

**Efecto de la temperatura y concentración de
ácido sulfúrico en el perfil de azúcares
obtenido del pretratamiento de aserrín de
*Pinus oocarpa***

Jazmín Cristabel Contreras Gutiérrez

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2011

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Efecto de la temperatura y concentración de
ácido sulfúrico en el perfil de azúcares
obtenido del pretratamiento de aserrín de
*Pinus oocarpa***

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

Presentado por

Jazmín Cristabel Contreras Gutiérrez

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2011

**Efecto de la temperatura y concentración de
ácido sulfúrico en el perfil de azúcares
obtenido del pretratamiento de aserrín de
*Pinus oocarpa***

Presentado por:

Jazmín Cristabel Contreras Gutiérrez

Aprobado:

Francisco Javier Bueso, Ph.D.
Asesor principal

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

Jorge Cardona, Ph.D.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

RESUMEN

Contreras Gutiérrez, J. C. 2011. Efecto de la temperatura y concentración de ácido sulfúrico en el perfil de azúcares obtenido del pretratamiento de aserrín de *Pinus oocarpa*. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 21p.

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del pretratamiento ácido diluido en aserrín de *Pinus oocarpa* sobre el perfil de azúcares obtenido. Para ello fue necesario la calibración y validación interna preliminar del método de análisis de azúcares por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) y Detector IR (Índice de Refracción) en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano. Las condiciones cromatográficas fueron: columna Hi-plex Ca 300 × 7.7 mm 8 μm, temperatura de columna 85°C y fase móvil agua desionizada. Se utilizó un diseño de parcelas divididas, las parcelas principales fueron la temperatura de pretratamiento (110 y 130°C) y como subparcelas las concentraciones de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2, 4 y 6%. Se evaluó el efecto de los factores sobre la producción de azúcares mediante un ANDEVA (análisis de varianza) utilizando el programa SAS (Statistical Analysis System[®] 9.1). Se elaboraron las curvas de calibración (R²>0.999) para los azúcares fructosa, celobiosa, lactosa, sacarosa, glucosa y galactosa con el grado de precisión (CV < 2%) y exactitud (prueba t- student P>0.05) óptima. En la matriz de *P. oocarpa* se detectaron los azúcares galactosa, manosa, glucosa y arabinosa. La concentración de cada uno fue afectada significativamente (P<0.05) por la temperatura, concentración de H₂SO₄ y por la interacción de ambos, siendo la concentración de ácido lo que significativamente aumentó la producción de azúcar. Los pretratamientos 130°C con 4% H₂SO₄ y con 6% H₂SO₄ produjeron la hidrólisis total y parcial de la hemicelulosa y celulosa, respectivamente.

Palabras clave: Galactosa, glucosa, hemicelulosa, hidrólisis ácida, HPLC y validación interna.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4 CONCLUSIONES.....	17
5 RECOMENDACIONES.....	18
6 LITERATURA CITADA	19
7 ANEXOS	21

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Diluciones de la curva de calibración de azúcares para análisis por HPLC...	4
2. Parámetros estadísticos para la calibración cualitativa del método de medición de azúcares por HPLC.....	7
3. Parámetros estadísticos para la curva de calibración del método de medición de azúcares por HPLC.....	8
4. Evaluación de exactitud en la validación preliminar interna para la identificación de azúcares por HPLC.	10
5. Evaluación de la exactitud en la validación preliminar interna para la cuantificación de azúcares por HPLC.....	11
6. Análisis de varianza en los azúcares producidos por el pretratamiento ácido diluido en aserrín de <i>Pinus oocarpa</i>	12
7. Interacción entre temperatura y concentración de ácido sulfúrico de los pretratamientos en <i>Pinus oocarpa</i> para la obtención de glucosa.	12
8. Producción de azúcares del <i>Pinus oocarpa</i> pretratado con ácido sulfúrico diluido.....	13
9. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico del pretratamiento en <i>Pinus oocarpa</i> para la producción de azúcares.....	13
10. Efecto de la temperatura de pretratamiento en <i>Pinus oocarpa</i> para la producción de azúcares.....	13
11. Interacción entre temperatura y concentración de ácido sulfúrico de los pretratamientos en <i>Pinus oocarpa</i> para la obtención de azúcares totales.	15

Figuras	Página
1. Curvas de calibración de azúcares incluidos en el método de medición de azúcares por HPLC.....	9
2. Cromatograma de la solución mezcla de azúcares estándares utilizada para la validación.	10
3. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico y temperatura en la producción de galactosa a partir del pretratamiento en <i>Pinus oocarpa</i>	14
4. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico y temperatura en la producción de manosa a partir del pretratamiento en <i>Pinus oocarpa</i>	14
5. Producción de azúcares del pretratamiento ácido diluido en <i>Pinus oocarpa</i> . ..	16
6. Perfil de azúcares del hidrolizado de <i>Pinus oocarpa</i>	16

Anexos	Página
1. Concentraciones de azúcar utilizadas en la solución estándar para la validación del método de análisis de azúcar por HPLC.....	21
2. Costos variables para la calibración y validación del método de análisis de azúcar por HPLC	21

1. INTRODUCCIÓN

La producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica contribuye a la creciente demanda energética, por otro lado es una oportunidad para utilizar los subproductos lignocelulósicos de industrias agrícolas, forestales y de la industria papelera, inclusive desechos domésticos (orgánicos). La producción mundial de bioetanol en el año 2006 fue de 39.0 millones de litros, siendo los principales productores EUA con 18.3 millones y Brasil con 17.5 millones, mientras que para el año 2010 la producción de etanol incrementó a 86 millones de litros, EUA 49 millones y Brasil 28 millones (REN21 2010).

En Honduras el 53.2% del territorio es de cobertura forestal, del cual el 36% corresponde a las coníferas, la producción de aserrín a partir de esta especie es del 10%. En el año 2010 la madera aserrada fue de 277,000 m³, lo cual indica el potencial de producción de etanol a partir de residuos forestales en el país (FAO 2011). Sin embargo, hay muy poca investigación en obtención de azúcares fermentables a partir del pino (*Pinus oocarpa*), así como también en el desarrollo de métodos de medición de los azúcares y alcoholes producidos a partir del proceso de hidrólisis y fermentación.

La madera es un complejo de polímeros naturales, su pared celular se compone de 41% celulosa, 29% hemicelulosa y 27% lignina, en maderas blandas como el pino (Hon y Shiraishi 2000). El pretratamiento se realiza con el fin remover la lignina de la matriz compacta de la fibra, hidrolizar la hemicelulosa y reducir la cristalinidad de la celulosa. El pretratamiento con ácido sulfúrico diluido ha sido muy utilizado por sus altas tasas de reacción y bajo costo, pero también existen otros métodos físicos, fisicoquímicos y biológicos. Ejemplo de ello es el estudio del efecto de líquidos iónicos, ácidos y alcalinos diluidos en la hidrólisis de residuos forestales de *Eucalyptus globulus* y *Nothofagus pumilio*, cuyos resultados fueron que todos los pretratamientos mejoran la eficiencia del paso posterior, la hidrólisis enzimática para la obtención de azúcares reductores. Sin embargo, se debe considerar la limitante de que bajo condiciones extremas de temperatura y ácido los azúcares simples se transforman en compuestos inhibidores de la fermentación, lo cual reduce los rendimientos de producción de bioetanol (Cortínez 2010).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) es un método simple que ha sido muy utilizado en análisis de alimentos y de hidrolizados de lignocelulosa. Es un método rápido, de alto grado de precisión, exactitud y sensibilidad, aprobado por la AOAC, requiere poco uso de reactivos, la preparación de la muestra es muy simple y no sólo mide azúcares totales sino que mide el perfil de azúcares, la limitante es el costo de inversión inicial (Cortínez 2010). Otro método utilizado en medición de azúcares es el de Somogyi Nelson, éste se fundamenta en la oxidación primaria cualitativa del azúcar y el compuesto oxidado es lo que conlleva a la

cuantificación espectrométrica relativa; éste determina azúcares en muy bajas concentraciones, pero implica el uso de reactivos tóxicos, requiere de mayor tiempo de análisis y mide sólo azúcares reductores (González y Castellanos 2003). Por otro lado, existe el método de medición de grados Brix, el cual mide azúcares totales y es rápido, sin embargo, es menos exacto.

El principio de detección de la cromatografía es la separación de una mezcla compleja de compuestos por su afinidad a una columna (fase estacionaria) con respecto al disolvente que la acarrea (fase móvil), la muestra es inyectada en la columna la cual está conectada al sistema de detección. La fase estacionaria usada en análisis de azúcares es una columna de intercambio iónico y como fase móvil compuestos polares: agua y acetonitrilo. En cuanto a la detección se utiliza el detector IR (Índice de Refracción) o el amperométrico, ya que los azúcares por su amplio rango de reactividad química y por no poseer cromóforos y fluoróforos no pueden ser detectados por UV visible o técnicas fluorescentes (Gratzfeld y Schuster 2001).

En el análisis de azúcares puede utilizarse la columna Hi-plex Ca 300×7.7 mm $8 \mu\text{m}$, cuyo mecanismo de separación es por intercambio catiónico. Está formada por una resina sulfatada cargada con calcio, lo cual hace que se genere una interacción de los grupos hidroxilo de las moléculas de azúcar con el ion Ca asociado a la resina; el orden de elusión de cada azúcar es de acuerdo al número y fuerza de los enlaces formados (Lloyd 2008). La columna funciona con el detector IR, el cual mide la diferencia del IR entre la celda que contiene la muestra y la celda de referencia (fase móvil), lo cual genera una señal eléctrica proporcional a la cantidad de muestra y la señales enviada a un registrador que la expresa en los cromatogramas (Agilent 2006). La fase móvil es agua, lo que evita las implicaciones del uso de reactivos tóxicos. La columna Hi-Plex Ca fue utilizada en un estudio para cuantificar los azúcares obtenidos del pretratamiento de hidrólisis ácida y autohidrólisis en la extracción de hemicelulosa antes del proceso de cocción Kraft de la madera de *Eucalyptus globulus* (Mendes *et al.* 2010).

Para la validación interna preliminar del método como mínimo se debe cumplir con los parámetros de sensibilidad, precisión y exactitud, además se debe controlar la temperatura y pH de la muestra. La sensibilidad se refiere a la concentración mínima del compuesto que el método es capaz de cuantificar, la cual está dada por los límites de detección. Para cumplir los parámetros de exactitud y precisión debe inyectarse de tres a cinco veces cada compuesto de la curva de calibración (Syed 2011).

El estudio se realizó en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano. Las limitantes fueron la falta del método de medición de hidroximetilfurfural en el laboratorio y que no se contaba con los azúcares estándares manosa y arabinosa para la calibración. En este contexto se plantearon los siguientes objetivos:

- Calibrar y validar preliminarmente el método de medición del perfil de azúcares por HPLC y detector IR para los azúcares fructosa, celobiosa, sacarosa, lactosa, glucosa y galactosa.
- Evaluar el efecto del pretratamiento de hidrólisis con ácido sulfúrico (2, 4 y 6%) y temperatura (110 y 130°C) sobre el perfil de azúcares del aserrín de *P. oocarpa*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. Los procedimientos de extracción y el análisis cromatográfico se realizó en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano (a 30°C y 78% Humedad Relativa), localizada en el departamento de Francisco Morazán, a 32 Km al Este de Tegucigalpa, Honduras.

Materiales. Columna Hi-Plex Ca 300 × 7.7 mm 8 μm, “guard cartridge column” 3 × 0.5 mm, “guard column” 7.7 × 50 mm, capilar Peek 0.007” id obtenidos de Agilent Technologies. Pipetas Kimax clase A 10 mL, Pipetas Fisher Brand clase A 1 mL, Pipeta de precisión Wheaton Socorex (10 -100 μL) y Erlenmeyer Pyrex de 1000 mL obtenidos de VWR. Tubos de ensayo Pyrex 15 mL de Cole-Parmer. Matraz volumétrico Kimax 10 mL, 100 mL y 1000 mL de Lab Safety Supply. Papel filtro 0.45 μm, filtro de jeringa Econofiltro 0.45 μm, goteros, bulbos, jeringa 3 mL, viales 1.5 mL, papel cera y gradillas metálicas obtenidos de Fisher Scientific.

Reactivos y disolventes. Estándares de D-(+)- Celobiosa 98% C7252-25G, D-(+)- Galactosa 99% G0750-100G, D-(+)- Glucosa 99.5% G5400, D-(-)- Fructosa 99% M556-07, D-(+)- Lactosa 99% L-1768, Sacarosa 99.5% S9378-1KG y D-Sorbitol 98% S1876 obtenidos de Sigma. Pellets de hidróxido de sodio (NaOH) 3722-19 de J. T Baker, ácido sulfúrico (H₂SO₄) 95.4% de Fisher Scientific y agua desionizada grado cromatografía 1.12333 de Merck.

Equipos. HPLC 1100, Automuestreador ALS G1329A, Bomba Cuaternaria G1311A y Detector IR 1260 de Agilent Technologies. Agitador Vortex 231 de Fisher Scientific, Balanza Analítica Adventurer 2140 OHAUS, Bomba de Vacío Rotavapor V-710 Buchi, Campana de Gas 608300 Labconco, Digestor Kjeltex 8100 Foss, Potenciómetro Mini Lab IQ120, Termómetro Hg SAMA-CT, Baño María Precision 180 y Centrífuga Eppendorf 5418.

Diseño experimental. Se utilizó un Diseño de Parcelas Divididas. Las parcelas principales fueron la temperatura de pretratamiento (110 y 130°C), y como subparcelas las concentraciones de ácido sulfúrico (2, 4 y 6%) diluido en agua destilada v/v. Se realizaron seis tratamientos y tres repeticiones, haciendo un total de 18 unidades experimentales.

Calibración del método de medición de perfil de azúcares por HPLC. Las condiciones cromatográficas para la calibración y validación del método fueron: Columna Hi-Plex Ca 7.7 × 300 mm 8 µm, temperatura de la columna 85°C (baño maría a 88°C), fase móvil H₂O DI (agua desionizada) previamente filtrada en papel filtro de 0.45 µm, Detector IR, temperatura de detector 40°C, velocidad de flujo 0.6 mL/min, presión máxima 40 bar y tiempo de corrida 30 min. Las muestras previamente filtradas a través de un filtro jeringa de 0.45 µm se colocaron en un vial para muestras debidamente rotulado y se realizaron las inyecciones con el automuestreador del HPLC (Lloyd 2008).

Prueba de respuesta de la columna, se preparó una solución de azúcares diluyendo 0.01 gr del estándar en 100 mL de H₂O (en un matraz volumétrico de 100 mL). Se realizó inyecciones de 5 µL de las soluciones de azúcar estándar, individualmente y mezcladas (fructosa, celobiosa, sacarosa, lactosa, glucosa y galactosa) a una concentración de 0.1 mg/mL para identificar el tiempo de detección de cada compuesto, tomando como referencia el tiempo de detección descrito en la ficha técnica de la columna Hi-plex Ca 7.7 × 300 mm 8 µm (Varian Inc. 2010), así también se inyectó el blanco (H₂O DI).

La calibración del método en la identificación de azúcares (tiempo de detección) se realizó haciendo cuatro inyecciones por cada compuesto. Los parámetros de precisión fueron el %CV (Coeficiente de Variación), incertidumbre estándar e incertidumbre expandida. Se midió el %CV de los tiempos de detección de cada compuesto para identificar el grado de variación entre repeticiones cuyo máximo valor permitido fue 2%, siendo el ideal <1%. Las mediciones de incertidumbre estándar se realizaron para evaluar la dispersión de los datos alrededor de la media y las mediciones de incertidumbre expandida para verificar la incidencia de datos fuera de tipo.

Elaboración de curvas de calibración, se definieron los niveles 0.05, 0.1, 0.5, 0.8 y 1.0 mg/mL. Se preparó la solución madre cada azúcar estándar (fructosa 99%, celobiosa 98%, sacarosa 99.5%, lactosa 99%, glucosa 99.5% y galactosa 99%) a 1.0 mg/mL de concentración, diluyendo de 0.1 gr del azúcar estándar en 100 mL de H₂O DI. Partiendo de ésta se realizaron diluciones para cada uno de los niveles de la curva (Cuadro 1), cada concentración se multiplicó por el porcentaje de pureza de cada azúcar para obtener la concentración real. Se realizaron inyecciones de 20 µL por cuadruplicado de cada muestra, incluyendo el blanco.

Cuadro 1. Diluciones de la curva de calibración de azúcares para análisis por HPLC.

Concentración del azúcar [§] (mg/mL)	Solución madre (mL)	Aforo H ₂ O DI* (mL)
0.80 ^{&}	8.0	2.0
0.50 ^{&}	5.0	5.0
0.10 ^{&}	1.0	9.0
0.05 ^{&}	0.5	9.5
Control	0	10.0

[§] Concentración teórica, multiplicar por el porcentaje de pureza del azúcar estándar para obtener el valor real.

[&] n=4

*DI: Desionizada

La cuantificación de los azúcares fue realizada por el detector IR, el cual lee el área bajo la curva de cada pico correspondiente a cada azúcar, que está directamente relacionada con las unidades IR del detector. Se elaboró la curva de calibración por regresión lineal y se generó su respectiva ecuación, donde “x” fue la concentración del compuesto inyectado y “y” el área bajo la curva del pico correspondiente; para la cual el valor de R^2 permitido fue >0.999 . Además se realizó mediciones de incertidumbre estándar, incertidumbre expandida y %CV (valor máximo permitido 2%) como parámetros de precisión.

Validación del método. Se inyectó al HPLC concentraciones conocidas del compuesto estándar (dentro del rango de detección). Se evaluó la exactitud en identificación de compuestos comparando el tiempo de detección establecido en la calibración versus el valor observado en las inyecciones de la validación mediante una prueba t-student ($P>0.05$). Para evaluar la exactitud de la curva de calibración, se comparó el valor de las concentraciones inyectadas con el valor obtenido de la calibración. Las concentraciones inyectadas fueron 800 ppm celobiosa, 200 ppm sacarosa, 900 ppm lactosa, 400 ppm glucosa, 700 ppm galactosa y 300 ppm fructosa, tomando en cuenta el porcentaje de pureza de cada azúcar. La hipótesis planteada para la prueba t-student fue que la concentración inyectada y la obtenida de la ecuación eran iguales ($P>0.05$).

Pretratamiento del aserrín de pino. La muestra de aserrín de pino al 12% de humedad se sometió al pretratamiento de ácido diluido, se mezcló 5 gr de muestra en 55 mL de H_2SO_4 diluido al 2, 4 y 6% y cada parcela (110 y 130°C) se sometió a hidrólisis ácida en el digestor Kjeltex por dos horas. Se dejó reposar por dos horas y luego se filtró al vacío en crisoles Gooch, para separar el hidrolizado (compuesto de los azúcares) y la torta (celulosa sin hidrolizar).

El hidrolizado de aserrín de pino se neutralizó con NaOH (M6, M1 y M0.25) mediante el método de titulación con fenoftaleína, la neutralización se hizo en un matraz de 100 mL en el cual se colocaron 10 mL de hidrolizado, se añadió NaOH hasta llegar a pH neutro y se completó el volumen con agua destilada hasta 100 mL. La muestra se almacenó congelada a 0°C hasta el momento del análisis de perfil de azúcares por HPLC.

Análisis del perfil de azúcares del hidrolizado de aserrín de pino. El hidrolizado de aserrín de *P. oocarpa* se descongeló a temperatura ambiente y se verificó el pH (7.0), luego se centrifugó a 6,000 RPM durante 4 min para remover partículas grandes de la muestra. Finalmente, las muestras fueron filtradas a través de un filtro de jeringa de 0.45 μ m, se colocaron en un vial para muestras y se realizaron las inyecciones con el automuestreador del HPLC. Las condiciones cromatográficas fueron: inyección de 5 μ L temperatura de la columna 85°C (baño maría a 88°C), fase móvil H_2O DI, velocidad de flujo 0.6 mL/min y tiempo de corrida 30 min. El rango de cuantificación (establecido de acuerdo a la curva de calibración) fue de 0.05 a 1.0 mg/mL para los azúcares fructosa, celobiosa, sacarosa, lactosa, glucosa y galactosa. La cuantificación de los compuestos se hizo reemplazando el área bajo la curva (y) en la ecuación 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/g de materia seca de aserrín de pino. El factor de dilución (110), corresponde a la relación 1:11 (ácido y aserrín) y 1:10 (hidrolizado y agua más NaOH) de la neutralización.

Análisis estadísticos. Mediante el programa “Microsoft Excel® Office 2007” se realizó la calibración y validación del método. Para la calibración se hizo una regresión lineal de concentración inyectada versus área bajo la curva, de ello se obtuvo la curva de calibración con su ecuación correspondiente. Se midió promedio, incertidumbre estándar, incertidumbre expandida y %CV del área del pico correspondiente a cada compuesto. Para la validación se realizó una prueba t-student ($P > 0.05$) para evaluar la exactitud de la curva de calibración en la cuantificación y la capacidad de detección de azúcares por método HPLC y detector IR.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) en producción de azúcares individuales y totales obtenidos del pretratamiento del aserrín de *P. oocarpa* y una separación de medias Tukey con un nivel de significancia $P < 0.05$, además se realizó un análisis de interacción entre las variables temperatura de pretratamiento y concentración de H_2SO_4 . Para ello se utilizó el programa “Statistical Analysis System” (SAS® versión 9.1).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calibración del método de medición de azúcares por HPLC-IR. El método aplica tanto para análisis de azúcares obtenidos del hidrolizado de biomasa lignocelulósica (ASTM E1758-01), como para análisis de azúcares en alimentos (AOAC 982.14).

El Cuadro 2 demuestra la precisión del método en identificación de azúcares, los %CV de los tiempos de detección de cada compuesto fueron menores a 0.1%, por lo tanto hubo poca variación entre repeticiones. La incertidumbre estándar y expandida demuestra que el rango de variación alrededor de la media fue bajo. Estos resultados estuvieron de acuerdo con Casas *et al.* (2001) quien define como CV <3% en mediciones de azúcar por HPLC.

Cuadro 2. Parámetros estadísticos para la calibración cualitativa del método de medición de azúcares por HPLC.

Azúcar	Tiempo de detección (min)	Incertidumbre estándar	Incertidumbre expandida	CV%[§]
Celobiosa ^{&}	9.32	0.003	0.007	0.03
Sacarosa ^{&}	9.48	0.004	0.007	0.04
Lactosa ^{&}	9.80	0.006	0.013	0.07
Glucosa ^{&}	11.26	0.003	0.006	0.03
Galactosa ^{&}	12.35	0.003	0.006	0.02
Fructosa ^{&}	13.43	0.005	0.002	0.02

[&] n=4

[§] Coeficiente de variación.

La calibración cuantitativa el método cumplió con los parámetros de precisión óptima para HPLC, con un CV <2% y un R² superior a 0.999 (Figura 1), lo cual coincide con Casas *et al.* (2001), que recomienda R²>0.999 en análisis de azúcares por HPLC. Los valores de incertidumbre estándar y expandida muestran que el rango de dispersión de los datos alrededor de la media fue bajo (Cuadro 3).

Por lo tanto, el método fue capaz de cuantificar todas las concentraciones de la curva de calibración y partiendo de ello se establecieron los límites de detección de 0.05 mg/mL a 1.0 mg/mL límite inferior y superior, respectivamente.

Cuadro 3. Parámetros estadísticos para la curva de calibración del método de medición de azúcares por HPLC

Azúcar [§]	Concentración (ppm)*	Área bajo la curva	Incertidumbre estándar	Incertidumbre expandida	CV% [¶]
Celobiosa ^{&}	49.0	14,113.5	292.5	585.0	2.07
	98.0	28,773.3	265.2	530.4	0.92
	490.0	143,078.0	1,311.4	2,622.8	0.92
	784.0	232,754.7	1,688.3	3,376.5	0.73
	980.0	298,187.9	930.6	1,861.2	0.31
Lactosa ^{&}	50.0	12,700.3	105.8	211.6	0.83
	99.0	25,483.7	137.4	274.8	0.54
	495.0	126,445.7	614.1	1,228.2	0.49
	792.0	204,123.8	892.1	1,784.1	0.44
	990.0	252,866.3	1,271.2	2,542.4	0.50
Sacarosa ^{&}	50.0	14,168.1	94.7	189.7	0.67
	100.0	29,255.3	220.0	440.0	0.75
	498.0	145,382.5	1,458.9	2,917.8	1.00
	796.0	234,429.9	1,672.4	3,344.8	0.71
	995.0	292,649.3	1,466.6	2,933.2	0.50
Glucosa ^{&}	50.0	13,180.4	106.2	212.3	0.81
	100.0	26,272.1	164.6	329.1	0.63
	498.0	133,224.9	991.3	1,982.6	0.74
	796.0	214,307.2	1,194.4	2,388.9	0.56
	995.0	268,010.9	837.7	1,675.3	0.33
Galactosa ^{&}	50.0	16,565.3	92.7	185.4	0.60
	99.0	31,883.7	25.3	50.6	0.08
	495.0	141,547.1	781.1	1,562.3	0.55
	792.0	226,134.3	1,300.0	2,599.9	0.58
	990.0	284,292.6	832.3	1,664.6	0.29
Fructosa ^{&}	50.0	13,311.7	263.6	527.2	1.98
	99.0	27,406.1	127.1	254.2	0.46
	495.0	137,200.4	1,261.0	2,521.9	0.92
	792.0	218,608.0	1,572.3	3,144.5	0.72
	990.0	265,812.8	1,236.9	2,473.9	0.47

[§] Límite inferior de detección 0.05 mg/mL y límite superior de detección 1.0 mg/mL.

*ppm: parte por millón. Ppm/1000 equivale a 1 mg/mL de solución.

[¶] CV: Coeficiente de variación.

[&] n=4

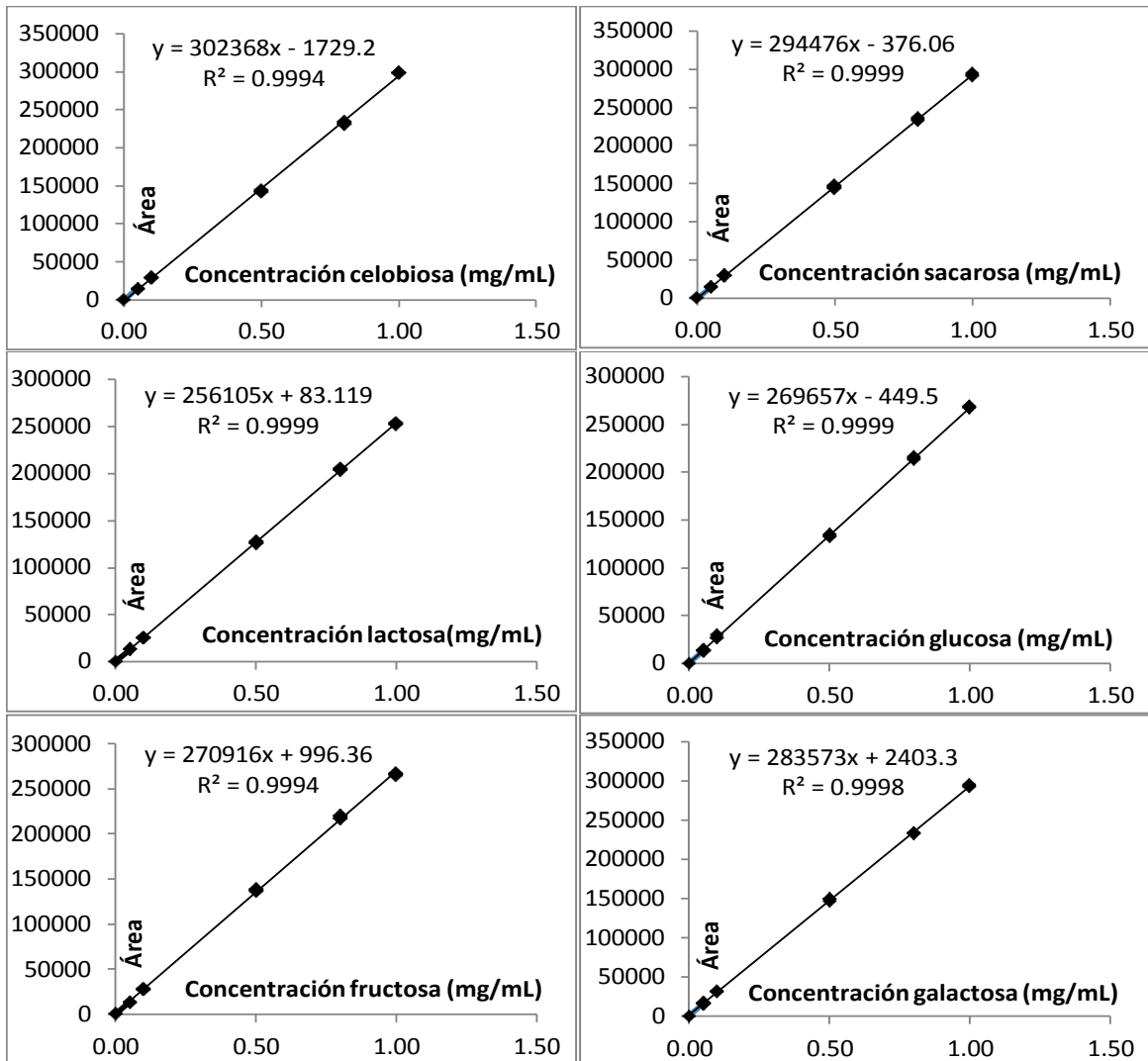


Figura 1. Curvas de calibración de azúcares incluidos en el método de medición de azúcares por HPLC.

Validación interna preliminar del método análisis de perfil de azúcares por HPLC.

La prueba-t student demostró que no hubo diferencia significativa ($P > 0.058$) en el tiempo de detección de los azúcares incluidos en la validación, a excepción de la celobiosa y la fructosa que sí presentaron diferencia significativa ($P < 0.06$) de centésimas de segundo en el tiempo de detección (Cuadro 4). Sin embargo, en HPLC esa diferencia no es significativa, sí lo es la diferencia en décimos de minuto. Por lo tanto, el método cumplió con los parámetros de exactitud en identificación de los azúcares celobiosa, lactosa, glucosa, galactosa y fructosa, lo cual coincide con Casas *et al.* (2001) que en la prueba t reporta $P > 0.025$ en análisis de azúcares por HPLC.

Cuadro 4. Evaluación de exactitud en la validación preliminar interna para la identificación de azúcares por HPLC.

Azúcar	Valor experimental (min)	t	P t [§]
Celobiosa ^{&}	9.32	7.0	0.006
Sacarosa ^{&}	9.48	nd*	nd
Lactosa ^{&}	9.78	-3.0	0.058
Glucosa ^{&}	11.26	1.0	0.391
Galactosa ^{&}	12.34	-5.2	0.140
Fructosa ^{&}	13.43	-31.0	<0.001

[§] |t| prueba t-student

nd: no detectado

Por otra parte, el método no fue capaz de identificar los compuestos celobiosa y sacarosa combinados en una misma solución, pero sí por separado. La razón fue que los tiempos de retención de la celobiosa y sacarosa (9.32 y 9.48 min, respectivamente) fueron muy cercanos. Al inyectar ambos compuestos mezclados el equipo identificó el de mayor concentración (celobiosa 784 ppm) y excluyó el otro (sacarosa 199 ppm). En la Figura 2 se puede observar que la resolución del método no fue suficiente para separar completamente los picos del minuto 9.32 y minuto 9.8 (celobiosa y lactosa, respectivamente) y que la sacarosa se encontró en la intersección de ambos. Por lo tanto, la concentración de la sacarosa (199 ppm) fue distribuida entre la celobiosa y lactosa, totalizando 990 y 882 ppm, respectivamente (Cuadro 5).

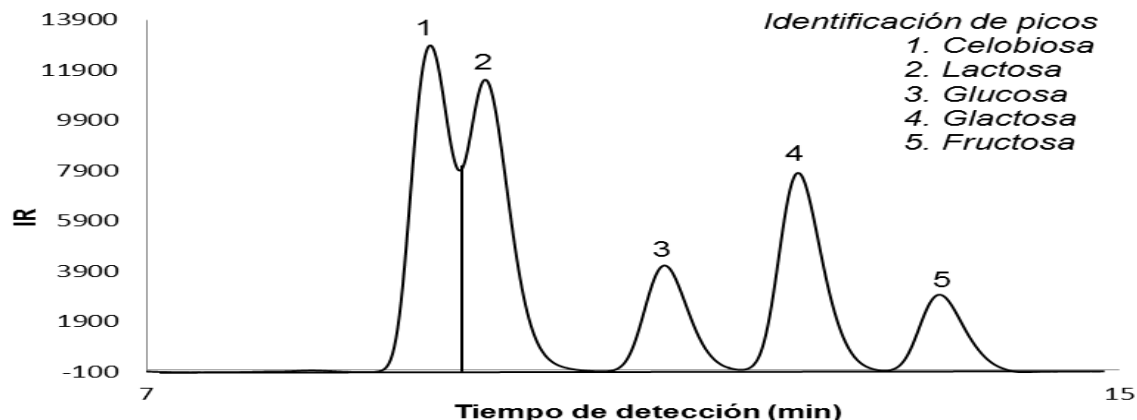


Figura 2. Cromatograma de la solución mezcla de azúcares estándares utilizada para la validación.

En el Cuadro 5 se muestra que el método de cuantificación de azúcares cumplió con los parámetros de exactitud de la validación preliminar interna. El resultado de la prueba t para todos los azúcares cuantificados fue que estadísticamente no hubo diferencia significativa ($P > 0.083$) entre la concentración teórica y la concentración real. El valor t indicó que el grado de subestimación o sobreestimación del método fue bajo. Por ejemplo, en el análisis de lactosa el valor t -2.6 mostró una sobreestimación no significativa ($P = 0.083$) de lactosa, con respecto a la concentración de 990 ppm (Cuadro 5).

Cuadro 5. Evaluación de la exactitud en la validación preliminar interna para la cuantificación de azúcares por HPLC.

Azúcar	Valor experimental (ppm)	t	P t [§]
Celobiosa ^{&}	882.0	1.07	0.36
Lactosa ^{&}	990.0	-2.57	0.08
Sacarosa ^{&}	-	nc*	nc
Glucosa ^{&}	398.0	-0.21	0.85
Galactosa ^{&}	693.0	-1.31	0.20
Fructosa ^{&}	297.0	-2.24	0.11

[§] |t| prueba t-student

[&] n=4

*nc: no cuantificado

Perfil de azúcares del aserrín de *P. oocarpa* pretratado con ácido sulfúrico diluido.

Se detectó los azúcares glucosa, manosa, galactosa y arabinosa en el hidrolizado de aserrín de *P. oocarpa*. Estos resultados coinciden con García *et al.* (2003), quien afirma que en maderas blandas la hemicelulosa se conforma principalmente por galactoglucomanos, a diferencia de las maderas duras que contienen mayor proporción de glucuroarabinosilanos. De acuerdo al estudio presentado por Cortínez (2010), el pretratamiento en *Eucalyptus globulus* (madera dura) con ácido diluido (1.25% H₂SO₄ a 60min) produjo xilosa 75.8 (mg/g MS) y glucosa 2.3 mg/g MS. Respecto a la caracterización química del *P. oocarpa*, hay muy poca información a nivel de azúcares simples, además la composición varía entre especies, edad y región. La composición de la madera utilizada en este estudio fue 48% celulosa, 23% hemicelulosa, 20% lignina y 9% otros (cenizas, almidones y pectinas), mientras que la del *Pinus strobus*, una especie parecida al *P. oocarpa*, es 41% celulosa, 29% hemicelulosa, 27% lignina y 3% otros (Hon y Shiraishi 2000).

Mediante el ANDEVA se determinó que la producción de azúcares fue afectada significativamente por la temperatura del pretratamiento (P<0.0026), la concentración de ácido (P<0.0009) y la interacción temperatura por concentración de ácido (P<0.019). A excepción de la producción de manosa y galactosa que no fue afectada significativamente por la interacción de los factores con una P>0.34 (Cuadro 6).

La producción de **glucosa** fue afectada significativamente (P=0.004) por la interacción de la concentración de H₂SO₄ y temperatura pero fue la concentración de ácido lo produjo mayor efecto significativo con un valor F de 206 (Cuadro 6). El Cuadro 7 demuestra el nivel de efecto que produjo las combinaciones de factores temperatura y concentración de H₂SO₄. Por ejemplo, a 110°C el aumento en concentración de ácido de 2 a 6% produjo un incremento significativo (P=0.0006 y valor t= -8.9) en concentración de glucosa y a 130°C el cambio de 2 a 6% produjo un incremento significativo de P<0.0001 y t= -18.5. Así mismo con 4% H₂SO₄ el incremento en temperatura de 110°C a 130°C produjo un incremento en producción de azúcares pero en menor medida (P=0.0006 y T= -10).

Cuadro 6. Análisis de varianza en los azúcares producidos por el pretratamiento ácido diluido en aserrín de *Pinus oocarpa*.

Azúcar	Fuente de variación	G.L. ^{&}	Valor F	P<0.05*
Glucosa	Temperatura	1	117.1	0.0004
	% H ₂ SO ₄	2	205.6	0.0001
	Temperatura*% H ₂ SO ₄	2	29.7	0.0040
Galactosa	Temperatura	1	44.5	0.0026
	% H ₂ SO ₄	2	193.4	0.0001
	Temperatura*% H ₂ SO ₄	2	2.2	0.2252
Manosa	Temperatura	1	3.9	0.1205
	% H ₂ SO ₄	2	63.4	0.0009
	Temperatura*% H ₂ SO ₄	2	1.4	0.3430
Azúcares totales	Temperatura	1	52.2	0.0019
	% H ₂ SO ₄	2	216.4	<0.0001
	Temperatura*% H ₂ SO ₄	2	8.5	0.0365

[&] G.L. Grados de Libertad.

* Probabilidades significativas a <0.05.

Cuadro 7. Interacción entre temperatura y concentración de ácido sulfúrico de los pretratamientos en *Pinus oocarpa* para la obtención de glucosa.

Interacciones	Valor t	P< t [§]
110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 110°C, 6% H ₂ SO ₄	-9.8	0.0006
110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄	-10.0	0.0006
110°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄	-18.5	<0.0001
110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 110°C, 6% H ₂ SO ₄	-9.8	0.0006
110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄	-10.0	0.0006
110°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄	-18.5	<0.0001
110°C, 6% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 2% H ₂ SO ₄	9.8	0.0006
110°C, 6% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄	-8.7	0.0010
130°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 4% H ₂ SO ₄	-10.0	0.0006
130°C, 2% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄	-18.5	<0.0001
130°C, 4% H ₂ SO ₄ vs. 130°C, 6% H ₂ SO ₄	-8.5	0.0011

[§] |t| prueba t-student

La hidrólisis de la celulosa y su consecuente liberación de glucosa inició a partir de los pretratamientos 130°C con 4% H₂SO₄ y 110°C con 6% H₂SO₄, mientras que el resto de los pretratamientos no produjo efecto significativo sobre ello (Cuadro 8). La celulosa fue hidrolizada con el pretratamiento más fuerte debido a que ésta puede hidratarse mediante el uso soluciones ácidas o alcalinas concentradas y reducirse hasta unidades de glucosa, gracias sus grupos OH que le confieren la facultad de hidratarse y deshidratarse. La estructura lineal y grado de cristalinidad que posee son la razón de su alta resistencia e insolubilidad con el agua (García *et al.* 2003). Por eso no pudo ser hidrolizada con los pretratamientos de baja temperatura y concentración de ácido.

Cuadro 8. Producción de azúcares del *Pinus oocarpa* pretratado con ácido sulfúrico diluido.

Pretratamiento	Glucosa (mg/g) ±DE ^{&}	Manosa (mg/g) ± DE	Galactosa (mg/g)± DE	Azúcares totales (mg/g) ± DE
6% H ₂ SO ₄ , 130°C	78.4 ^a ± 2.2	122.7 ^a ± 1.1	201.1 ^a ± 1.9	402.1 ^a ± 2.5
4% H ₂ SO ₄ , 130°C	54.0 ^b ± 2.3	112.7 ^{ab} ± 3.5	174.6 ^{ab} ± 3.4	341.3 ^b ± 7.8
6% H ₂ SO ₄ , 110°C	53.3 ^b ± 7.2	110.5 ^{ab} ± 7.0	162.5 ^{bc} ± 9.7	326.3 ^b ± 23.7
4% H ₂ SO ₄ , 110°C	nc [§]	99.1 ^b ± 3.5	135.2 ^c ± 5.5	234.4 ^c ± 8.9
2% H ₂ SO ₄ , 130°C	nc	62.4 ^c ± 16.5	80.3 ^d ± 19.5	142.6 ^d ± 35.7
2% H ₂ SO ₄ , 110°C	nc	64.0 ^c ± 5.1	62.6 ^d ± 11.9	126.6 ^d ± 16.0

[&] DE: Desviación Estándar.

^{a-d} Medias con diferente letra son significativamente diferentes (P< 0.05).

[§] nc: no cuantificado, se detectó en concentraciones inferiores al límite de detección (55 mg/g MS).

Galactosa. La concentración de galactosa fue afectada significativamente por la temperatura de digestión (P=0.0026) y la concentración de ácido (P=0.0001), sin embargo, la interacción entre ambas variables no fue significativa (P=0.2252), (Cuadro 6). La concentración de galactosa aumentó en la medida en que incrementó la concentración de ácido sulfúrico, en el Cuadro 9 se demuestra que a 2% H₂SO₄ se obtuvo 72.4 mg/g MS mientras que a 4% H₂SO₄ se obtuvo 154.9 mg/g MS, así mismo incrementó en función de la temperatura, pero en menor proporción (Cuadro 10).

Cuadro 9. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico del pretratamiento en *Pinus oocarpa* para la producción de azúcares.

H ₂ SO ₄ (%)	Manosa (mg/g MS)	Galactosa (mg/g MS)
6	116.6 ^a	181.8 ^a
4	105.9 ^a	154.0 ^b
2	63.2 ^b	72.4 ^c

^{a-c} Medias con diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05).

Cuadro 10. Efecto de la temperatura de pretratamiento en *Pinus oocarpa* para la producción de azúcares.

Temperatura (°C)	Manosa (mg/g MS)	Galactosa (mg/g MS)
130	99.3 ^x	152.0 ^x
110	91.2 ^x	120.1 ^y

^{x-y} Medias con diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05).

La Figura 3 demuestra el comportamiento de la producción de galactosa en función de la concentración de ácido sulfúrico utilizado y la temperatura de pretratamiento. El Cuadro 8 presenta la separación de medias Tukey en producción de galactosa, en el cual se puede observar que los pretratamientos que produjeron mayor cantidad de galactosa significativamente fueron 130°C con 4% H₂SO₄ y con 6% H₂SO₄. Por lo tanto, mediante el pretratamiento 130°C con 4% H₂SO₄ se consiguió la hidrólisis total de la galactosa, debido a que a 130°C el incremento de 4 a 6% de H₂SO₄, no produjo efectos significativos.

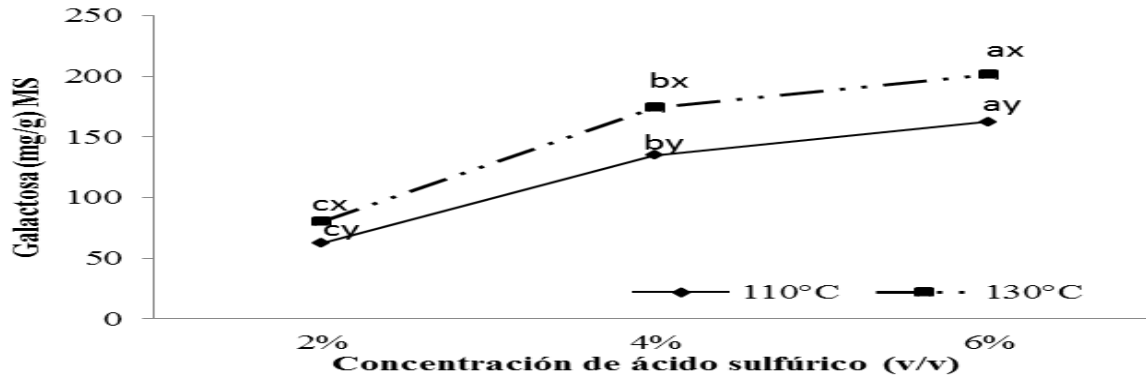


Figura 3. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico y temperatura en la producción de galactosa a partir del pretratamiento en *Pinus oocarpa*.

La concentración de la **manosa** fue afectada significativamente ($P=0.0009$) por la concentración de ácido, sin embargo, la temperatura de pretratamiento, y la interacción de ambos factores no produjo un efecto significativo ($P>0.1205$), Cuadro 6. Esto significa que la producción de manosa no se ve afectada significativamente por el cambio en temperatura (Cuadro 10). Partiendo de estos resultados se puede concluir que la manosa es el azúcar más fácil de hidrolizar en la matriz de pino, y que se pudo hidrolizar totalmente con los pretratamientos 110°C con 6% H_2SO_4 y 130°C con 4% H_2SO_4 , produciendo 110.5 y 112.7 mg/g MS, respectivamente (Cuadro 8). El cálculo de producción de manosa se realizó con la ecuación de la glucosa (por su similar estructura), ya que no se contó con la curva de calibración de la manosa. La Figura 4 ilustra el comportamiento de la manosa en función de la temperatura y concentración de ácido.

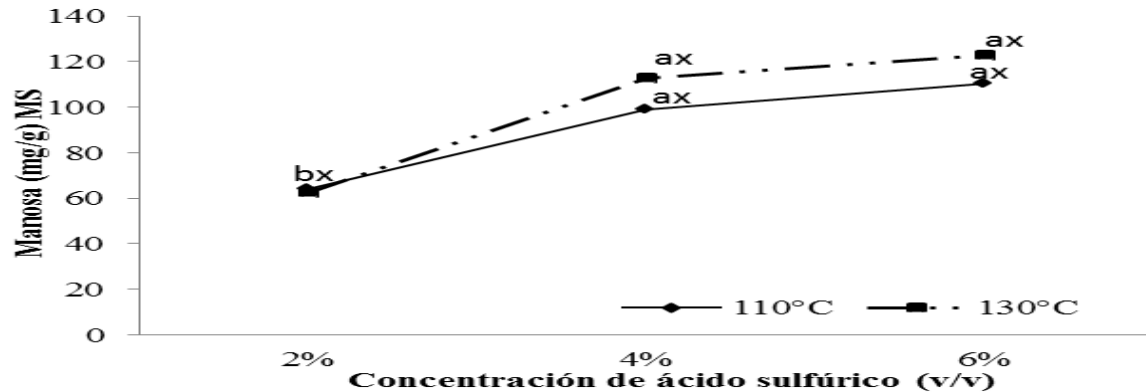


Figura 4. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico y temperatura en la producción de manosa a partir del pretratamiento en *Pinus oocarpa*.

La hidrólisis total de la hemicelulosa (galactomananos) se obtuvo a partir de los pretratamientos 110°C con 6% H_2SO_4 y 130° con 4% H_2SO_4 (Cuadro 8). La hemicelulosa fue hidrolizada con mayor facilidad que la celulosa por su estructura ramificada y de cadenas cortas, lo que la hace más amorfa, así también su grado de polimerización es menor con relación a la celulosa. Es por ello que la extracción de hemicelulosa de la pared celular se hace con soluciones ácidas o alcalinas muy diluidas (García *et al.* 2003).

Azúcares totales. La concentración de azúcares totales en el hidrolizado fue afectada significativamente por la temperatura del pretratamiento ($P < 0.01$), la concentración de ácido ($P < 0.01$) y la interacción temperatura por ácido ($P < 0.05$), siendo la concentración de ácido la que produjo mayor efecto significativo sobre la producción de azúcar (Cuadro 6). El Cuadro 11 muestra que a 110°C un incremento en la concentración de ácido de 2 a 4% produjo un aumento significativo ($P = 0.0025$) en la producción de azúcares y de 2 a 6% incrementó con $P = 0.0002$, el grado de diferencia se ve reflejado en el valor t -6.77 y -13.43, respectivamente. Así también el incremento en temperatura con igual concentración de ácido produjo un aumento significativo ($P < 0.05$) en producción de azúcares, pero en menor proporción.

Cuadro 11. Interacción entre temperatura y concentración de ácido sulfúrico de los pretratamientos en *Pinus oocarpa* para la obtención de azúcares totales.

Interacciones	Valor t	$P < t ^{\S}$
110°C , 2% H_2SO_4 vs. 110°C , 4% H_2SO_4	-6.8	0.0025
110°C , 2% H_2SO_4 vs. 110°C , 6% H_2SO_4	-12.6	0.0002
110°C , 2% H_2SO_4 vs. 130°C , 4% H_2SO_4	-13.5	0.0002
110°C , 2% H_2SO_4 vs. 130°C , 6% H_2SO_4	-17.3	< 0.0001
110°C , 4% H_2SO_4 vs. 110°C , 6% H_2SO_4	-5.8	0.0044
110°C , 4% H_2SO_4 vs. 130°C , 2% H_2SO_4	5.8	0.0045
110°C , 4% H_2SO_4 vs. 130°C , 4% H_2SO_4	-6.7	0.0025
110°C , 4% H_2SO_4 vs. 130°C , 6% H_2SO_4	-10.6	0.0005
110°C , 6% H_2SO_4 vs. 130°C , 2% H_2SO_4	11.5	0.0003
110°C , 6% H_2SO_4 vs. 130°C , 6% H_2SO_4	-4.8	0.0088
130°C , 2% H_2SO_4 vs. 130°C , 4% H_2SO_4	-12.5	0.0002
130°C , 2% H_2SO_4 vs. 130°C , 6% H_2SO_4	-16.3	< 0.0001
130°C , 4% H_2SO_4 vs. 130°C , 6% H_2SO_4	-3.8	0.0186

^{\S} |t| prueba t-student

Este estudio se realizó paralelo al de Núñez (2011), quien mediante el método de Somogyi Nelson evaluó el efecto de la concentración de ácido sulfúrico y temperatura sobre la producción de azúcares totales a partir de aserrín de *Pinus oocarpa*. El pretratamiento que produjo mayor cantidad de azúcares fue 6% H_2SO_4 a 130°C (Cuadro 8), con el cual se hidrolizó el 100% de la hemicelulosa y a la vez produjo la hidrólisis parcial de la celulosa (16%), similar a los resultados de Núñez (2011), que con el mismo pretratamiento consiguió la hidrólisis del 99.99% de la hemicelulosa y del 17.7% de la celulosa.

La producción de azúcares totales a partir de la matriz de *P. oocarpa* fue de 402 mg/g MS, (a 130°C con 6% H_2SO_4 , mejor pretratamiento), más arabinosa detectada bajo el nivel de cuantificación < 55 mg/g MS. Estos resultados son similares a los obtenidos por Rosero (2008) en fibra de palmito (*Bactris gasipaes*), con el pretratamiento ácido diluido (0.5% H_2SO_4 a 145°C por 1 h, mejor tratamiento) obtuvo rendimientos de 437 mg/g de fibra. Al compararlos resultados obtenidos en este estudio del análisis de azúcares por el HPLC con los de Núñez (2011) que obtuvo una producción de azúcares reductores de 52.5% por

el método de Nelson Somogyi, se concluye que hubo diferencia en cuantificación de azúcares entre ambos métodos.

La Figura 5 es la representación gráfica del perfil de azúcares obtenido del pretratamiento de ácido diluido, la cual demuestra que la concentración de H_2SO_4 en combinación con la temperatura produjo un efecto creciente sobre la producción de azúcares. En cuanto a la producción de galactosa y manosa se puede observar que a $130^\circ C$ el cambio de 4% y 6% H_2SO_4 produjo efectos mínimos. Además se muestra que la arabinosa fue detectada en concentración inferior al límite de cuantificación (55 mg/g MS), para efectos demostrativos se colocó en la gráfica reportando 28 mg/g de MS (promedio de 0 y 55 mg/ml).

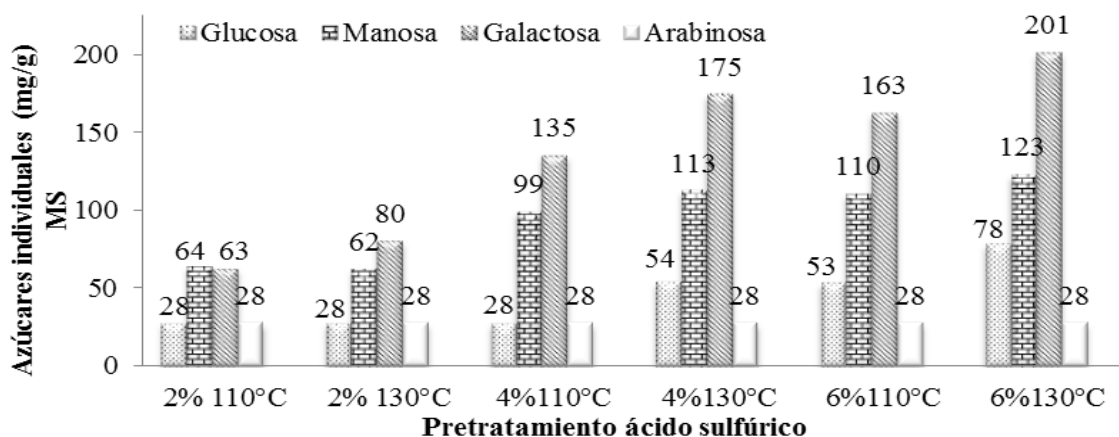


Figura 5. Producción de azúcares del pretratamiento ácido diluido en *Pinus oocarpa*.

La Figura 6 es el cromatograma obtenido del pretratamiento 6% H_2SO_4 a $130^\circ C$ en *Pinus oocarpa*, con el HPLC 1100, detector IR, columna Hi- Plex Ca a $85^\circ C$. Se puede observar que la resolución del método fue baja en cuantificación de galactosa y manosa. Probablemente, ésto se debió a que el capilar que conectó la columna al detector fue muy largo (Supelco 1997), ya que para llevar la temperatura de columna a $85^\circ C$ se utilizó un baño maría lo que implicó aumentar la longitud del capilar. La galactosa se detectó en concentraciones menores al límite de detección debido a que la muestra se encontraba muy diluida (factor de dilución 110).

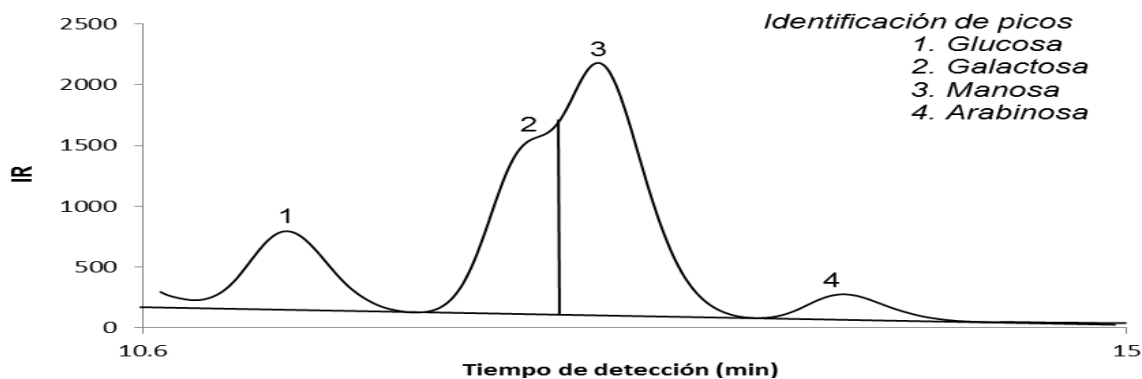


Figura 6. Perfil de azúcares del hidrolizado de *Pinus oocarpa*.

4. CONCLUSIONES

- Se calibró y validó preliminarmente el método de análisis de los azúcares fructosa, celobiosa, lactosa, glucosa y galactosa por HPLC con exactitud y precisión óptima.
- Con el pretratamiento ácido diluido en *Pinus oocarpa* se obtuvo el perfil de azúcares que incluyó glucosa, manosa, galactosa y arabinosa.
- El pretratamiento que produjo mayor cantidad de azúcares fue 6% H₂SO₄ a 130°C.
- Los pretratamientos 130°C con 6% H₂SO₄ y con 4% H₂SO₄ produjeron la hidrólisis total de la hemicelulosa y parcial de la celulosa.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar la calibración y validación interna del método con todos los azúcares estándares incluidos dentro del rango de detección de la Columna Hi Plex Ca 300 × 7.7 mm 8 µm.
- Para obtener resultados de alta resolución en muestras que contengan sacarosa y lactosa se recomienda hacer un proceso de hidrólisis previo al análisis, esto con el fin de separarlas en sus monómeros glucosa, fructosa y galactosa.
- Utilizar el “Thermostatted Column Compartment” G1316B SL para evitar variaciones en temperatura de columna y con ello obtener resultados con un nivel de precisión de CV <1%.
- Para la conexión de la columna al detector se recomienda utilizar un capilar de la menor longitud posible, ya que esto contribuye a mejorar la resolución del método.
- Utilizar bajos factores de dilución en la extracción del hidrolizado de material lignocelulósico para inyectar el compuesto más concentrado y obtener resultados de mayor resolución del HPLC.
- Calibrar y validar el método de medición de 5 hidoximetil-furfural, ácido levulínico y ácido fórmico.
- Evaluar el efecto de hidrólisis con ácido concentrado y enzimática en la torta de aserrín de *P. oocarpa* sobre la producción de azúcares.

6. LITERATURA CITADA

Agilent Technologies, 2006. Agilent 1200 Series Refractive Index Detector, User manual. Germany. 104 p.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists, EUA). 2006. Glucose, Fructose, Sucrose, and Maltose in Presweetened Cereals Liquid by Chromatographic Method, AOAC982.14. EUA. 1 p.

ASTM (American Society for Testing Materials, EUA). 2007. Standard Test Method for Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography, ASTM E1758-01. EUA. 5 p. Consultado el 3 de oct. 2011. Disponible en: <http://www.astm.org/Standards/E1758.htm>

Casas, L; Cabrera, V. y Fajardo, R. 2001. Determinación de azúcares reductores en miel por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Centro Azúcar 2/2001. Universidad Central de Las Villas, Santa Marta, Cuba. 6 p.

Cortínez, V. 2010. Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos. Tesis Mag. Sc., Universidad de Chile. 122 p.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2011. Forestal (en línea). FAOSTAT. Consultado el 7 de oct. 2011. Disponible en: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=626&lang=es#ancor>

García, E; Casasús, A; Oramas, C. y Palacios, P. 2003. La Madera y su Anatomía: Pared Celular. Madrid. Primera edición, Madrid, Mundi-Prensa Libros. 355 p.

González , G. y Castellanos, O. 2003. Alternativas de modificación del método de Somogyi Nelson para la determinación de azúcares reductores a partir de sus posibilidades químicas. Revista Ingeniería e Investigación. N° 52, Julio, 2003. Universidad Nacional de Colombia. 13 p .

Gratzfeld, A. y Schuster, R. 2001. HPLC for Food Analysis. Germany, Agilent Technologies. 146 p.

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

Lloyd, L. 2008. The HPLC determination of carbohydrates in food and drinks, Application Note SI-01407. EUA, Agilent Technologies. 2 p.

Mendes, C; Rocha, J; Sousa, G. y Carvalho, M. 2010. XXI TECNICELPA Conference and exhibition, VI CIADICYP, 2010, Lisbon. Extraction of hemicelluloses prior to Kraft cooking: a step for an integrated biorefinery in the pulp mill. University of Coimbra and Research Institute of Forestry and Paper, Portugal. 8 p.

Núñez, M. 2011. Efecto de la temperatura y concentración de ácido sulfúrico en el pretratamiento de digestión de aserrín de pino (*Pinus oocarpa*) para la producción de etanol lignocelulósico. Tesis Lic. Ing. Agr. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 61 p.

REN21 (Renewable Energy Policy Network for the 21st Century), 2011. Renewable 2011 Global Status Report. Paris. REN21 Secretariat. Consultado el 3 de oct. 2011. Disponible en: http://www.ren21.net/Portals/97/documents/GSR/REN21_GSR2011.pdf

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

Supelco, 1997. Guía práctica para localizar fallas en HPLC. Boletín 826A. EUA. 20p.

Syed, S. 2011. Determining total sugar content in maple syrup to meet FDA nutrition labeling requirements. Application Note 5990-7935 EN. India, Agilent Technologies. 8 p.

Varian Inc., 2010. Hi-Plex Ligand Exchange HPLC Columns for Carbohydrates, Alcohol and Organic Acids, Data Sheet. EUA. 12 p.

7. ANEXOS

Anexo 1. Concentraciones de azúcar utilizadas en la solución estándar para la validación del método de análisis de azúcar por HPLC

Estándar	[] Teórica (ppm)	[] Real(ppm ^{&})			
		Rep.1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4
Celobiosa	882.0	898.3	897.3	900.5	900.4
Lactosa	990.0	1,007.1	1,006.4	1,000.8	1,002.0
Glucosa	398.0	398.8	401.9	397.7	399.9
Galactosa	693.0	703.8	701.1	698.1	707.7
Fructosa	297.0	302.6	301.7	299.6	302.0

[] Concentración

& ppm: parte por millón

Anexo 2. Costos variables para la calibración y validación del método de análisis de azúcar por HPLC

Material	Costo(\$)
Columna Hi-Plex Ca 300 × 7.7 mm, 8 μm	1000.0
Precolumna 7.7 × 50 mm	305.0
“Guard cartridge column” 3 × 0.5 mm	177.0
Filtros de jeringa Econofiltros 0.45 μm	147.0
Capilar Peek 0.007’’ id	95.8
Agua grado cromatografía Merk	150.0
Consumibles (Jeringas, viales guantes, papel cera y papel filtro)	42.0
Azúcares estándares (Sigma Aldrich)	143.8
Total ^{&}	2060.6

& No incluye el costo de mano de obra.