetona en las muestras y luego se secaron en horno de convección a 105°C por 4 horas.

Después del proceso de secado, las muestras se colocaron en desecadores convencionales. Se tomó el peso seco de cada muestra a temperatura ambiente (21°C), los resultados se obtuvieron en g/100g M.S. mediante la ecuación 3:

$$\%FAD = \frac{(W3 - (W1 \times C1))}{W2} \times 100 \quad [3]$$

Dónde: W3 es peso seco de la muestra después del proceso de extracción, W1 es peso de la bolsa, C1 es la corrección de la bolsa blanco (peso seco final de la bolsa blanco dividido por el peso original de la bolsa blanco), W2 es el peso del bagazo.

**Determinación de lignina (AOAC 973.18).** Se utilizaron las bolsas selladas provenientes del proceso de cuantificación de FAD. En un beaker berzelius de 500 mL se prepararon 300 mL de solución de ácido sulfúrico 72% p/p, se sumergieron las muestras secas y sobre ellas se colocó un beaker de 250 mL que se utilizó para mantenerlas sumergidas y agitarlas 30 veces, cada 30 minutos, por 3 horas.

Después del proceso de extracción, las muestras se retiraron del beaker y se realizaron 4 lavados con agua destilada a punto de ebullición, se retiró el exceso de agua de las muestras y se colocaron dentro de un beaker de 1 L, se agregó suficiente acetona para cubrir todas las muestras y se remojaron por 4 minutos. Se removió el exceso de acetona en las muestras y luego se secaron en horno de convección a 105°C por 4 horas.

Después del proceso de secado, las muestras se colocaron en desecadores convencionales. Se tomó el peso seco de cada muestra a temperatura ambiente (21°C) y luego se colocaron en la mufla para determinar el contenido de cenizas. Se utilizó la ecuación 4 para determinar el contenido de lignina en porcentaje:

$$\text{Lignina\%} = \frac{(W3 - (W1 * C1))}{W2} * 100 \quad [4]$$

Dónde: W3 es el peso seco después de la extracción de lignina, W1 es el peso original en el proceso de FAD, C1 es la corrección de la bolsa blanco del proceso de FAD, W2 es el peso del bagazo en el proceso de FAD.

Los resultados de hemicelulosa y lignina se reportaron en g/100g M.S., y se usaron las ecuaciones 5 y 6:

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

$$\text{Celulosa\%} = \text{FAD\%} - \text{lignina\%} \quad [6]$$

**Pretratamiento ácido-diluido.** Se pesó por triplicado una muestra de 5.55 g de materia seca de bagazo de caña y se colocó dentro de los tubos del digestor Kjeltec 8100 Foss rotulados con la concentración de ácido sulfúrico a evaluar (0, 3, 6 y 12%). Posteriormente se agregó la solución v/v de ácido sulfúrico en relación 1:20 (materia seca: solución de ácido sulfúrico).

Los tubos se colocaron en el digestor Kjeltec 8100 Foss donde se sometieron 2 horas al proceso de digestión térmica a 120 °C para los primeros 9 tratamientos y 150°C para los tratamientos restantes. Después del pretratamiento, se filtró el contenido de cada tubo utilizando un embudo, papel filtro, kitasato y bomba de vacío, se registró el volumen de hidrolizado y el peso del bagazo. Luego se tomaron 2.5 mL de hidrolizado, se neutralizó a pH 7 con solución de hidróxido de sodio 1N, y se aforó en matraces volumétricos de 50 ml y se congeló. El bagazo pretratado se lavó dos veces con agua destilada a 70°C para

eliminar el remanente de ácido y se colocó en el horno Napco 630 durante 24 horas a 70°C y -23 mm Hg de presión.

**Determinación de azúcares fermentables.** El hidrolizado de bagazo de caña se descongeló a temperatura ambiente y se verificó el pH, se filtró con filtros para jeringa de 0.45 µm PTF, se depositó por duplicado 1.5 cc de hidrolizado en viales para HPLC y se realizaron las inyecciones con el muestreador automático. Las condiciones de cromatografía fueron las descritas en el plan de calibración y validación interna del método para perfil de azúcares por HPLC AOAC 982.14 usando la columna Hi-plex Ca 300 x 7.7 mm (Contreras, 2011).

**Determinación de HMF.** Se prepararon los viales de igual forma que para análisis de azúcares fermentables y se usaron las condiciones de cromatografía descritas en el plan de calibración y validación interna para la determinación de 5-Hidroximetilfurfural por HPLC según el método empleado por Windsor *et al.* (2012), Xu Qing *et al.* (2007), Li Ying-hua *et al.* (2005) y Rufian *et al.* (2001), usando la columna LC ZORBAX Eclipse XDB-C 18, 4.6 X 150 mm, 5 µm, *guard cartridge column* empacado con *analytical guard column* Eclipse XDB-C 18, 4.6 x 12.5 mm, 5 µm; *capilar Peek* 0.007'' id (Ixcotoyac y Tuyuc 2013).

**Análisis estadístico.** Se usó el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.2®), se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para un diseño completo al azar con arreglo factorial en parcelas divididas y con una prueba de separación de medias LSmean con la opción *adjust=Tukey* y un nivel de significancia  $P < 0.05$ . Se categorizaron los resultados de celulosa, hemicelulosa, lignina, concentración de HMF y azúcares fermentables totales e individuales.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Caracterización del bagazo de caña de azúcar.** Los análisis de humedad, FND, FAD y lignina determinaron que el bagazo utilizado contenía 10% de humedad, 28.2% de hemicelulosa, 47.6% de celulosa y 13.3% de lignina; estos resultados coincidieron a los reportados en otros estudios para este material lignocelulósico (Aguilar 2011, Domínguez-Domínguez *et al.* 2012, Luz *et al.* 2007, Ravelo *et al.* 2002).

**Digestión del bagazo de caña.** El análisis de varianza determinó que la concentración de  $H_2SO_4$  y la temperatura afectaron significativamente ( $P < 0.05$ ) la composición lignocelulósica del bagazo de caña después del pretratamiento. La interacción de los factores fue significativa ( $P < 0.05$ ) en los 3 componentes de la fibra. Sin embargo, para la hemicelulosa la concentración de  $H_2SO_4$  ejerció un efecto superior a la temperatura y a la interacción de ambos. En celulosa y lignina el valor F fue similar (Cuadro 1). Estudios similares utilizando como sustrato estiércol de ganado vacuno, diferentes pastos y forraje ensilado concuerdan en que el ácido es el factor que más influye en la descristalinización de los componentes de fibra (Liao *et al.* 2010, Neureiter *et al.* 2002).

Cuadro 1. Efecto de los factores sobre los componentes de fibra del bagazo de caña.

Fuente de variación	Hemicelulosa		Celulosa		Lignina	
	F	P	F	P	F	P
Temperatura	83.31	<0.01	769.31	<0.01	31.55	<0.01
$H_2SO_4$	6604.65	<0.01	385.81	<0.01	17.42	<0.01
Temperatura x $H_2SO_4$	5.87	<0.01	30.36	<0.01	4.71	<0.01

**Componentes de la fibra digeridos durante el pretratamiento.** Todos los tratamientos mostraron una reducción significativa de hemicelulosa contenida en el bagazo de caña de azúcar. Se determinó que el tratamiento 3%  $H_2SO_4$ -120°C redujo la hemicelulosa a 2.32 g/100 g M.S., mientras que los demás tratamientos solubilizaron el total de hemicelulosa y estos fueron considerados iguales según la prueba de medias ( $P < 0.05$ ). Los tratamientos 6%  $H_2SO_4$ -150°C y 12%  $H_2SO_4$ -150°C hidrolizaron la mayor cantidad de celulosa, coincidiendo con la mayor cantidad de lignina solubilizada (Cuadro 2). La solubilización total de la hemicelulosa se puede atribuir a que este componente es la capa superficial de la compleja red de polímeros de celulosa y lignina (Turley *et al.* 2008). El incremento en la concentración del ácido y la temperatura generó más hidrólisis en los componentes de la fibra. Al solubilizar la totalidad de hemicelulosa, el pretratamiento más severo únicamente

solubilizó 2.07 g/100g M.S. de lignina, mientras que la máxima solubilización de celulosa fue de 29.01 g/100g M.S. Estos resultados coinciden con Yang y Wyman (2004) y Turley *et al.* (2008), respecto a que una pequeña solubilización de lignina incrementa significativamente la susceptibilidad de la celulosa a la hidrólisis (Cuadro 2).

Cuadro 2. Contenido de componentes de fibra en el bagazo de caña después del pretratamiento (g/100g M.S.).

<b>Tratamiento</b>	<b>Hemicelulosa Media ± DE<sup>‡</sup></b>	<b>Celulosa Media ± DE<sup>‡</sup></b>	<b>Lignina Media ± DE<sup>‡</sup></b>
0% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -120°C	27.80±0.71 <sup>a</sup>	47.11±1.17 <sup>a</sup>	13.40±0.01 <sup>a</sup>
3% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -120°C	2.32±0.05 <sup>c</sup>	36.96±0.67 <sup>c</sup>	13.30±0.09 <sup>a</sup>
6% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -120°C	0.89±0.07 <sup>d</sup>	35.01±0.51 <sup>cd</sup>	12.90±0.13 <sup>ab</sup>
12% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -120°C	0.69±0.05 <sup>d</sup>	32.73±0.17 <sup>d</sup>	12.81±0.14 <sup>ab</sup>
0% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150°C	25.85±0.85 <sup>b</sup>	42.13±0.74 <sup>b</sup>	13.23±0.27 <sup>ab</sup>
3% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150°C	0.00±0.01 <sup>d</sup>	22.34±0.75 <sup>e</sup>	12.64±0.29 <sup>ab</sup>
6% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150°C	0.00±0.02 <sup>d</sup>	19.99±1.14 <sup>ef</sup>	12.35±0.36 <sup>b</sup>
12% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150°C	0.03±0.02 <sup>d</sup>	18.10±2.22 <sup>f</sup>	11.33±0.67 <sup>c</sup>
<b>Coeficiente de variación (%)</b>	<b>5.49</b>	<b>3.42</b>	<b>2.45</b>

<sup>a-c</sup> Tratamientos seguidos de diferente letra en la misma columna son diferentes (P<0.05).

<sup>‡</sup>DE Desviación Estándar.

**Azúcares fermentables solubilizados durante el pretratamiento.** El análisis de varianza determinó que la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y la temperatura afectaron significativamente (P<0.05) la cantidad de azúcares fermentables obtenidos por el pretratamiento. Aunque la interacción de los factores fue significativa (F=88.09, P<0.05), la concentración de ácido ejerció un efecto superior (F=1744.93, P<0.05).

Los pretratamientos que solubilizaron la mayor cantidad de azúcares fermentables fueron 6% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-120°C y 12% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (iguales según prueba LSmean, P<0.05) con 38.99 y 41.05 g/100g M.S., respectivamente. Los tratamientos testigos (0% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-120°C y 0% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-150°C), generaron la menor cantidad de azúcares fermentables (5.11 y 5.68 g/100g M.S.) (Cuadro 3). Aunque los tratamientos a 150°C solubilizaron mayor cantidad de hemicelulosa y celulosa, los tratamientos a 120°C produjeron mayor cantidad de azúcares fermentables (Figura 1). Esto se puede atribuir a que, aunque la concentración de ácido es el parámetro más importante para la solubilización de azúcares, este factor aumenta la degradación de los monosacáridos a furfurales (Katzen R. 2006). Sin embargo, la temperatura produce el impacto más grande en la formación de HMF y otros inhibidores por degradación de azúcares (Neureiter *et al.* 2002).

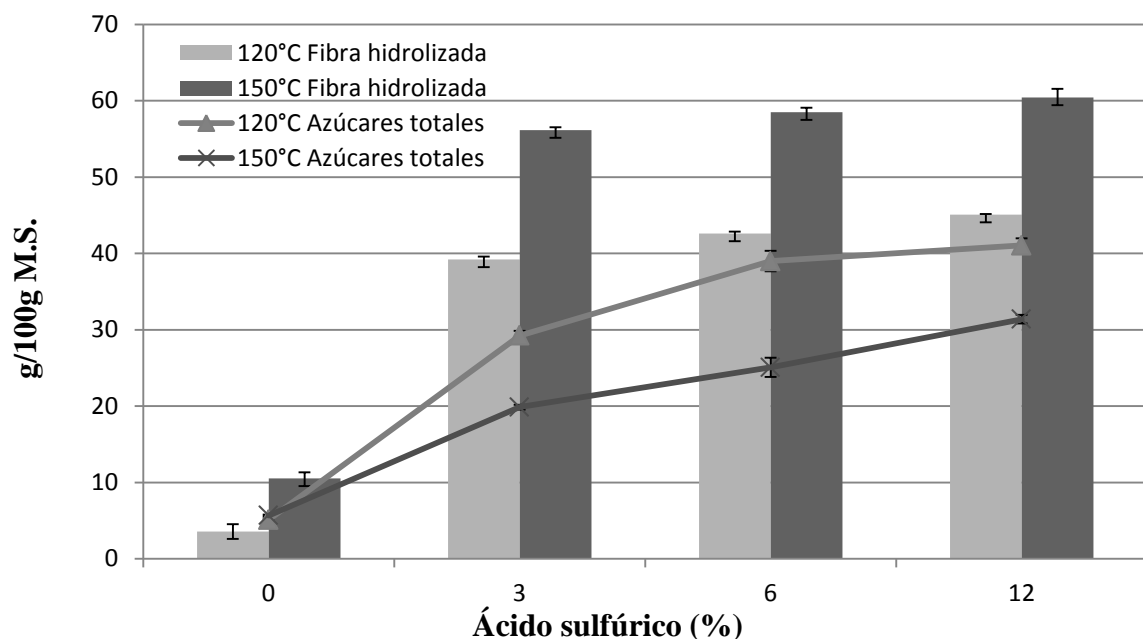


Figura 1. Comparación entre la suma de hemicelulosa y celulosa solubilizada y la producción de azúcares fermentables.

#### **Efecto de los tratamientos en el contenido de azúcares del bagazo de caña de azúcar.**

Mediante cromatografía líquida se identificaron en los hidrolizados del bagazo los monosacáridos D-Glucosa, D-Xilosa, D-Galactosa y L-Arabinosa (Cuadro 3). Consistentemente autores afirman que los hidrolizados de materiales lignocelulósicos principalmente contienen glucosa y xilosa y menor cantidad de arabinosa, galactosa y manosa (Coletta *et al.* 2013).

Cada monómero tuvo un comportamiento diferente, debido a que cada monosacárido presentó condiciones específicas para su degradación (Nolasco y De Massaguer 2006). La glucosa aumentó a medida que incrementó la concentración de ácido sulfúrico, sin embargo, los rendimientos a temperaturas de 150°C fueron menores a los tratamientos de 120°C (Cuadro 3). Sasaki *et al.* (2011) concluyeron que existe una degradación total de este monosacárido a la temperatura de 230°C, por ende, este comportamiento se puede atribuir al efecto de degradación que generó el incremento en temperatura. Por lo tanto, existe una alta probabilidad de que los monómeros de glucosa se degradaran a 5-hidroximetilfurfural y ácido glucónico (Sasaki *et al.* 2011, Katzen 2006).

Para xilosa, aunque la solubilización de azúcares fermentables fue superior en los tratamientos a 120°C, este monosacárido aumentó a medida que se incrementó la concentración de ácido y temperatura. El mayor contenido de xilosa se dio en 12% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-150°C, mientras que en los tratamientos sin ácido no hubo presencia de este azúcar (Cuadro 3). Respecto a esto, Kumar y Wyman (2008) concluyeron que la degradación de xilosa es inversa a su concentración y la concentración de xilosa depende principalmente de la concentración de ácido, es decir, la degradación directa de los oligómeros se reduce o elimina mediante la adición de ácido. Aunque la xilosa fue la menos sensible a la

degradación, existe una alta probabilidad de que una fracción de este monosacárido se degradara a furfural (Saska y Martín 2011, Katzen R. 2006). Para el caso de galactosa y arabinosa existe poca información sobre su comportamiento. Se presentaron en menor concentración y fueron más sensibles a las condiciones del pretratamiento (Cuadro 3).

Cuadro 3. Cuantificación de azúcares fermentables presentes en el hidrolizado (g/100g M.S.)

Tratamiento	Azúcares totales Media±DE <sup>‡</sup>	Glucosa Media±DE <sup>‡</sup>	Xilosa Media±DE <sup>‡</sup>	Galactosa Media±DE <sup>‡</sup>	Arabinosa Media±DE <sup>‡</sup>
12% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -120°C	41.1±0.9 <sup>a</sup>	20.4±1.0 <sup>a</sup>	13.1±1.6 <sup>bc</sup>	4.9±0.4 <sup>b</sup>	2.7±0.0 <sup>c</sup>
6% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -120°C	38.9±1.3 <sup>a</sup>	10.1±0.2 <sup>b</sup>	12.3±1.4 <sup>bc</sup>	10.0±0.3 <sup>a</sup>	6.6±0.1 <sup>a</sup>
12% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150°C	31.4±0.6 <sup>b</sup>	9.9±0.4 <sup>b</sup>	17.9±0.5 <sup>a</sup>	3.4±0.2 <sup>bcd</sup>	0.0±0.0 <sup>d</sup>
3% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -120°C	29.2±0.6 <sup>b</sup>	6.6±0.9 <sup>c</sup>	6.8±0.8 <sup>d</sup>	10.4±1.0 <sup>a</sup>	5.4±0.6 <sup>b</sup>
6% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150°C	25.1±1.3 <sup>c</sup>	7.9±1.1 <sup>c</sup>	14.2±1.2 <sup>b</sup>	3.0±0.4 <sup>bcd</sup>	0.0±0.0 <sup>d</sup>
3% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150°C	19.9±0.3 <sup>d</sup>	4.6±0.5 <sup>d</sup>	11.1±0.9 <sup>c</sup>	4.2±0.4 <sup>bc</sup>	0.0±0.0 <sup>d</sup>
0% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150°C	5.7±0.1 <sup>e</sup>	2.9±0.1 <sup>de</sup>	0.0±0.0 <sup>e</sup>	2.8±0.0 <sup>d</sup>	0.0±0.0 <sup>d</sup>
0% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -120°C	5.1±0.2 <sup>e</sup>	2.7±0.2 <sup>e</sup>	0.0±0.0 <sup>e</sup>	2.4±0.1 <sup>d</sup>	0.0±0.0 <sup>d</sup>
Coefficiente de variación (%)	3.26	7.98	10.51	8.51	11.43

<sup>a-e</sup> Tratamientos seguidos de diferente letra en la misma columna son diferentes (P<0.05)

<sup>‡</sup> Desviación Estándar.

**Efecto de los tratamientos en la formación del inhibidor 5-hidroximetilfurfural (HMF).** El análisis de varianza determinó un comportamiento similar a las otras variables, aunque existió interacción entre los factores (F=144.02), la concentración de ácido sulfúrico ejerció un efecto superior (F=2582.68).

La reducción de la glucosa y galactosa en el hidrolizado al incrementar la temperatura, como se expuso anteriormente, podría explicarse por la formación de productos de degradación, principalmente HMF y ácido glucónico. Como lo indican varios autores, la degradación de los azúcares a furfural (pentosas) y HMF (hexosas) es potenciada por el incremento en temperatura y concentración de ácido (Katzen R. 2006, Barroso 2010, Mateus *et al.* 2012). Sin embargo, al analizar la cuantificación de HMF, el incremento en la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hasta 6% aumentó la formación de HMF, mientras que la concentración de 12% redujo significativamente la cantidad de este furaldehído. En los tratamientos a 150 °C se obtuvo el mismo comportamiento, pero la cuantificación de HMF fue menor (Cuadro 4).

Cuadro 4. Cuantificación de 5-hidroximetilfurfural en el hidrolizado del bagazo de caña de azúcar (g/100g M.S.).

Tratamiento	5-hidroximetilfurfural Media±DE <sup>‡</sup>
0% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -120°C	0.02+0.00 <sup>c</sup>
3% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -120°C	0.43+0.00 <sup>b</sup>
6% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -120°C	0.47+0.00 <sup>a</sup>
12% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -120°C	0.08+0.00 <sup>d</sup>
0% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150°C	0.02+0.00 <sup>e</sup>
3% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150°C	0.29+0.02 <sup>c</sup>
6% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150°C	0.28+0.01 <sup>c</sup>
12% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150°C	0.04+0.00 <sup>e</sup>
Coefficiente de variación (%)	4.45

a-e Tratamientos seguidos de diferente letra en la misma columna son diferentes (P<0.05)

‡ Desviación estándar.

Al analizar los cromatogramas se observó que al disminuir el pico correspondiente a HMF, el pico siguiente (a 9.8 minutos) aumentó su tamaño (Figura 2). Este comportamiento se puede atribuir a las condiciones de temperatura y acidez que generarían inestabilidad en la molécula de este furaldehído y promovieron la degradación de HMF a ácido fórmico o levulínico (Barroso 2010, Palmqvist y Hagerdal 2000, Domínguez 2003, Ulbricht *et al.* 1984).

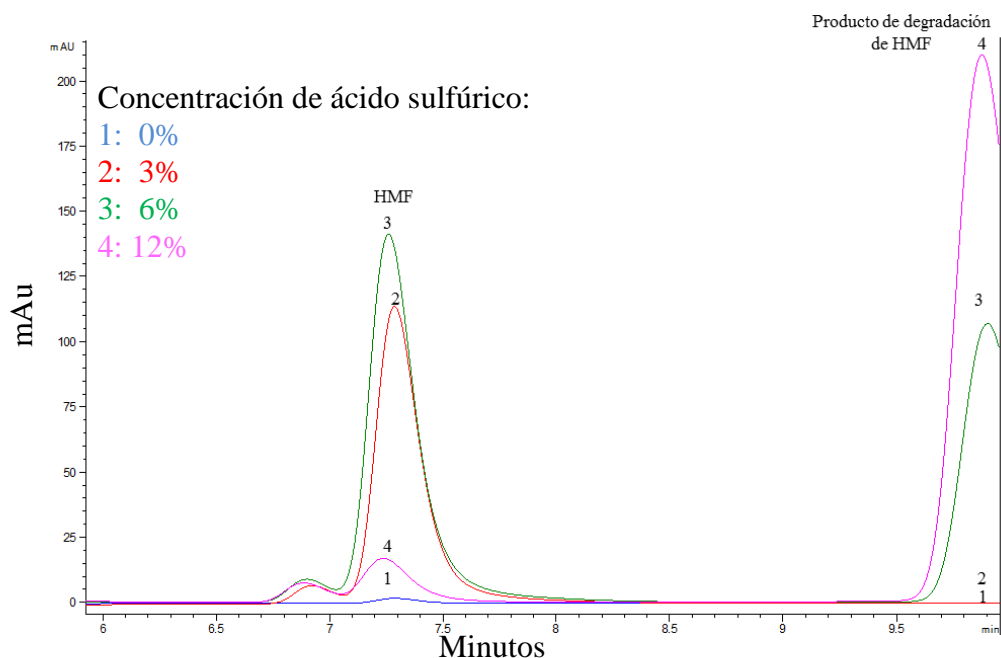


Figura 2. Efecto de la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en la producción de HMF y el producto de degradación a 120°C.

Uno de los objetivos de este estudio fue encontrar el pretratamiento óptimo entre los evaluados, basándose en las premisas de que un pretratamiento debe mejorar la solubilización de azúcares, evitar la pérdida o degradación de los azúcares producidos, evitar la formación de productos inhibidores para la fermentación y ser económicamente rentable (Turkey *et al.* 2008). El primer objetivo del pretratamiento se cumple al solubilizar el total de hemicelulosa y esto se dio en los tratamientos 6% $H_2SO_4$ -120°C, 12% $H_2SO_4$ -120°C, 3% $H_2SO_4$ -150°C, 6% $H_2SO_4$ -150°C y 12% $H_2SO_4$ -120°C. Sin embargo, los tratamientos que maximizaron la producción de azúcares fermentables fueron 6% $H_2SO_4$ -120°C y 12% $H_2SO_4$ -120°C (38.9+1.3 y 41.1+0.9, iguales según LSmean (P<0.05)).

La máxima cuantificación de HMF se dio en el tratamiento 6% $H_2SO_4$ -120°C (0.43 g/100g M.S.), seguido del 3% $H_2SO_4$ -120°C (0.43 g/100g M.S.). Sin embargo, ningún tratamiento sobrepasó la concentración de HMF que inicia con el efecto inhibitorio en el proceso de fermentación de *S. cerevisiae*, el cual según Banergee *et al.* (2001) es de 0.5g $L^{-1}$  de HMF. Por lo tanto, el tratamiento que reunió las mejores características para la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar debido a que solubilizó el total de hemicelulosa, produjo la mayor cantidad de azúcares fermentables y no sobrepasó el nivel de influencia de HMF en el proceso de fermentación fue el 6% $H_2SO_4$ -120°C.

#### 4. CONCLUSIONES

- El pretratamiento 12% $H_2SO_4$ -150°C produjo la mayor degradación de azúcares y de HMF.
- La solubilización total de hemicelulosa y mayor rendimiento de azúcares fermentables sin sobrepasar el límite de HMF se obtuvo con el pretratamiento de 6% $H_2SO_4$ -120°C.
- La concentración de  $H_2SO_4$  determinó el nivel de hidrólisis de la hemicelulosa y la temperatura incrementó la degradación de los monómeros glucosa y galactosa a HMF.

## 5. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio sobre el tratamiento del bagazo de caña de azúcar para la hidrólisis total de la fibra y el rendimiento de etanol en la fermentación.
- Evaluar el efecto del tiempo de digestión en la solubilización de los componentes de la fibra, azúcares fermentables y HMF durante el pretratamiento del bagazo de caña de azúcar.
- Determinar las condiciones para la degradación de HMF en el pretratamiento del bagazo de caña de azúcar
- Evaluar el efecto del tratamiento en el bagazo de caña de azúcar pretratado con 6% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-120°C.

## 6. LITERATURA CITADA

Aguilar, D. 2011. Producción de etanol a partir de bagazo de caña panelera mediante un sistema híbrido de fermentación y pervaporación. Tesis Ing. Química, Manizales, Colombia, Universidad Nacional de Colombia. 90 p.

A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). 2005. AOAC Official Method 2002.04 Amylase-Treated Neutral Detergent Fiber in Feed. USDA Agricultural Research Service, Hand book 379, Washington, DC, USA.

A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). 2006. Glucose, Fructose, Sucrose, and Maltose in Presweetened Cereals Liquid by Chromatographic Method, AOAC 982.14. EUA. 1 p.

Banergee, N., R Bhatnagar y L. Vismanathan. 2001. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. European Journal of Applied Microbiology Biotechnology 1981 (11):226–8.

Barroso, M. 2010. Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorefinería. Tesis Ing. Forestal, Madrid, España, Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal. 151 p.

Caidian, L., D. Brink y H. Blanch. 2001. Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol. Biomass and Bioenergy 22 (2002):125-138

Cardona, C.A., J.A. Quintero y I.C. Paz. 2010. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. Bioresour. Technology 101 (13):4754–4766.

Coletta V., C. Alves, F. Rodrigues da Conceicao, I. Polikarpov y F. Gondijo. 2013. Mapping the lignin distribution in pretreated sugarcane bagasse by confocal and fluorescence lifetime imaging microscopy. Biotechnology for Biofuels 6:43-54.

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. en Agroindustria Alimentaria, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 28 p.

Domínguez-Domínguez, M., A. Álvarez-Castillo, M. Granados-Baeza y F. Hernández-Campos, F. 2012. Estudio de la cinética del pretratamiento e hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar. Revista Iberoamericana de Polímeros 13(4): 200-211

Domínguez, J.M. 2003. Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Tesis doctoral, Madrid, España, Universidad Complutense de Madrid. 65 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. Tesis Ing. en Agroindustria Alimentaria, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 30 p.

González, R. 2002. Sustentabilidad de la producción e introducción de alcohol como carburante para uso en automotores en la Ciudad de México. Tesis de maestría, Puebla, México, Universidad Benemérita Autónoma. 50 p.

Ixcotoyac, E. y L. Tuyuc. 2013. Plan de calibración y validación para la determinación de 5-Hidroximetilfurfural por HPLC (LAA-PY-004-B02). Laboratorio de Análisis de Alimentos, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 13 p.

Katzen, R., 2006. Ethanol from lignocellulosic wastes with utilization of recombinant bacteria. *Applied Biochemistry And Biotechnology* (45-46):697-707.

Kumar, R. y C. Wyman. 2008. The impact of dilute sulfuric acid on the selectivity of xylooligomer depolymerization to monomers. *Carbohydrate Research* 343:290–300.

Larsson, S., A. Reimann, N.O. Nilvebrant y L.J. Jönsson. 1999. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulosic hydrolysates of spruce *Appl. Biochem. Biotechnol* 77(79):91–103.

Liao, W., L. Peng, G. Wang, H. Yao, S. Huang y Y. Li. 2010. Intracellular ethanol accumulation in yeast cells during aerobic fermentation: a Raman spectroscopic exploration. *Letters in Applied Microbiology* 6(51):632–638.

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

Luz, S. M., A.R. Gonçalves, P.M. Ferrão, M.J. Freitas, A.L. Leão y A. Del'Arco. 2007. Water absorption studies of vegetable fibers reinforced polypropylene composites. En: *Proceedings of 6th International Symposium on Natural Polymers and Composites*.

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 Biotecnológica* 1(14):146-156.

Neureiter, M., H. Danner, C. Thomasser, B. Saidi y R. Braun. 2002. Dilute-acid Hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (98-100):49-58.

Nolasco, J. y P. De Massaguer. 2006. Thermal degradation kinetics of sucrose, glucose and fructose in sugarcane must for bioethanol production. *Journal of Food Process Engineering* 29:462–477.

Nuñez, M. 2011. Efecto de la temperatura y la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ácido sulfúrico) en el pretratamiento de digestión de aserrín de pino (*Pinus oocarpa*) para la producción de etanol lignocelulósico. Tesis Ing. en Agroindustria Alimentaria, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 23 p.

Oliva Dominguez, J. 2003. Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Tesis doctoral, Madrid, España, Universidad Complutense de Madrid. 166 p.

Palmqvist E, J. Almeida y B. Hahn-Hagerdal. 1999a. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnol Bioeng* 62:447–454.

Palmqvist E, H. Grage, N. Meinander y B. Hahn-Hagerdal. 1999b. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol Bioeng* 63:46–55.

Palmqvist E. y B. Hagerdal. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* 74(1): 25-33.

Pandey, A., C. Soccol, P. Nigam y V. Soccol. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues: Part I. Sugarcane bagasse. *Bioresour Technology* 74 (1):69–80.

Ravelo, D., R. Bermúdez, E. Valiño, y J. Pérez. 2002. Fermentación del bagazo de caña de azúcar en un biorreactor a escala de laboratorio. *Tecnología Química* 2(22):32-43.

Rosero, A. 2008. Pretratamiento y fermentación de la fibra del palmito *Bactris gasipaes* para la producción de etanol lignocelulósico. Tesis Ing. en Agroindustria Alimentaria, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 61 p.

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

Sasaki, M., T. Oshikawa, H. Watanabe y G. Wahyudiono. 2011. Reaction kinetics and mechanism for hydrothermal degradation and electrolysis of glucose for producing carboxylic acids. *Bioelectrics Research Centre Res Chem Intermed* 37:457–466.

Saska, M. y C. Martín. 2011. Pretratamiento al vapor asistido por impregnación ácida o alcalina para la producción de etanol a partir de bagazo y paja de caña de azúcar. *Centro Azúcar* 38(3):63-70.

Socol, C.R., L. Vandenberghe, A. Medeiros, S. Karp, M. Buckeridge, L. Ramos, A. Pitarelo, V. Ferreira-Leitão, L. Gottschalk, M. Ferrara, E. Bom, J. Araújo y F. Torres. 2010. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Bioresour. Technol.* 101 (13):4820–4825.

Turley, A., D. Xin, D. Meidui, L. Yingjian, J. Tony, y W.Changqing. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of lignin from residue of corn stover to ethanol production. *Industrial Crops & Products* 3(34):1629-1634.

Ulbricht R., J. Sharon y J. Thomas. 1984. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundam. Appl. Toxicol* (4):843-853.

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 Quing, L., L. Ying-hua y L. Xiu-yang. 2007. Investigation on influencing factors of 5-HMF content in *Schisandra*. *Journal of Zhejiang University SCIENCE* 8(6):439-445.

Yang, B. y C. Wyman. 2004. Effect of xylan and lignin removal by batch and flow through pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* 86 (1):88–95.

## 7. ANEXOS

Anexo 1. Resumen de Análisis de Varianza de las variables evaluadas.

Variables respuesta	Temperatura		Concentración		Temperatura × Concentración		R <sup>2</sup>	%CV
	F	P	F	P	F	P		
Hemicelulosa	83.3	<0.01	6604.7	<0.01	5.9	<0.01	0.99	5.5
Celulosa	769.3	<0.01	385.8	<0.01	30.4	<0.01	0.99	3.4
Lignina	31.6	<0.01	17.4	<0.01	4.7	<0.01	0.86	2.5
HMF	654.0	<0.01	2582.7	<0.01	144.0	<0.01	1.00	4.5
Azúcares totales	614.0	<0.01	1744.9	<0.01	88.1	<0.01	1.00	3.3
Glucosa	186.8	<0.01	404.3	<0.01	77.8	<0.01	0.99	8.0
Xilosa	47.7	<0.01	286.6	<0.01	7.8	<0.01	0.98	10.5
Galactosa	402.2	<0.01	146.3	<0.01	103.4	<0.01	0.99	8.5
Arabinosa	1835.5	<0.01	295.7	<0.01	295.7	<0.01	1.00	11.4

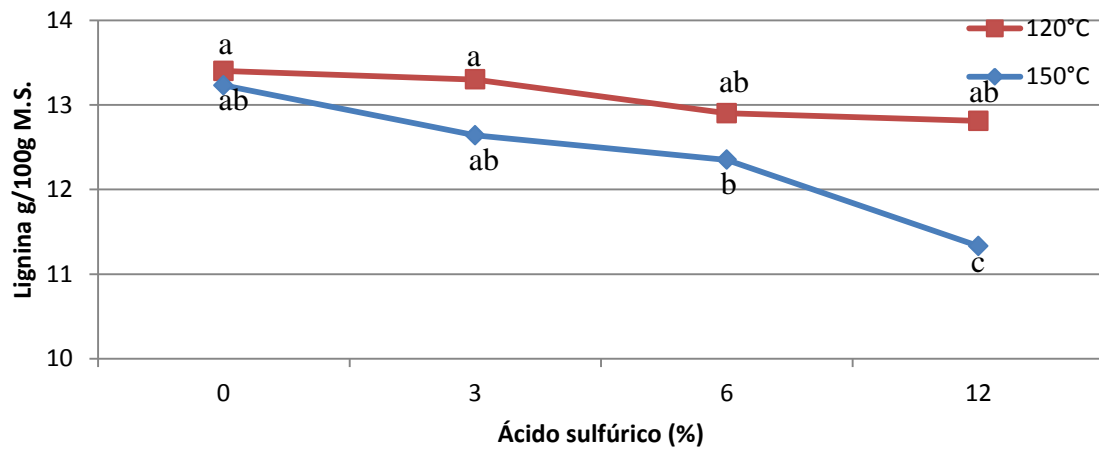
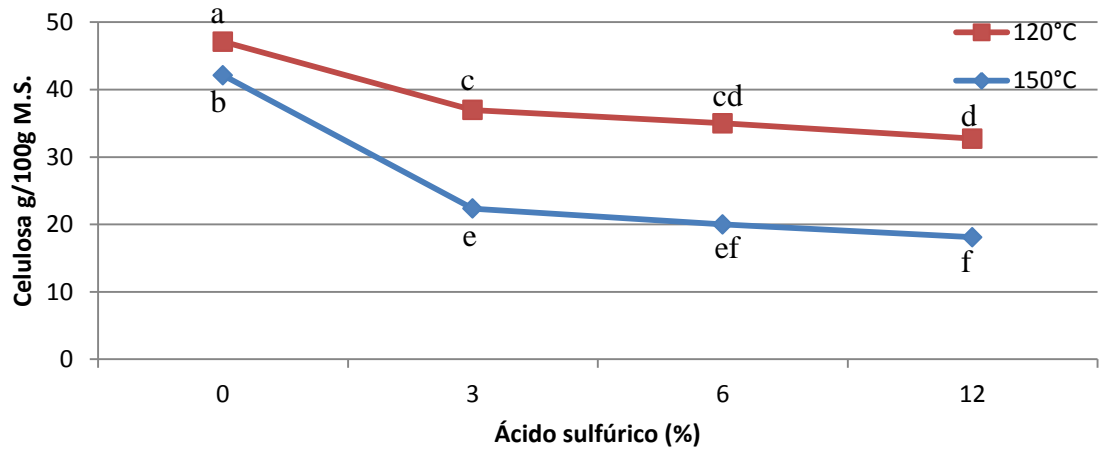
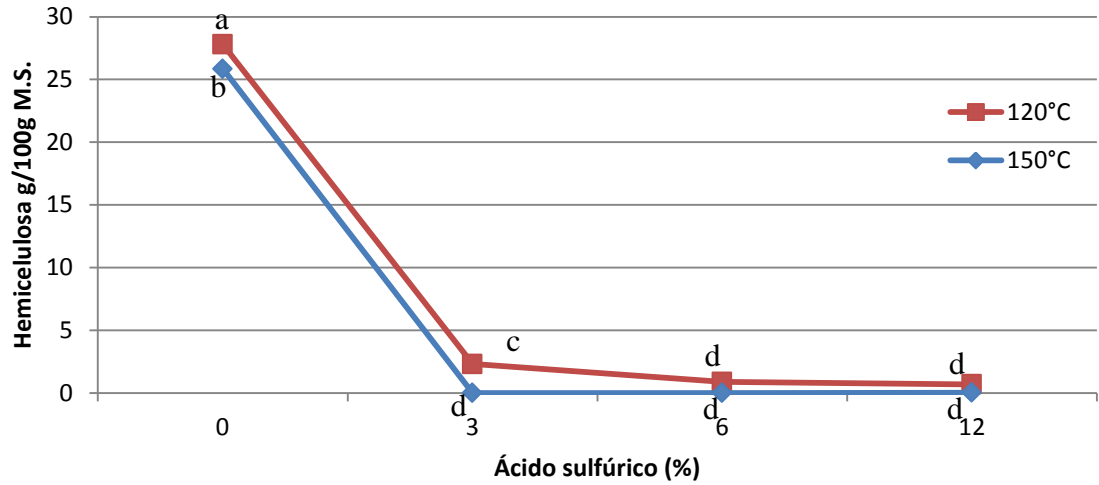
Anexo 2. Balance de materia de los componentes analizados (g/100 g M.S.).

<b>Tratamiento</b>	<b>Hemicelulosa<sup>£</sup></b>	<b>Celulosa<sup>£</sup></b>	<b>Lignina<sup>£</sup></b>	<b>HMF<sub>ε</sub></b>	<b>Azúcares totales<sup>ε</sup></b>
0% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -120°C	27.80	47.11	13.40	0.02	5.11
3% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -120°C	2.32	36.96	13.30	0.43	29.25
6% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -120°C	0.89	35.01	12.90	0.47	38.99
12% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -120°C	0.69	32.73	12.81	0.08	41.05
0% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150°C	25.85	42.13	13.23	0.02	5.68
3% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150°C	0.00	22.34	12.64	0.29	19.87
6% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150°C	0.00	19.99	12.35	0.28	25.08
12% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150°C	0.03	18.10	11.33	0.04	31.38

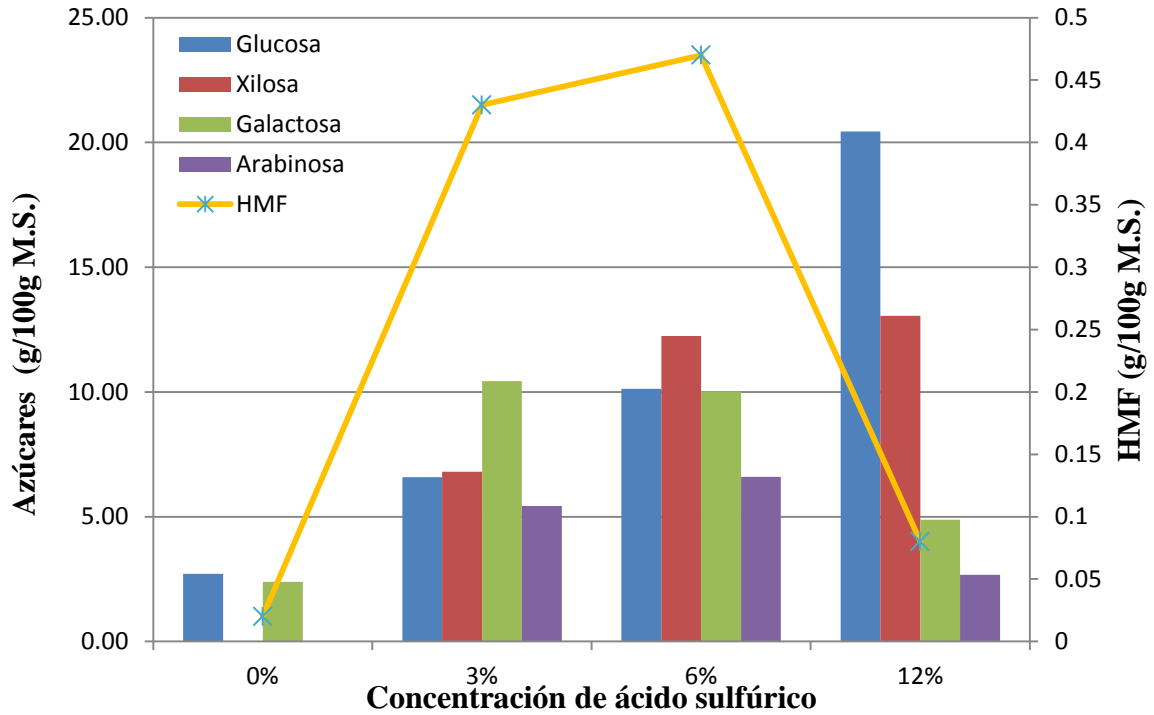
£ Contenido en el bagazo de caña de azúcar después del pretratamiento.

ε Contenido en el hidrolizado.

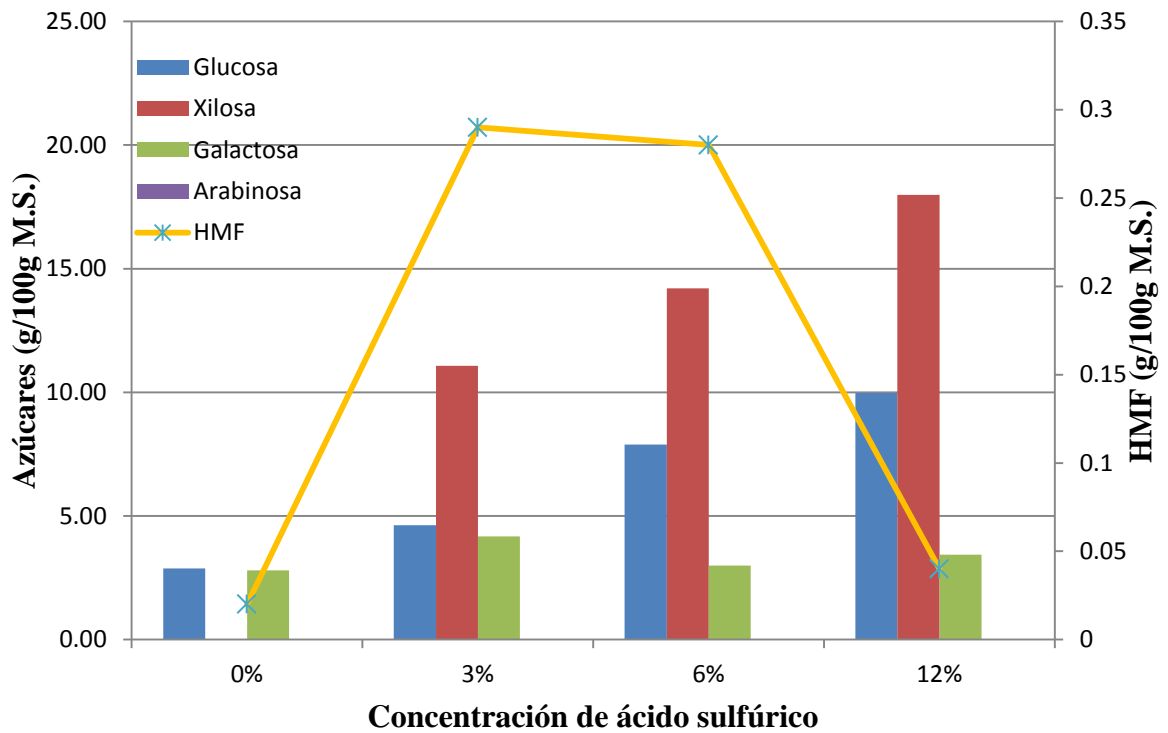
A Calculado por diferencia en base 100.



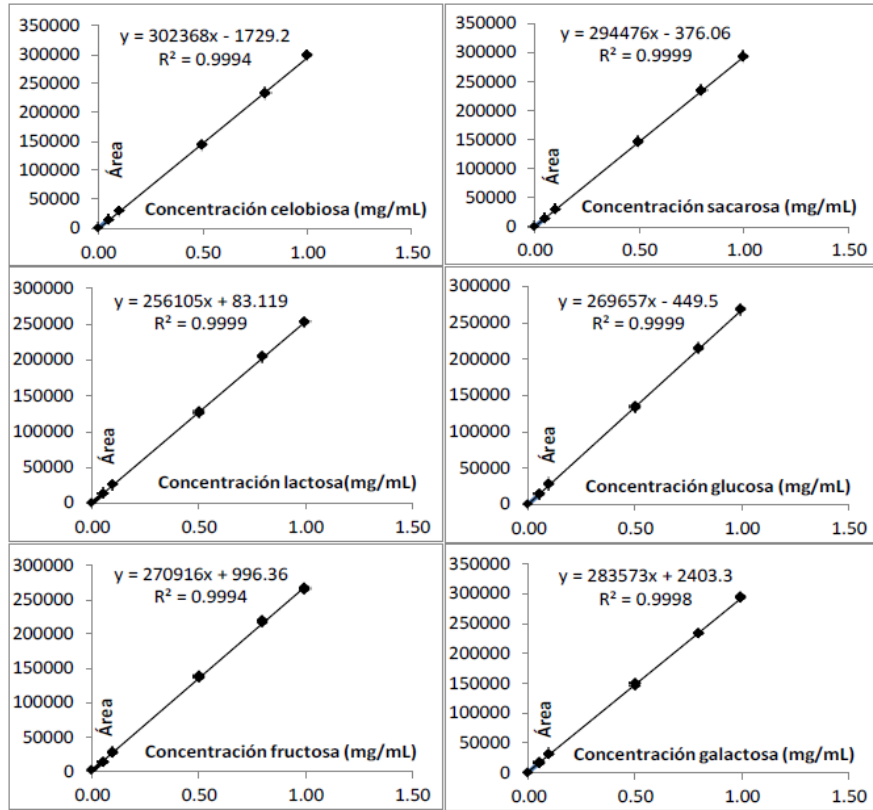
a, b, c, d, e, f = Valores en sentido vertical con distinta letra son diferentes (prueba LSMEANS,  $P < 0.05$ )  
 Anexo 3. Cambios en el contenido de hemicelulosa, celulosa y lignina después del pretratamiento.



Anexo 4. Comportamiento a 120°C de azúcares fermentables en el hidrolizado de bagazo de caña de azúcar comparado con el comportamiento de HMF

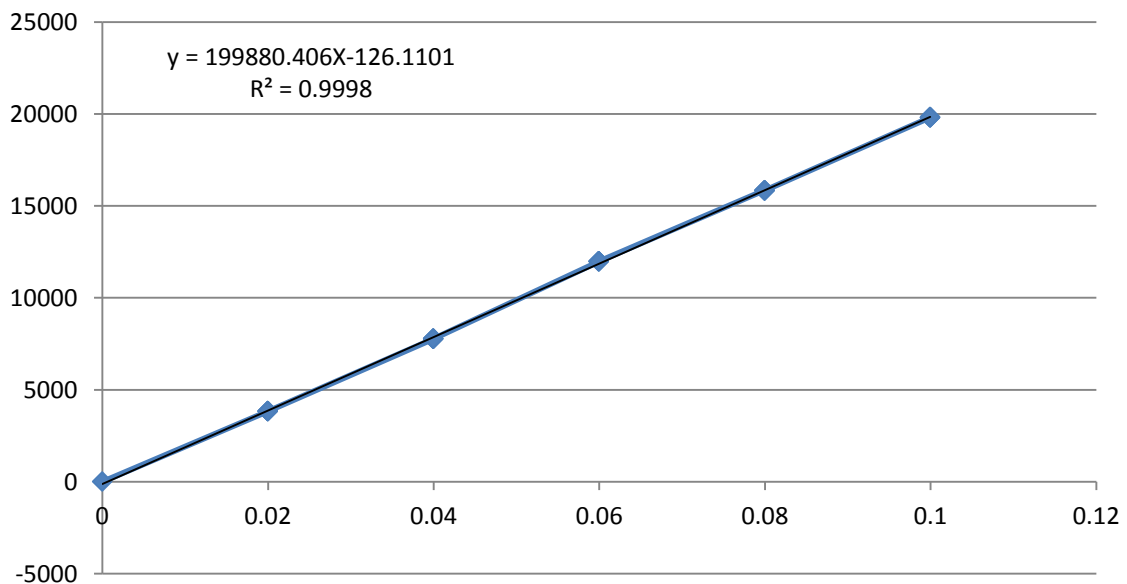


Anexo 5. Comportamiento a 150°C de azúcares fermentables en el hidrolizado de caña de azúcar comparado con el comportamiento de HMF.



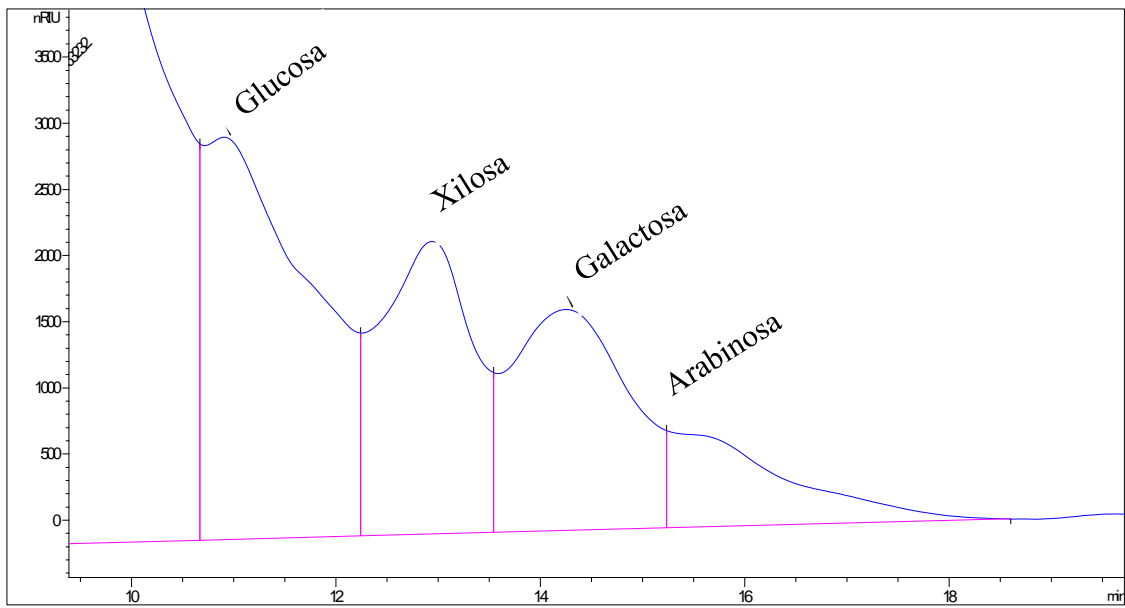
Anexo 6. Curvas de calibración de azúcares incluidos en el método de medición de azúcares por HPLC.

Fuente: Contreras 2011.

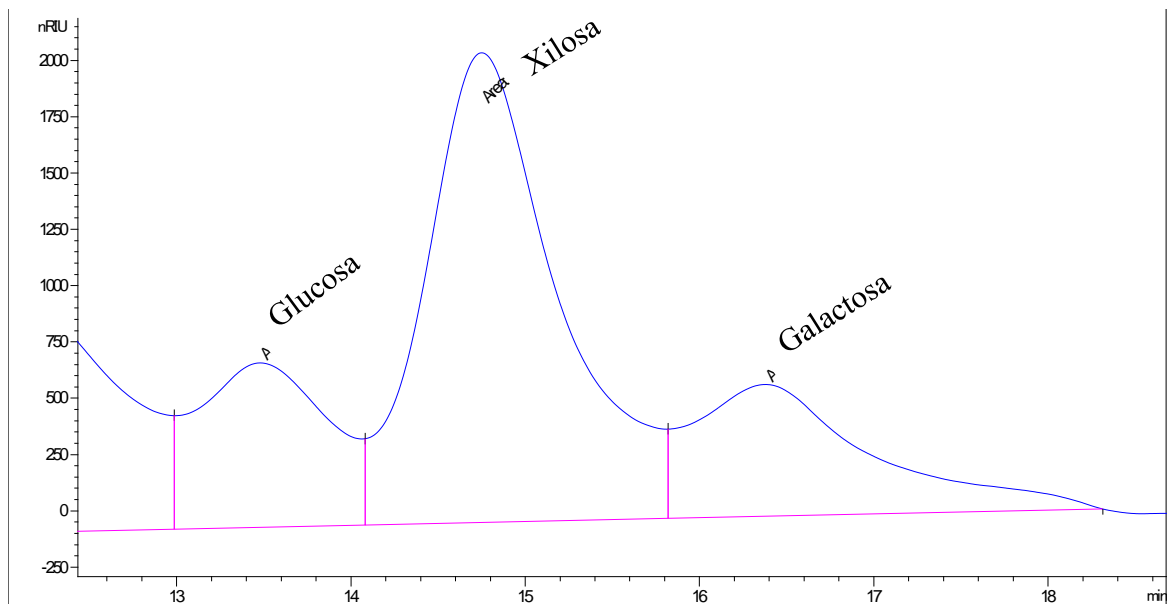


Anexo 7. Curva de calibración de 5-hidroximetilfurfural para el método de medición de HMF por HPLC.

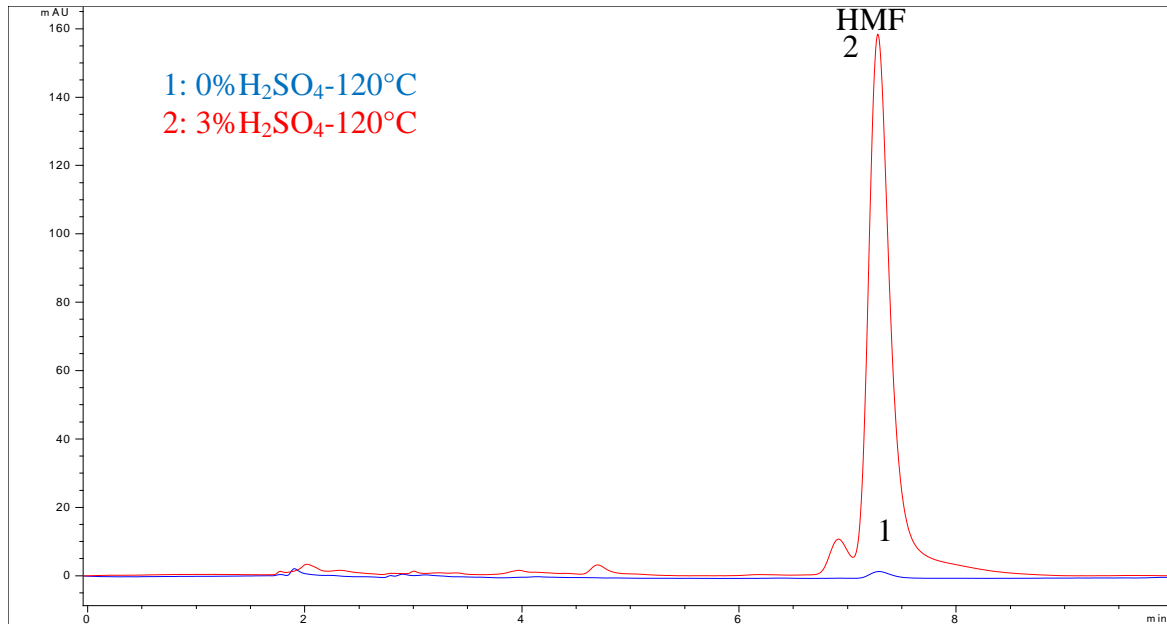
Fuente: Ixcotoyac y Tuyuc 2013.



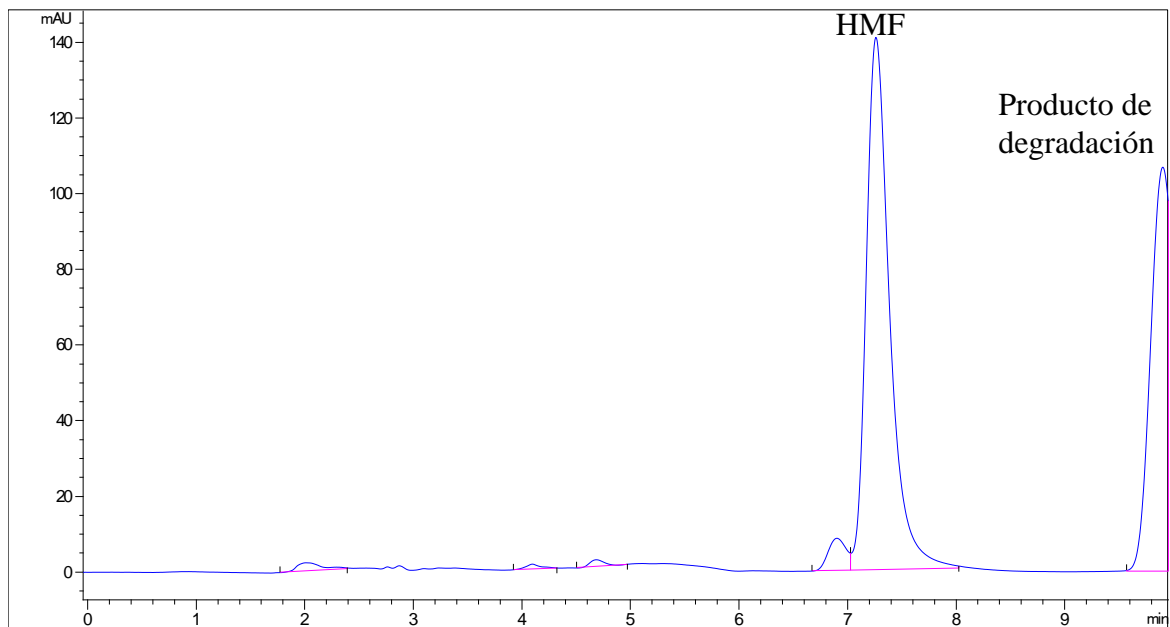
Anexo 8. Cromatograma de azúcares presentes en el hidrolizado de caña de azúcar del tratamiento 3% $H_2SO_4$ -120°C



Anexo 9. Cromatograma de azúcares presentes en el hidrolizado de caña de azúcar del tratamiento 3% $H_2SO_4$ -150°C. Nótese la reducción del número de azúcares fermentables.



Anexo 10. Cromatograma de HMF presente en el hidrolizado de bagazo de caña de azúcar de los tratamientos 0%  $H_2SO_4$ -120°C y 3%  $H_2SO_4$ -120°C.



Anexo 11. Cromatograma de HMF presente en el hidrolizado de bagazo de caña de azúcar del tratamiento 6%  $H_2SO_4$ -150°C. Nótese el incremento del pico a 9.8 min.





Anexo 14. Solución obtenida del pretratamiento (hidrolizado) a 120°C de bagazo de caña de azúcar. De izquierda a derecha: 0, 3, 6 y 12% de ácido sulfúrico, respectivamente.



Anexo 15. Bagazo seco de caña de azúcar después del pretratamiento ácido diluido. Arriba los tratamientos a 150°C, abajo a 120°C. De izquierda a derecha 3%, 6%, 12% y 0% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Anexo 16. Lista de materiales, equipo y reactivos utilizados durante el estudio.

### **Materiales**

- Bagazo de caña de azúcar obtenido al final del proceso industrial de extracción de jugo.
- Pipetas Fisher Brand, clase A, 1 mL.
- Pipetas Kimax, clase A, 10 mL.
- Pipeta de precisión Wheaton Socorex, 10 -100  $\mu$ L.
- Erlenmeyer Pyrex, 1000 mL.
- Matraz volumétrico Kimax, 10, 100 y 1000 mL.
- Filtro para jeringa Econofiltro, 0.45  $\mu$ m.
- Jeringas BD Syringe, Luer-Lok Tip, 2.5 y 3 mL.
- Guantes de nitrilo Fisher Scientific, sin polvo.
- Beakers de vidrio Kimble, 1000 mL.
- Beakers de plástico Kartell, 3L.
- Beakers de vidrio Pirex, 25 mL.
- Papel aluminio Reynolds wrap, 18 pulgadas de ancho.
- Probetas, 25, 50 y 100 mL.
- kitasato Pyrex, 600 mL.
- Papel filtro Whatman, 0.45  $\mu$ m.
- Viales target DTm, National Scientific, c400-1.
- Goteros.
- Bulbos.
- Papel cera.
- Crisoles de porcelana, 50 mL.
- Pinzas para crisol.
- Desecador convencional.
- Bandeja de aluminio, 28x18x4 cm.

### **Equipo**

- Balanza analítica Adventurer 2140, OHAUS.
- Horno Napco modelo 630.
- Mufla-Sybron, Thermolyne.
- Campana para gases 608300, Labconco.
- Termómetro “lollipop”, Traceable.
- Bomba de vacío, HyperVac 2000.
- Digestor Kjeltex 8100, Foss.
- Calentador y agitador, Fisher Scientific.
- Potenciómetro Thermo Scientific Orion Star.
- Columna Hi-Plex Ca 300  $\times$  7.7 mm 8  $\mu$ m, guard cartridge column 3  $\times$  0.5 mm, guard column 7.7  $\times$  50 mm, capilar Peek 0.007'' id obtenidos de Agilent Technologies.
- Columna LC ZORBAX Eclipse XDB-C 18, 4.6 X 150 mm, 5  $\mu$ m; *guard cartridge column* empacado con *analytical guard column* Eclipse XDB-C 18, 4.6 x 12.5 mm, 5  $\mu$ m; *capilar Peek* 0.007'' id obtenidos de Agilent Technologies.

- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Agilent technologies, con los siguientes módulos: degasificador modelo G1379A 1100 Series; bomba cuaternaria modelo G1311A. 1100 Series; inyector automático modelo G1329A 1100 Series.
- Detector de índice de refracción, modelo G1362A 1100 Series.
- Detector DAD, columna LC de fase reversa; en un rango de 0 a 5 mg de 5-HMF por mL de muestra diluida.
- Baño maría, Precision 180 GCA Corporation.
- Analizador de fibra ANKOM 200, ANKOM Technology.
- Fiber filter bag F58, obtenidos de ANKOM Technology.

### Reactivos.

- 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.

#### Solución neutro detergente:

- Sulfato de lauril sódico, Sigma-aldrich, >59%, clase GR, No. de catálogo L-4509.
- Ácido etilendiaminotetraacético (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.

#### Solución ácido detergente:

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

#### Solución lignina.

- Ácido sulfúrico, Fisher Scientific, 97%, clase GR, No. de catálogo 320501.
- Hidróxido de sodio, J.T. Baker, 98.4%, clase A.C.S., No. de catálogo 3722-19.

#### Estándares para determinación de azúcares totales por HPLC

- Etanol anhydrous, Sigma-aldrich, 99.5 %, clase p.a., No. de catálogo 459836.
- 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.
- $\alpha$ -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 determinación de 5-Hidroximetil furfural

- 5-Hidroximetilfurfural, SAFC, 99%, clase GR, No. de catálogo W501808.
- Agua desionizada para cromatografía LiChrosolv® Merck.