



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE INGENIERÍA

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE HEMICELULOSAS PROVENIENTES DE MADERA DE EUCALIPTO

Autor: Ing. Quím. María Noel Cabrera, MSc.

Programa de Doctorado en Ingeniería Química

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

2021



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE INGENIERÍA

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE HEMICELULOSAS PROVENIENTES DE MADERA DE EUCALIPTO

María Noel Cabrera

Tesis de Doctorado presentada al Programa de Posgrado en Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Doctora en Ingeniería Química.

Directores:

Prof. Dra. María Cristina Area
Prof. Dr. Fernando Esteban Felissia

Instituto de Materiales de Misiones (IMAM)
Universidad Nacional de Misiones (UNaM)
**Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y
Técnicas (CONICET) - Argentina**

ISSN 1688-2776

María Noel Cabrera

Tesis de Doctorado en Ingeniería Química

Facultad de Ingeniería

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay, 2021.

"Un cinturón negro es un cinturón blanco que nunca se rindió"

(Academia de Taekwondo de mi hijo Gabriel)

*... Pero aquí abajo, abajo
cerca de las raíces
es donde la memoria
ningún recuerdo omite
y hay quienes se desmueren
y hay quienes se desviven
y así entre todos logran
lo que era un imposible
que todo el mundo sepa
que el Sur,
que el Sur también existe*

(Mario Benedetti)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis Directores de Tesis, Cristina y Fernando, quienes aceptaron dirigir esta tesis casi sin conocerme. Por todo su apoyo, enseñanzas, comentarios, correcciones y, en fin, por ayudar a que este trabajo saliera adelante les digo “Gracias”.

Agradezco a los miembros del tribunal por aceptar evaluar esta Tesis, por su predisposición y tiempo.

A mis Directores Académicos, Patricia Gerla y Andrés Dieste, no solo por el soporte en los estudios de Doctorado, sino por su apoyo y confianza.

A mis compañeros del Grupo de Ingeniería de Procesos Forestales, a los actuales y a los que han seguido otros caminos. Saben que los tengo presente a todos, por las charlas, discusiones y por todo el tiempo que hemos estado juntos.

Del mismo modo al resto de mis compañeros del IIQ, por estar, preguntar y motivarme a realizar esta Tesis.

A LATU, Fundación Latitud, ANCAP, ANII y UPM por, de diversas formas, ayudar a la realización de este trabajo.

Al sistema de enseñanza público de este país que me permitió realizar toda mi formación académica (escuela, liceo, facu, master y doctorado). Particularmente a la Universidad de la República por permitir desarrollarme como docente e investigador en esta gran institución.

A mis padres por siempre empujarme a seguir.

A mis amigos.

Y fundamentalmente a Javier y Gabriel, por apoyarme en este desafío y por todos los minutos familiares robados para poder concretar este trabajo.

¡GRACIAS!

RESUMEN

En el presente trabajo de Tesis se estudiaron distintas formas de extracción de hemicelulosas provenientes de eucalipto, así como diferentes métodos de purificación y concentración de las hemicelulosas extraídas y se caracterizaron las mismas.

Se escogió como biomasa a utilizar la madera de eucalipto, ya que es un material que existe de forma abundante en Uruguay y que presenta perspectivas ciertas de crecimiento, mantenimiento y explotación de las hectáreas actualmente plantadas a mediano y largo plazo. Actualmente el eucalipto se utiliza para la producción de pulpa de celulosa y de tablas y chapas en aserraderos, generando un residuo que, hoy en día es quemado en calderas de biomasa para la generación de vapor y energía. Se considera que la utilización de este residuo para la producción de productos de mayor valor agregado, en el marco de una biorrefinería lignocelulósica, puede ser muy atractiva.

Las hemicelulosas de eucalipto se componen mayoritariamente de *O*-acetil-4-*O*-metilglucorono- β -D-xilano, normalmente denominados glucoronoxilanos o xilanos.

En este trabajo se ensayaron en primera instancia diversas formas de extracción de estos xilanos de la matriz lignocelulósica. Particularmente se trabajó con pretratamientos con agua (pretratamiento hidrotérmico con agua caliente y pretratamiento por explosión a vapor) y alcalinos (pretratamiento con licor verde, con hidróxido de sodio y con hidróxido de sodio y peróxido de hidrógeno). Todos estos tratamientos se realizaron sobre residuos industriales de eucalipto, a excepción del tratamiento con licor verde, donde se analizó la pre-extracción de hemicelulosas sobre chips, previo a su pulpeo en el marco de una planta de celulosa Kraft.

Del estudio de la preextracción con licor verde se buscaron las mejores condiciones de preextracción de xilosacáridos procurando no alterar los rendimientos ni las propiedades papeleras de la pulpa producida con los chips preextraídos.

Con la realización del tratamiento hidrotérmico con agua caliente se buscó maximizar la extracción de xilooligosacáridos (XOS), minimizando la extracción de compuestos fenólicos, dado que son los contaminantes a priori más difíciles de remover en la purificación de los licores extraídos. Se ajustaron los diseños experimentales, se determinaron las distribuciones de pesos moleculares de diferentes muestras a lo largo del diseño y se ajustaron los datos experimentales a modelos cinéticos.

Se ensayó el pretratamiento de explosión de vapor a tres temperaturas de trabajo en el rango 180 a 200 °C. Se evaluaron las mejores condiciones para la obtención de XOS o xilosa en el líquido extraído.

Con los pretratamientos alcalinos se buscó extraer xilanos de alto peso molecular, que posteriormente fueran factibles de ser utilizados en la producción de biofilms o biogeles. Se consideró como las condiciones más adecuadas de pre-extracción, aquellas que maximizaran la cantidad de xilanos extraídos y minimizaran el contenido de compuestos fenólicos en la solución.

El tratamiento alcalino reforzado con peróxido de hidrógeno fue ensayado en dos rangos de condiciones, una considerada de baja-moderada carga de químicos, condiciones utilizadas para el pulpeo semiquímico, y en condiciones más fuertes de extracción dadas por la carga de químicos y mayor tiempo de reacción, normalmente utilizadas para aumentar la accesibilidad a la celulosa en un posterior tratamiento enzimático.

Como métodos de purificación y concentración se evaluó la precipitación con solventes orgánicos, el uso de resinas de adsorción e intercambio iónico y la utilización de membranas de micro y ultrafiltración.

La precipitación con solventes se ensayó en los licores provenientes del tratamiento hidrotérmico con agua caliente y el tratamiento alcalino. Se trabajó con etanol, metanol, isopropanol y dioxano. Se evaluó como afecta la diferente relación de volumen de solvente: volumen de licor, al porcentaje de sólidos que precipita y a la composición del precipitado formado. Se evaluó la precipitación trabajando en diferentes condiciones de precipitación (agitado o no agitado, diferentes pH) y sedimentación (temperatura ambiente o 4 °C). Se analizó la composición química y se hizo el espectro FTIR-ATR de los precipitados más relevantes obtenidos.

Se ensayó también la precipitación con etano y dioxano sobre los licores provenientes del tratamiento con hidróxido de sodio. En este caso se analizó como varía el rendimiento y características de los precipitados obtenidos agregando el solvente de precipitación a diferentes pH (pH del licor, 9, 7, 5 y 2), así como variando la relación de volumen de solvente a volumen del licor. Se analizó también las características de los precipitados formados al utilizar diferentes ácidos como agentes de ajuste de pH. Se determinó la composición química y el espectro FTIR-ATR de los precipitados más relevantes, así como la distribución del peso molecular de los xilosacáridos que los componen.

Con el fin de purificar y concentrar los xilosacáridos de los licores de explosión de vapor, se utilizaron resinas de intercambio aniónico fuertes y débiles y resinas de adsorción. Se determinaron secuencias y condiciones de uso, particularmente a diferentes pH y se evaluó la composición del eluido y aguas de lavado de las resinas.

Se ensayaron diferentes estrategias con membranas de micro y ultrafiltración de diferentes materiales, para la concentración y purificación de licores de eucalipto provenientes de tratamientos de explosión de vapor y alcalino.

Maximizando la producción de XOS en el tratamiento hidrotérmico con agua caliente y minimizando la presencia de grupos fenólicos en extracto, se logró extraer un 9,5 % b.m.s. de los xilosacáridos (68 % de los xilosacáridos presentes en la biomasa), encontrándose el 7,2 % b.m.s. como XOS. Estos valores se obtuvieron realizando el pretratamiento a 165 °C durante 60 minutos.

Con el tratamiento con explosión de vapor se logró una remoción de entre 60 y 80 % de los xilanos presentes en la biomasa original. Dependiendo la intensidad del tratamiento, los mismos están como XOS (en las intensidades más bajas) o como monómero y XOS de bajo grado de polimerización a la mayor temperatura de trabajo.

Con los pretratamientos alcalinos se encontró que las mejores condiciones a aplicar correspondieron a una temperatura de 105 °C y carga de soda de 16,7 % b.m.s., no afectando significativamente el tiempo de extracción en el rango estudiado (45 a 135 minutos). En este caso se logró remover el 2,3 % de xilosacáridos (b.m.s.), lo que corresponde al 15,6 % de los xilosacáridos presentes en la madera original. El peso molecular del material precipitado con etanol tuvo un Mw de aproximadamente 30.000 Da, lo que indica un polímero en principio apropiado para la producción de biofilms o biogeles.

De los ensayos de precipitación con solventes se encontró que el mejor solvente de precipitación es el etanol. El aspecto físico de los precipitados es de un sólido pardo-negro y su contenido de xilosacáridos fue de alrededor de 40-50%. Del análisis de FTIR-ATR de los precipitados se confirmó la presencia de xilanos u xilooligosacáridos, estando estos contaminados por fragmentos de lignina.

La utilización de resinas de adsorción y de intercambio aniónico permitieron la purificación de los licores provenientes del tratamiento por explosión con vapor. Particularmente, la resina aniónica débil utilizada (Dowex 66) arrojó muy buenos resultados en términos de remoción de compuestos fenólicos (mayor a 80 %) y ácidos alifáticos (mayor a 90 %), con una muy baja retención de xilosacáridos.

La utilización de membranas de microfiltración y ultrafiltración fue exitosa para separar los xilanos en la solución, pero no en términos de separar los xilanos de los compuestos fenólicos en los licores alcalinos.

Con la realización de este trabajo de tesis fue posible establecer diferentes formas de extracción de los xilosacáridos que componen la biomasa de eucalipto, obtener diferentes productos de interés (xilanos, XOS o xilosa) dependiendo de las características y condiciones operativas del pretratamiento realizado y ensayar diferentes tecnologías de purificación y concentración de los productos obtenidos.

Palabras clave: xilanos, xilosacáridos, hemicelulosas, eucalipto, biorrefinerías forestales.

TABLA DE CONTENIDOS

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

REVISIÓN DE LITERATURA

1. BIORREFINERÍAS LIGNOCELULÓSICAS.....	1-1
1.1. Generalidades	1-1
2. BIOMASA LIGNOCELUÓSICA.....	2-1
2.1. Generalidades	2-1
2.2. Componentes de la biomasa lignocelulósica	2-3
2.2.1. Celulosa	2-3
2.2.2. Lignina	2-4
2.2.3. Hemicelulosas	2-6
2.2.4. Xilosacáridos.....	2-8
2.3. Estructura de la pared celular de madera.....	2-11
2.4. Enlaces lignina-carbohidratos	2-14
3. PRODUCTOS POSIBLES A PARTIR DE HEMICELULOSAS.....	3-1
3.1. Bioetanol.	3-2
3.2. Furfural	3-4
3.3. Xilitol.....	3-7
3.4. Xilooligosacáridos.....	3-10
3.5. Xilanos	3-15
3.5.1. Biofilms.....	3-15
3.5.2. Hidrogeles	3-19
3.5.3 Xilanos o derivados como modificadores de superficies.	3-22
4. MÉTODOS DE PRETRATAMIENTO DE LA BIOMASA LIGNOCELUÓSICA	4-1
4.1. Características del pretratamiento	4-1
4.2. Pretratamiento físico.....	4-3
4.3. Pretratamiento químico.	4-4
4.3.1. Pretratamiento ácido	4-5
4.3.2. Pretratamiento con agua a presión (hidrotérmico).	4-6
4.3.3. Pretratamiento por explosión de vapor	4-9
4.3.4. Pretratamientos alcalinos	4-10

4.3.5.	Otros pretratamientos químicos	4-13
4.3.6.	Proceso organosolv	4-13
4.3.7.	Pretratamiento con líquidos iónicos	4-14
4.4.	Pretratamiento biológico	4-16
5.	PROCESOS DE CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS HEMICELULOSAS.....	5-1
5.1.	Descripción general de los métodos utilizados en la bibliografía	5-1
5.2.	Precipitación con solventes.....	5-2
5.3.	Extracción con solventes (extracción líquido-líquido)	5-4
5.4.	Resinas de intercambio y de adsorción.....	5-9
5.5.	Membranas de micro, ultra y nanofiltración	5-16

PARTE EXPERIMENTAL

6.	PRETRATAMIENTOS: PRE-EXTRACCIÓN CON LICOR VERDE SOBRE CHIPS PREVIO AL PULPEO KRAFT	6-1
6.1.	Objetivos específicos	6-2
6.2.	Metodología	6-2
6.2.1.	Preparación y caracterización de la biomasa utilizada.	6-2
6.2.2.	Ensayos de extracción con licor verde	6-3
6.2.3.	Pulpeo Kraft de los chips extraídos	6-5
6.3.	Resultados y discusión	6-5
6.4.	Conclusiones.....	6-14
7.	PRETRATAMIENTOS: TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO.	7-1
7.1.	Objetivos específicos.....	7-1
7.2.	Metodología	7-1
7.2.1.	Preparación y caracterización del aserrín.	7-1
7.2.2.	Ensayos hidrotérmicos	7-2
7.2.3.	Análisis estadístico	7-4
7.3.	Resultados y discusión	7-4
7.3.1.	Ensayos preliminares.....	7-4
7.3.2.	Ensayos definitivos.	7-5
7.3.3.	Ajuste de los datos experimentales a modelos estadísticos.....	7-15
7.3.4.	Análisis de la distribución de pesos moleculares en los extractos obtenidos.	7-21
7.3.5.	Estudio de las cinéticas de hidrólisis de los compuestos de xilanos.	7-26
7.4.	Conclusiones sobre los tratamientos hidrotérmicos realizados	7-34

8. PRETRATAMIENTOS: EXPLOSIÓN DE VAPOR	8-1
8.1. Objetivos específicos	8-1
8.2. Metodología	8-1
8.2.1. Preparación y caracterización de la biomasa utilizada.	8-1
8.2.2. Descripción del reactor de explosión de vapor utilizado.	8-3
8.2.3. Tratamientos realizados	8-4
8.3. Resultados y discusión	8-4
8.4. Conclusiones.....	8-15
9. PRETRATAMIENTOS: TRATAMIENTO CON HIDRÓXIDO DE SODIO.....	9-1
9.1. Objetivos específicos.....	9-1
9.2. Metodología	9-1
9.2.1. Materia prima utilizada	9-1
9.2.2. Extracciones realizadas	9-2
9.2.1. Análisis estadístico	9-4
9.3. Resultados y discusión	9-5
9.3.1. Diseño factorial 3 ³	9-5
9.3.2. Balance masa de las mejores condiciones:	9-20
9.4. Conclusiones.....	9-22
10. PRETRATAMIENTOS: TRATAMIENTO CON HIDRÓXIDO DE SODIO : PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (NaOH : H₂O₂).....	10-1
10.1. Objetivos específicos.....	10-1
10.2. Metodología	10-1
10.2.1. Materia prima utilizada	10-1
10.3. Extracciones realizadas	10-1
10.4. Resultados y discusión	10-5
10.4.1. Serie A: Diseño factorial 3 ³ (inconcluso)	10-5
10.4.2. Serie B: Condiciones más exhaustivas de reacción (mayor carga de químicos y/o tiempo). 10-9	
10.5. Conclusiones.....	10-14
11. ENSAYOS DE PURIFICACION Y CONCENTRACIÓN: PRECIPITACIÓN CON SOLVENTES EN LICORES PROVENIENTES DEL TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO.....	11-1
11.1. Objetivos específicos.....	11-1
11.2. Metodología	11-1
11.3. Ensayos realizados.....	11-3
11.3.1. Precipitación utilizando etanol como solvente	11-3
11.4. Resultados y discusión	11-6
11.4.1. Caracterización química de los precipitados obtenidos.....	11-14

11.4.2.	Análisis de los precipitados obtenidos por FTIR-ATR	11-16
11.4.3.	Evaluación de distintos solventes	11-23
11.4.4.	Análisis del espectro FTIR-ATR de los precipitados obtenidos.....	11-25
11.5.	Conclusiones.....	11-28
12.	ENSAYOS DE PURIFICACION Y CONCENTRACIÓN: PRECIPITACIÓN CON SOLVENTES EN LICORES PROVENIENTES DE TRATAMIENTOS ALCALINOS.	12-1
12.1.	Objetivos específicos.....	12-1
12.2.	Procedimiento	12-1
12.2.1.	Ensayos realizados.....	12-2
12.3.	Resultados y discusión	12-7
12.3.1.	Precipitación con solventes a diferentes pH del extracto:.....	12-7
12.3.2.	Relación de volumen de solvente a volumen de licor conteniendo las hemicelulosas.....	12-12
12.3.3.	Precipitación escalonada.....	12-15
12.3.4.	Evaluación del pH de agregado de solvente - Incidencia del contenido inicial de lignina.	12-18
12.3.5.	Precipitación con solventes a distintos pH, utilizando ácidos sulfúrico y acético para el ajuste de pH	12-24
12.3.6.	Precipitación a diferentes pH utilizando dioxano como solvente.....	12-30
12.4.	Conclusiones.....	12-35
13.	ENSAYOS DE PURIFICACION Y CONCENTRACIÓN: RESINAS DE INTERCAMBIO	13-1
13.1.	Objetivos específicos.....	13-1
13.2.	Procedimiento	13-1
13.2.1.	Licores utilizados	13-1
13.2.2.	Ensayos con resinas.....	13-4
13.2.3.	Análisis realizados.	13-6
13.3.	Resultados y discusión.	13-7
13.3.1.	Ensayos 1.1 y 1.2.	13-7
13.3.2.	Ensayo 2	13-12
13.3.3.	Ensayos 3.1 y 3.2	13-14
13.3.4.	Ensayo 4.1 y 4.2.....	13-15
13.3.5.	Ensayo 5.1 y 5.2.....	13-18
13.3.6.	Ensayos 6.1 y 6.2.	13-22
13.3.7.	Ensayo 7	13-24
13.3.8.	Ensayo 8	13-25
13.4.	Conclusiones.....	13-27

14. ENSAYOS DE PURIFICACION Y CONCENTRACIÓN: ENSAYOS CON MEMBRANAS DE FILTRACIÓN	14-1
14.1. Objetivos específicos.....	14-1
14.2. Metodología	14-1
14.2.1. Descripción del equipamiento utilizado.....	14-1
14.2.2. Acondicionamiento de membranas previo a su uso y almacenamiento	14-2
14.2.3. Análisis realizados.	14-2
14.2.4. Cálculos realizados.	14-3
14.3. Ensayos realizados sobre el extracto proveniente del tratamiento de explosión a vapor	14-3
14.4. Ensayos realizados sobre el extracto proveniente del tratamiento con hidróxido de sodio	14-10
14.4.1. Experiencia alcalino a).....	14-13
14.4.2. Experiencia alcalino b).....	14-13
14.4.3. Experiencia alcalino c).....	14-17
14.4.4. Experiencia alcalino d).....	14-18
14.4.5. Experiencia alcalino e-f)	14-19
14.4.6. Experiencia alcalino g).....	14-21
14.4.7. Experiencia alcalino h).....	14-23
14.4.8. Purificación con membranas de los precipitados obtenidos al agregar etanol al licor alcalino	14-24
14.5. Conclusiones.....	14-38

CONCLUSIONES GENERALES

BIBLIOGRAFÍA

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA -

CONTEXTO DE LA INDUSTRIA FORESTAL EN URUGUAY.

A partir de la aplicación de la Ley N° 15.939 en el año 1987 (llamada también “Nueva Ley Forestal” o “Ley Forestal”) las plantaciones de bosques de alto rendimiento han crecido sosteniblemente. En el año 1988 existían 32.000 ha de bosques plantados y para el año 2018 ocuparon una superficie efectiva de 1.000.190 ha plantadas, lo que representa el 6 % del área total nacional. De esta área, el 78 % corresponde al género Eucalipto (principalmente a *Eucalyptus grandis* (27 %) y *Eucalyptus dunnii* (22 %)), mientras que las plantaciones de pino (principalmente *Pinus elliottii* y *Pinus taeda*) componen el 22 % remanente (MGAP-DGF, 2019).

La Figura indica el destino de la madera extraída de los bosques en el año 2019.



Figura 1. Extracción de Madera en Rollo 2019 por destino, principales rubros. Tomada de (Boscan and Boragno, 2020).

El PBI del sector forestal en 2019 representó el 3,6 % del PBI del país. La pulpa de celulosa es actualmente el tercer rubro de exportación, estimándose que será el primer rubro de exportación en los próximos años (Uruguay XXI, 2017). Respecto a las cadenas industriales productivas, en la actualidad hay dos cadenas principales de transformación de la madera: la cadena celulósica y la industria del aserrío. La cadena celulósica consta actualmente de dos plantas que producen cada una 1,3 millones de toneladas (ADt) de pulpa Kraft blanqueada de eucalipto por año. Una tercera planta con una capacidad de diseño de 2,1 millones de toneladas (ADt) del mismo producto está en construcción, planificada para comenzar a operar en 2023, (Estudio Forestal Faroppa, 2017). Esto representa actualmente un consumo anual de 9,5 millones de m³ de madera sólida sin corteza y se incrementará a 16,5 millones de m³ de madera

sólida sin corteza, una vez que las 3 plantas estén funcionando a capacidad total. Por su parte, el sector de transformación mecánica de la madera consta de 72 aserraderos ubicados a lo largo del país, que procesan pino o eucalipto. Cuatro de estos aserraderos son de mediano porte y el resto de porte menor. El consumo de madera rolliza de eucalipto (principalmente *Eucalyptus grandis* entre 18 y 24 años de edad) es de alrededor de 640.000 m³ anuales (Estudio Forestal Faroppa, 2017).

Considerando que una densidad media de la madera de 500 kg/m³ y que el 1% de la madera que entra a planta de celulosa se pierde como rechazo de finos (pinchips) en el proceso de chipeado, se puede estimar que entre las 3 plantas de celulosa se generarán anualmente 82.500 toneladas de pinchips. Hoy en día, una de las plantas de celulosa cuenta con caldera de biomasa, por lo que este residuo es quemado para la generación de energía y la otra planta lo vende a calderas de biomasa para el mismo fin.

El sector de aserrado tiene rendimientos de proceso de entre 50 y 70 % de la madera inicial, generándose entonces un residuo que ronda el 30 a 50 % de la madera que ingresa a planta. La fracción de mayor tamaño de este residuo (polines, tablas descartadas, costaneros) hoy en día es chipeada y se vende a las plantas de producción de celulosa o es quemada (junto con el aserrín de mayor tamaño) para la generación de vapor y energía en calderas de biomasa. Esta operación se realiza en el propio aserradero o el residuo se vende, dependiendo de su tamaño (Dieste *et al.*, 2019).

Los anteriores son residuos que se originan en la industrialización de la madera y por tanto son fácilmente localizables y están disponibles. Otro residuo por considerar, más difícil de localizar y cuantificar, son los residuos que quedan en las plantaciones, luego de las operaciones de raleo, poda o cosecha (ramas, descartes, etc.).

Por otro lado, en los últimos 10 años, Uruguay ha cambiado drásticamente su matriz energética, alcanzando la energía hidroeléctrica, eólica y solar una capacidad instalada del 78 % de la capacidad instalada total de generación. La generación de energía por biomasa es del 9 %, siendo principalmente generada por la combustión de licor negro en las plantas de celulosa (Oficina de Planeamiento y Presupuesto-Dirección de Planificación, 2019). Este cambio en la estructura de la matriz energética ha hecho que los precios de los contratos de venta de energía hayan bajado sensiblemente y más aún para aquellos generadores sin contrato fijo y que cobran por el precio del mercado “SPOT” del momento, como lo son varios de los generadores con calderas de biomasa. Particularmente para estos últimos, la generación de energía ha dejado de ser una solución interesante para estos residuos.

En este contexto, se considera atractivo buscar alternativas para la utilización de los residuos de madera de eucalipto. La elaboración de productos de mayor valor agregado a partir de los diferentes componentes de la biomasa en el marco de una biorrefinería se entiende como una solución plausible. En este trabajo se analizan particularmente las hemicelulosas de eucalipto, buscando las mejores condiciones para su extracción y posterior purificación, para la producción de productos de mayor valor agregado.

HIPÓTESIS:

Es factible obtener productos de mayor valor agregado a partir de las hemicelulosas provenientes de madera de eucalipto.

La utilización de reactivos químicos y tecnologías ampliamente utilizados en otras industrias permiten una extracción eficiente de las hemicelulosas de eucalipto.

Es posible concentrar y/o purificar las hemicelulosas extraídas con métodos utilizados en otros sectores industriales.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar diferentes alternativas para la extracción de las hemicelulosas presentes en la madera de eucalipto, analizando los productos formados a partir de las diferentes condiciones de extracción.

Evaluar distintas alternativas para la purificación y concentración de las hemicelulosas provenientes de licores de extracción de madera de eucalipto.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. BIORREFINERÍAS LIGNOCELULÓSICAS.

El texto que sigue fue mayoritariamente tomado de la publicación “La bioeconomía forestal en Uruguay desde una perspectiva tecnológica.” de Dieste et al. (Dieste et al., 2019), donde fui la autora del capítulo acerca del estado actual de las Biorrefinerías en el mundo.

1.1. Generalidades

Una biorrefinería es una instalación (o red de instalaciones) que integra procesos y equipos de conversión de biomasa y que abarca una amplia gama de tecnologías capaces de separar los recursos de biomasa (madera, pastos, residuos agrícolas, etc.) en sus componentes principales (carbohidratos, proteínas, lignina, etc.) para convertirlos en energía, productos de valor agregado, biocombustibles y productos químicos. Este concepto es análogo a la refinería de petróleo, las cuales hoy producen múltiples combustibles y productos a partir del petróleo con la utilización de diversas tecnologías (Cherubini, 2010).

De acuerdo a IEA Bioenergy (IEA Bioenergy, 2014) se pueden distinguir las biorrefinerías orientadas a la producción de energía (o por biocombustible) y las orientadas a producto. En las primeras, el objetivo principal es a partir de la biomasa, producir grandes cantidades de energía (o biocombustibles) de valor agregado relativamente bajo. En las biorrefinerías orientadas a productos, la biomasa se fracciona en una cartera de productos de base biológica con un valor agregado mayor y beneficios ambientales generales, después de lo cual, los residuos del proceso se utilizan para la producción de energía y / o calor, utilizándose internamente y / o se venden a los sistemas eléctricos nacionales (Ferreira, 2017).

Otra clasificación muy utilizada es la realizada por Kamm *et al.* (Kamm, Gruber and Kamm, 2010) donde se definen las biorrefinerías por el tipo de biomasa utilizada: biorrefinería de cultivos completos (toda la planta cosechada con fines alimentarios y no alimentarios, ejemplo: maíz, trigo), biorrefinería verde (p. ej., pastos y otras biomásas verdes como materia prima), biorrefinería lignocelulósica (basada en la silvicultura). Dentro de esta última categoría entran las biorrefinerías forestales.

Una clasificación utilizada frecuentemente es por los principales tipos de tecnología involucrado; en ésta, se distingue la plataforma de azúcar y la plataforma termoquímica Figura 1-1.

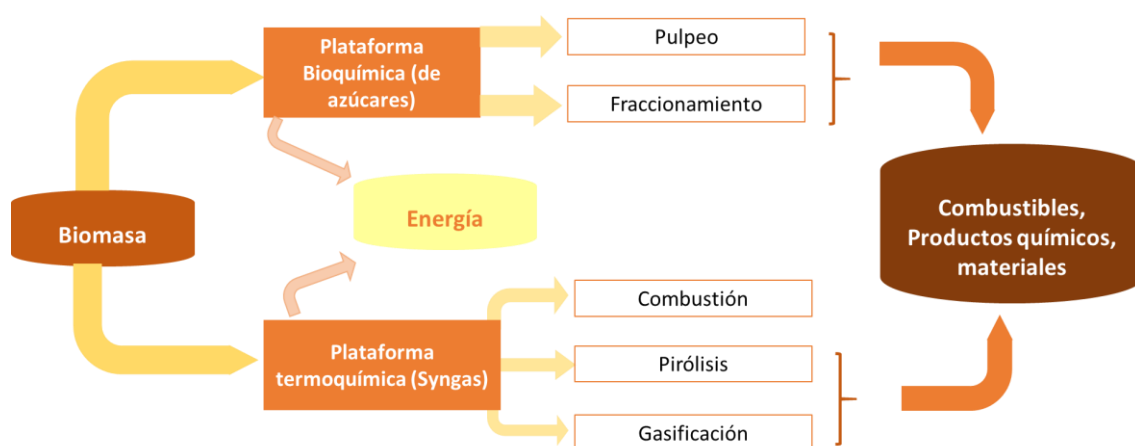


Figura 1-1. Clasificación general de biorrefinerías por el tipo de tecnologías aplicadas (Adaptado de (NREL, 2011; Area, 2015).

Mientras que la plataforma bioquímica se centra en la fermentación de los azúcares extraídos de la biomasa, la plataforma “syngas” se basa en procesos de conversión termoquímica y se centra en la gasificación de materias primas de biomasa y subproductos resultantes de esta conversión.

Las clasificaciones mencionadas hasta aquí tienen varias limitaciones, por ejemplo, no considera el concepto de biorrefinerías multiplataforma ni la existencia de biorrefinerías actuales basadas en algas (Gírio *et al.*, 2017).

Por otro lado, se pueden clasificar las biorrefinerías en primera (también llamadas biorrefinerías convencionales), segunda y tercera generación.

Las biorrefinerías de primera generación se basan en la utilización directa de formas clásicas de biomasa agrícola, pero que también tienen usos como alimentos o para alimentación animal. A modo de ejemplo, en la Tabla 1-1 se muestran algunos ejemplos de producción de biocombustibles a partir de cultivos agrícolas que utilizan procesos de biorrefinería de primera generación. Este tipo de biorrefinería existe en muchos países, incluido Uruguay. Se caracterizan por utilizar una fracción de la materia prima como insumo y utilizan tecnologías maduras (Legros *et al.*, no date; Ragauskas *et al.*, 2006; Kamm, Gruber and Kamm, 2010; Gírio *et al.*, 2017).

Tabla 1-1. Ejemplos de tipos de biorrefinerías de primera generación

Materia prima	Tipo de proceso	Producto	Sub-productos
Azúcares (caña de azúcar, remolacha azucarera, maíz, sorgo dulce, etc.)	Fermentación	Bioetanol (1G)	Otros
Aceites vegetales (colza, girasol, soja, etc.)	Transesterificación	Biodiesel (1G)	Glicerol

Las biorrefinerías de segunda generación utilizan biomasa lignocelulósicas (maderas, pastos, residuos agrícolas) como materias primas. Este tipo de biomasa está más disponible y distribuida globalmente que las de primera generación y no se usan directamente como alimento, aunque algunas se pueden utilizar para alimentación animal (Kamm, Gruber and Kamm, 2010; Hughes *et al.*, 2013). En estas se busca la producción de diversos productos a partir de los distintos

componentes de un tipo de biomasa específico, normalmente un biocombustible (bioetanol, biobutanol) y otros productos que proporcionan mayor valor agregado, pero que usualmente están definidos una vez que se implementa el proceso.

Las biorrefinerías de tercera generación son biorrefinerías más avanzadas, de las cuales aún no existen ejemplos a escala comercial. La concepción de las mismas es que dependiendo de la disponibilidad de biomasa (por factores estacionales, logísticos, etc.) la planta industrial pueda utilizar biomasa agrícola, forestal o residuos urbanos indistintamente, para producir diferentes productos en procesos diversos (biocombustibles avanzados, productos de commodities, biomateriales, energía y otros productos de valor agregado), adecuando la producción de unos frente a otros dependiendo de la demanda (Kamm, Gruber and Kamm, 2010; Hughes *et al.*, 2013). La Figura 1-2 muestra un ejemplo de biorrefinería de tercera generación.

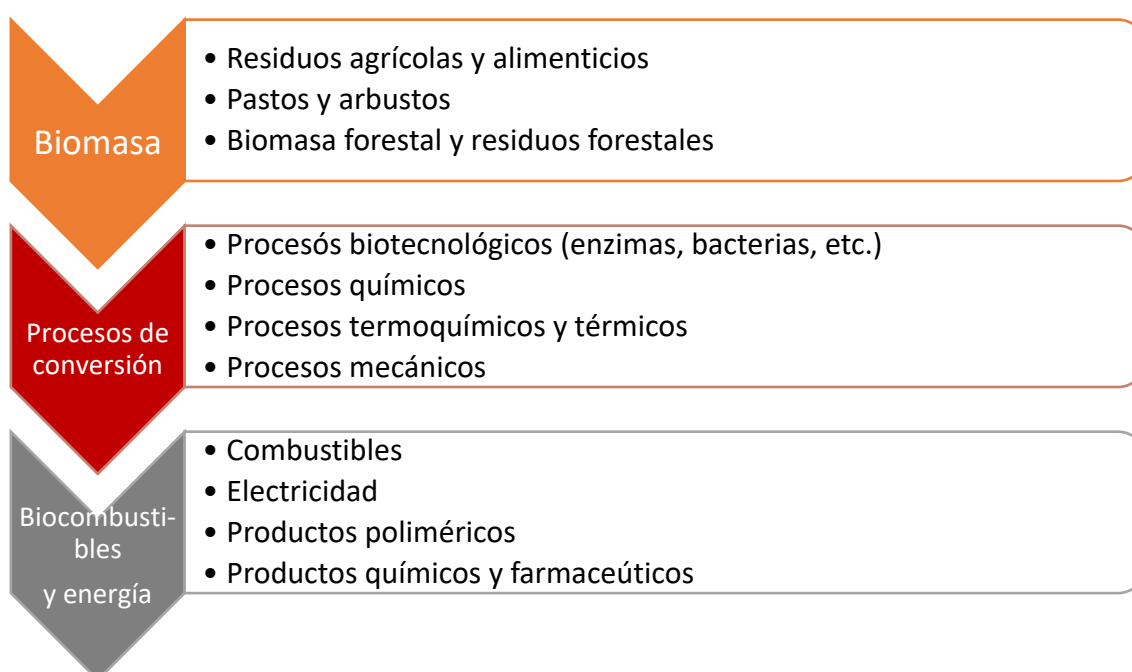


Figura 1-2. Biorrefinería de 3^{era} generación (Adaptado de (Kamm, Gruber and Kamm, 2010)).

El desarrollo de las biorrefinerías de segunda y tercera generación tienen dos objetivos estratégicos: el desplazamiento del petróleo por materias primas renovables (un objetivo energético) y el establecimiento de una industria robusta de base biológica (un objetivo económico)(Bozell and Petersen, 2010). El objetivo energético se aborda por el esfuerzo en la producción de etanol, biodiesel y biocombustibles avanzados (butanol, biodiesel de algas, etc.). Pero a pesar de su alto volumen, el combustible es un producto de bajo valor. Como resultado, el retorno de la inversión en operaciones de biocombustible representa una barrera importante para alcanzar la meta económica de la biorrefinería. Internacionalmente, la infraestructura de la cadena de valor completa existe, sin embargo, su rentabilidad sigue siendo cuestionable, lo que requiere un importante apoyo financiero del gobierno o un mercado regulado para garantizar el despliegue del mercado a gran escala (Bozell and Petersen, 2010; IEA Bionergy, 2014). Los productos químicos de alto valor y menor volumen proporcionan este incentivo.

Otros objetivos asociados, no menos importantes son la menor dependencia de la cadena de suministro de productos petroquímicos con el uso de materias primas diversificadas; la creación de puestos de trabajo, incluidas áreas rurales que ofrecen logística adecuada y la valorización de residuos, principalmente los residuos agrícolas y forestales. Asimismo, este tipo de emprendimiento está alineado con los objetivos del Desarrollo Sostenible, utilizando materias primas renovables y que se constituyen en sumideros de CO₂; balance global de CO₂ más favorable y generando residuos biodegradables, de más fácil tratamiento o disposición (Area and Vallejos, 2012; Vertès, 2014).

En la actualidad, hay pocos ejemplos comerciales de biorrefinerías basadas en productos y los ejemplos de biorrefinerías basadas en biocombustibles de segunda generación son aún emprendimientos no consolidados. Para la Agencia Internacional de Energía (IEA por su sigla en inglés), las principales razones para esto son (IEA Bioenergy, 2014; IEA Bioenergy Task42, 2018):

- algunas de las tecnologías clave (fraccionamiento y separación de productos) que forman parte de las plantas de biorrefinería integradas aún no están lo suficientemente maduras para la implementación a escala comercial,
- todavía no existen reglas claras para el uso sostenible de la biomasa para aplicaciones alimentarias y no alimentarias,
- los sectores del mercado que deberían cooperar (alimentos, alimentación animal, agroindustria, química, energía, combustibles, logística) para el desarrollo y comercialización de cadenas de valor de biomasa totalmente sostenibles, incluidos los procesos de biorrefinería de alta eficiencia, todavía no están coordinados,
- hay falta de conocimiento / experiencia sobre las ventajas de los procesos de biorrefinería para el uso óptimo de biomasa sostenible a nivel industrial, de PYMES y gubernamental, por lo cual es primordial mejorar la comunicación / colaboración entre diferentes actores de diferentes sectores industriales.

Globalmente, de acuerdo a la IEA Bioenergy (IEA Bioenergy Task42, 2018), los principales desafíos aún por enfrentar son:

- desarrollo de la legitimidad de esta industria y el uso sostenible de la biomasa,
- participación multisectorial de partes interesadas en el desarrollo de cadenas de valor sostenibles,
- desarrollo de tecnología y escalado de la biorrefinería utilizando las mejores prácticas,
- desarrollo del capital humano necesario, capacitando recursos humanos para que se conviertan en expertos en biorrefinerías.

De acuerdo al “World Economical Forum” (King, Inderwildi and Williams, 2010), otro desafío importante es establecer la infraestructura necesaria (cadena de suministro y logística de distribución) y alcanzar los altos costos de capital requeridos. Estos últimos suelen estar fuera del alcance financiero de las empresas privadas individuales y, por lo tanto, pueden requerir financiamiento público. El desarrollo de la bioeconomía se encuentra en una etapa temprana y de alto riesgo, y ninguna industria o empresa es capaz de gestionar esta fase de su desarrollo de

forma independiente. Por lo tanto, los gobiernos tienen un papel clave que desempeñar en el suministro de apoyo “semilla” a las biorrefinerías, especialmente en la etapa precompetitiva, y la creación de mercados para garantizar que las mismas se establezcan y tenga éxito. Los gobiernos interesados en respaldar las biorrefinerías por razones de protección del medio ambiente, seguridad energética y liderazgo de innovación debieran respaldar inversiones significativas en tecnología de I + D creando mercados y regulando cuidadosamente el proceso de industrialización para atraer inversiones del sector privado y, al mismo tiempo, minimizar los efectos adversos sobre el medio ambiente.

2. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

2.1. Generalidades

El término biomasa refiere a cualquier materia orgánica que se encuentra disponible de forma renovable. La mayoría de la biomasa es producida en la agricultura, la silvicultura y por los sistemas microbianos (Kamm, Gruber and Kamm, 2010). Dentro de estos, la biomasa lignocelulósica es la formada mayoritariamente por 3 componentes principales: celulosa, hemicelulosas y lignina, y otros componentes minoritarios como los extractivos y los compuestos inorgánicos (Kamm, Gruber and Kamm, 2010). La biomasa lignocelulósica constituye la mayor fuente de material orgánico renovable en la Tierra. Dentro de este tipo de biomasa se incluye: a) los residuos agrícolas y/o agroindustriales (bagazo de caña de azúcar, mazorca y rastrojos de maíz, cáscara de arroz, paja de arroz, paja de trigo, etc.); b) granos y residuos posteriores al tratamiento (cebada, café procesado, orujo de uva, alperujo de oliva, cáscaras de frutas, etc.); c) cultivos energéticos dedicados (*miscanthus*, “switchgrass”, etc.); y d) materiales leñosos (incluyendo residuos forestales como ramas, cortezas, tocones y troncos, así como desechos de madera)(Mussatto and Dragone, 2016). En la Tabla 2-1 se puede comparar el diferente contenido de los componentes mencionado en diferentes tipos de biomasa lignocelulósica.

Respecto a las distintas fuentes de materiales lignocelulósicos, las principales diferencias entre la biomasa de materiales madereros y no madereros (agrícolas) son la composición química y sus propiedades físicas. La biomasa maderera es físicamente más grande y estructuralmente más fuerte y más densa que la biomasa agrícola. Químicamente, la primera tiene un mayor contenido de lignina que la biomasa agrícola. Como resultado, la madera es más recalcitrante a agentes microbianos y enzimáticos. En comparación con la biomasa agrícola, la madera tiene muchos rasgos únicos. Por ejemplo, puede ser cosechada durante todo el año, lo que elimina el almacenamiento a largo plazo. Su alta densidad reduce significativamente los costos de transporte. Además, su alto contenido de lignina aumenta su poder calorífico (Zhu and Pan, 2010).

Tabla 2-1. Composición típica de diferentes tipos de biomasa lignocelulósica.

Biomasa lignocelulósica	Celulosa	Hemicelulosas	Lignina	Extractivos	Cenizas	Referencias
Maderas de latifoliadas						
Abedul	42,5 - 43,7	25-28	20,9 - 22,4	1,7 -5,0	0,2- 0,8	(Helmerius <i>et al.</i> , 2010; Borrega, Nieminen and Sixta, 2011)
Eucalipto	37,3 – 54,4	19,4 - 31,0	21,9 - 28,8	3,0 - 4,2	0,3 - 1,2	(Area <i>et al.</i> , 2004; Parajó <i>et al.</i> , 2004; Magaton <i>et al.</i> , 2006; Reina, 2010; Area and Vallejos, 2012)
Álamo	40,3- 47,3	16,6 - 22,6	23,0	2,1 - 2,8	0,8 - 1,9	(Mussatto and Dragone, 2016) (Zhu and Pan, 2010)
Maderas de coníferas						
Pino	41,0 – 50,0	26,0 -32,0	26,9 – 30,8	1,8 - 4,9	0,3 - 0,4	(Zhu and Pan, 2010; Area and Vallejos, 2012)
Abeto	38,8 - 45,5	21,2 – 25,8	27,9 - 32,0	2,7 - 4,7	0,4	(Zhu and Pan, 2010; Mussatto and Dragone, 2016)
Residuos agrícolas/agroindustriales						
Rastrojo de maíz	30,6 - 43,1	19,1 – 25,3	16,7 - 21,3	4,6 -11,9	11,0-11,5	(Mussatto and Dragone, 2016) (Zhu and Pan, 2010)
Cáscara de arroz	28,7 – 36,7	12,0 - 29,3	15,4 - 21,3	5,1 -8,2	14,3 -20,7	(Area and Vallejos, 2012; Mussatto and Dragone, 2016; Bariani <i>et al.</i> , 2020)
Bagazo de caña de azúcar	31,9 - 47,3	22,9 – 35,8	14,1 - 30,6	2,7 -14,1	0,8 – 8,8	(Area and Vallejos, 2012; Brienzo and Figueiredo, 2016; Chiarello <i>et al.</i> , 2016)
Tallos de girasol	42,3	19,1	26,5	7,2	3,2	(Akpinar, Erdogan and Bostanci, 2009)
Granos de cebada usados	16,8 - 26,0	19,2 - 29,6	16,9 - 27,8			(Kabel <i>et al.</i> , 2002; Mussatto and Dragone, 2016)
Paja de trigo	35,0 - 40,0	21,0 - 30,0	12,0 -20,0	9,3 - 15,0	5,5 - 10,2	(Akpinar, Erdogan and Bostanci, 2009; Zhu and Pan, 2010; Mussatto and Dragone, 2016)
Cultivos energéticos						
Switchgrass	26,8 – 42,0	21,5 -28,8	13,2 – 24,0	2,0 – 12,6	4,0 - 9,4	(Zhu and Pan, 2010; Mussatto and Dragone, 2016; Larnaudie, Ferrari and Lareo, 2019)
Miscanthus	35, 0 - 40,0	16,0 - 20,0	20,0 - 25,0			(Mussatto and Dragone, 2016)
Otros residuos						
Lodo tratam. efluentes planta pulpa Celulosa	31,4	9,8	15,3			(Mussatto and Dragone, 2016)
Estiércol vacuno	1,6 - 4,7	1,4- 3,3	2,7 - 5,7			(Mussatto and Dragone, 2016)

2.2. Componentes de la biomasa lignocelulósica

2.2.1. Celulosa

La celulosa es un polímero lineal homogéneo de unidades de β -D-glucopiranosas enlazadas en la posición 1,4; con un grado de polimerización (DP) que oscila de 10.000 a 15.000 unidades. La celobiosa es la unidad de repetición del polímero.

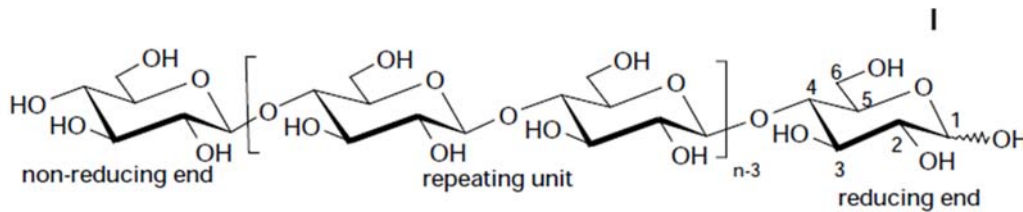


Figura 2-1. Estructura molecular de la celulosa. Tomado de (Sixta, 2006)

Las moléculas de celulosa son completamente lineales y tienen una fuerte tendencia a formar enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares. Los haces de moléculas de celulosa se agregan por lo tanto juntos en forma de microfibrillas, en donde se alternan regiones altamente ordenadas (cristalinas) con regiones menos ordenadas (amorfas). En las zonas cristalinas, inaccesibles a los reactivos químicos, las cadenas de celulosa se mantienen unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. En las regiones amorfas, la disposición de las moléculas es menos compacta, y la unión entre las cadenas es menor que en las regiones cristalinas (Martín-Sampedro, 2011). Las microfibrillas conforman fibrillas y las fibrillas forman las fibras de celulosa. Como consecuencia de esta estructura fibrilar y los fuertes enlaces de hidrógeno, la celulosa tiene una alta resistencia a la tracción y es insoluble en la mayoría de los solventes (Sjöström, 1993). La Figura 2-2 muestra un esquema de los enlaces inter e intra moleculares de las cadenas de celulosa

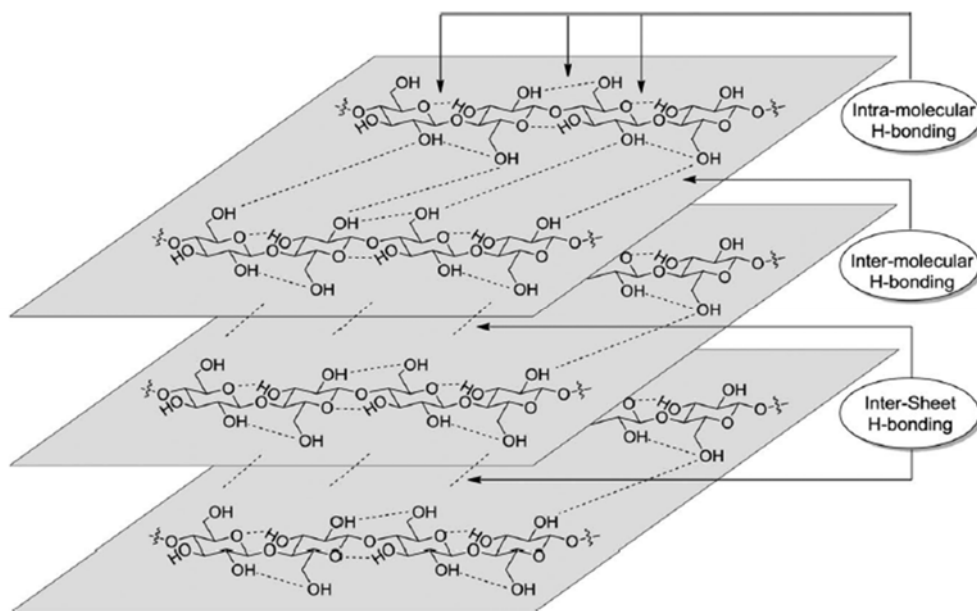


Figura 2-2. Enlaces intra e intermoleculares de las cadenas de celulosa. Tomado de (Bhaumik and Dhepe, 2016).

2.2.2. Lignina

La lignina es un heteropolímero amorfo que consiste principalmente de alcohol fenilpropílico metoxilado. Los tres precursores principales de la lignina, denominados alcoholes cinamílicos se muestran en la Figura 2-3. Estos alcoholes presentan diferencias entre sí en las sustituciones del anillo aromático, dando lugar a las unidades guayacilo (unidad G), siringilo (unidad S) y 4-hidroxifenilo (unidad H)(Sjöström, 1993).

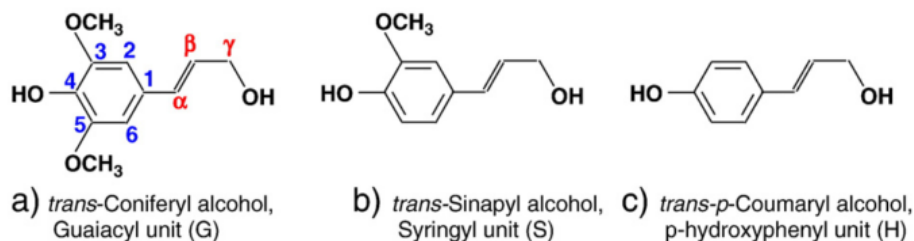


Figura 2-3. Precursores de la lignina. Tomado de (Sixta, 2006).

La lignina es una macromolécula tridimensional con una relación de átomos de carbono: oxígeno superior a 2:1. Esto es al menos el doble que la de las hemicelulosas y celulosa, donde la relación

de carbono a oxígeno es casi 1:1. Por lo tanto, la lignina es energéticamente más densa que los azúcares. La estructura del anillo aromático proporciona también excelentes fuentes de grupos funcionales una vez despolimerizado. De hecho, la lignina actúa como una barrera natural a la degradación biológica de la celulosa y las hemicelulosas en la madera. Las unidades monoméricas de alcohol fenilpropílico metoxiladas se unen por una variedad de enlaces estables de carbono-carbono y de oxígeno-carbono-carbono (éteres y ésteres) los que se pueden ver en la Figura 2-4 (Stenius, 2000). Los enlaces β -O-4 son los más abundantes en la lignina, alcanzando el 50% en maderas de fibra larga (coníferas) y alrededor del 60% en las de fibra corta (latifoliadas). Estructuralmente, la lignina es una macromolécula tridimensional. Mientras que la lignina de las maderas de coníferas es principalmente un producto de polimerización de alcohol coniferílico, la lignina de las maderas de frondosas se deriva principalmente de una mezcla de alcoholes coniferil y sinapílico. (Sjöström, 1993).

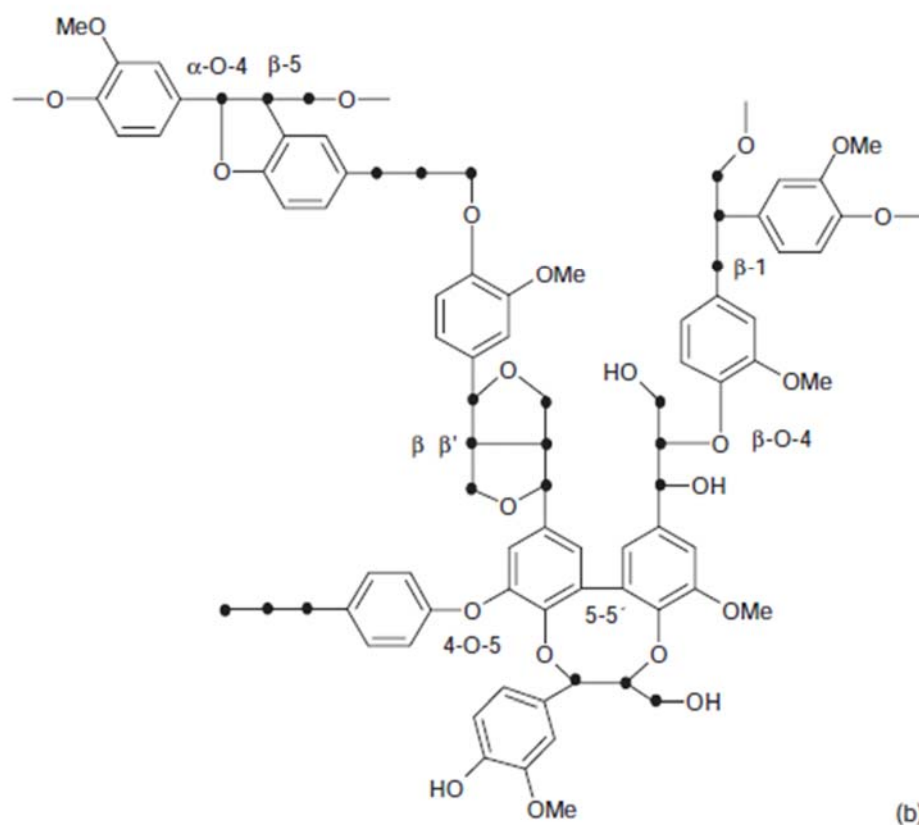


Figura 2-4. Representación de un fragmento de lignina donde se observan los enlaces característicos- Tomado de (Sixta, 2006).

2.2.3. Hemicelulosas

Las hemicelulosas son polisacáridos biosintetizados en grandes cantidades por la mayoría de las especies de plantas y árboles terrestres. Una producción estimada de hemicelulosas se puede ubicar en los 60 billones de toneladas anuales. Representan un enorme recurso renovable hasta ahora prácticamente subutilizado (Gatenholm & Tenkanen 2004- pp xi). A diferencia de la celulosa, que está constituida por un único monómero y que sólo difieren en el grado de polimerización y de cristalinidad, la hemicelulosas son heteropolisacáridos no cristalinos y clásicamente definidos como el material soluble en álcali después de la eliminación de las sustancias pécticas (Sun, Sun and Tomkinson, 2004).

Las hemicelulosas presentan una cadena corta, altamente ramificada de heteropolisacáridos con un grado de polimerización (en adelante DP) entre 80 – 200. Sus fórmulas generales son $(C_5H_8O_4)_n$ y $(C_6H_{10}O_5)_n$ denominadas pentosas (D-xylosas, L-arabionosa y D-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa, y D- galactosa) respectivamente (Sun, Sun and Tomkinson, 2004). También están presentes Deoxyhexosas (L-rhamnosa o 6-deoxy-L-manosa y raramente L-fucosa o 6-deoxy-L-galactosa) y pequeñas cantidades de ácidos urónicos (ácido 4-O-metil-D-glucoronico, ácido D- galacturónico y D-glucurónico) (Sjöström, 1993).

En función de su origen biológico, se pueden encontrar distintas estructuras de hemicelulosas. El contenido de las mismas en las maderas es entre 20-30% en peso seco; siendo la composición y estructura de las hemicelulosas en las maderas de coníferas diferente a las de las latifoliadas. Las hemicelulosas más relevantes son xilanos y glucomananos, siendo los xilanos los más abundantes. Los xilanos son los componentes principales de las hemicelulosas de las paredes celulares secundarias de las maderas de latifoliadas y de plantas herbáceas. En algunos tejidos de gramíneas y cereales los xilanos pueden representar hasta el 50% (Ebringerova, Hromadkova and Heinze, 2005). Las hemicelulosas del tipo mananos como glucomananos y galactoglucomananos son los principales componentes hemicelulósicos de la pared secundaria de maderas de coníferas. La Tabla 2-2 muestra los monómeros que forman las hemicelulosas de distintos materiales lignocelulósicos.

Tabla 2-2. Componentes principales de las hemicelulosas de distintos tipos de biomasa.

Biomasa lignocelulósica	Xilosa	Arab.	Man.	Gal.	Urónicos	Acetilos	Referencias
Maderas de latifoliadas							
Abedul	18,5 - 24,9	0,3 - 0,5	1,8 - 3,2	0,7 - 1,3	3,6 - 6,3	3,7 - 3,9	(Gírio <i>et al.</i> , 2010)
Eucalipto	12,1 - 14,2	0,4 - 1,0	0,6 - 1,1	1,0 - 1,5	5,8 - 8,5	3 - 3,7	(Kabel <i>et al.</i> , 2002; Reina, 2010; Area and Vallejos, 2012)
Álamo	18 - 27,3	0,7 - 4,0	0,9 - 2,4	0,6 - 1,5	4,8 - 5,9	4,3	(Kabel <i>et al.</i> , 2002; Gírio <i>et al.</i> , 2010)
Maderas de coníferas							
Pino	5,3 - 10,6	2,0 - 4,2	5,6 - 13,3	1,9 - 3,8	2,5 - 6,0	1,2 - 1,9	(Gírio <i>et al.</i> , 2010; Area and Vallejos, 2012)
Abeto	5,3 - 10,2	1,0 - 1,2	9,4 - 15	1,9 - 4,3	1,8 - 5,8	1,2 - 2,4	(Gírio <i>et al.</i> , 2010)
Residuos agrícolas/agroindustriales							
Rastrojo de maíz	25,7	4,1	< 3,0	< 2,5			(Gírio <i>et al.</i> , 2010)
Cáscara de arroz	15,6 - 17,6	1,7 - 2,0	--	--	1,2 - 1,3	1,6	(Garrote <i>et al.</i> , 2007; Area and Vallejos, 2012; Bariani <i>et al.</i> , 2020)
Bagazo de caña de azúcar	20,5 - 25,6	2,0 - 3,6	0,3 - 0,4	0,8 - 2,2	--	1,7 - 1,9	(Gírio <i>et al.</i> , 2010; Area and Vallejos, 2012; Chiarello <i>et al.</i> , 2016)
Tallos de girasol	19,2 - 21,0	2,4 - 3,8	0 - 0,8	1,7 - 2,4			(Gírio <i>et al.</i> , 2010)
Granos de cebada usados	15	8	0	1	2	0,8	(Kabel <i>et al.</i> , 2002)
Salvado de trigo	16	9	0	1	0,4	2	(Kabel <i>et al.</i> , 2002)

2.2.4. Xilosacáridos

Los Xilanos como verdaderos homopolímeros se encuentran en algunas algas marinas donde su estructura principal consiste en residuos de xilosa unidos por enlaces glucosídicos β -(1 $\rightarrow$ 3) o β - mixto (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4).

Los xilanos de las plantas terrestres son heteropolímeros que presentan un esqueleto de unidades β -D-xilopiranasas unidas por enlace 1-4. Esta cadena puede ser lineal, pero usualmente es ramificada y presenta uniones glicosídicas con otras unidades de carbohidratos. Estas comprenden ácido D-glucurónico o 4-O-metil- éter, L-arabinosa y / o diversos oligosacáridos formados por D-xilosa, L-arabinosa, D-o L-galactosa y D-glucosa. (Ebringerova, Hromadkova and Heinze, 2005)

Se encontraron porciones significativas de xilasas acetiladas en C-2 (y también en C-3) en las paredes celulares de paja de cereales. Algunas cadenas de xilanos presentan uniones D-glucoronopiranasas, pero los grupos ácidos más importantes son O-acetil-4-O-metil-D-glucuronoxilanos y L-arabino (4-O-metil-D-glucurono) xilanos. Los grupos acetilo representan el 1-2% del peso seco de las paredes celulares de las plantas gramíneas; mientras que se encuentran en mayor porcentaje en las maderas de latifoliadas, representando los grupos acetilos entre 3-17% del peso seco de la pared celular. (Sun, Sun and Tomkinson, 2004)

Los arabinoxilanos (AX) representan la principal estructura de hemicelulosas de las paredes celulares de granos de cereales. Los arabinoxilanos son similares a los xilanos de las maderas de coníferas, pero la cantidad de L-arabinosa es mayor. En los AX, el esqueleto lineal de β -(1,4)-D-xilopiranosas está sustituido por unidades de α -L-arabinofuranosa en las posiciones 2-O y/o 3-O y por residuos de ac. urónicos o sus derivados 4-O-metilo en la posición 2-O. Los residuos de arabinofuranosas de los arabinoxilanos también pueden estar esterificados con residuos de ácidos hidroxicinámicos, por ejemplo, los ácidos ferúlico y p-cumárico. (Ebringerova, Hromadkova and Heinze, 2005). La Figura 2-5 muestra la estructura primaria de los arabinoxilanos.

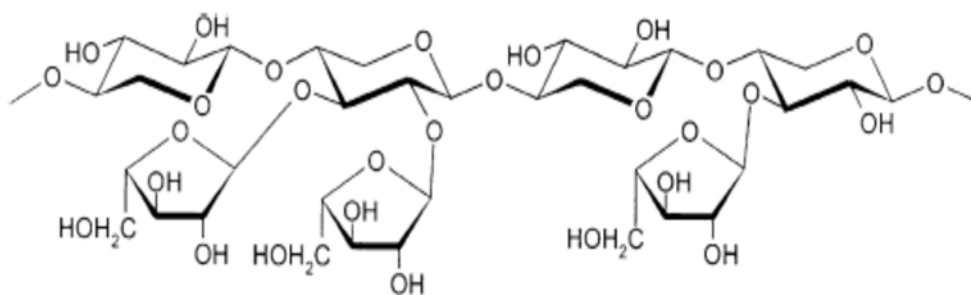


Figura 2-5. Estructura primaria de L-arabino-D-xilanos (AX). Tomado de (Ebringerova, Hromadkova and Heinze, 2005)

A pesar de que las hemicelulosas de diversas especies de madera de latifoliadas se diferencian entre sí tanto cuantitativa como cualitativamente, el componente principal en estas es el O-acetil-4-O-metilglucorono- β -D-xilano, normalmente denominado glucuronoxilano o xilanos (Sjöström, 1993). Dependiendo de la especie de frondosa, el contenido de xilanos varía entre 15-30% en peso de madera seca. La estructura consiste en un esqueleto de unidades β -D-xilopiranosas unidas por enlace 1-4. Los grupos OH de las unidades de xilosa están mayoritariamente sustituidos por un grupo O-acetilo en el C2 o C3 (aprox. 4 - 7 de cada 10 residuos). Adicionalmente las unidades de xilosa de la cadena principal pueden estar sustituidas por enlaces 1-2 a residuos de ácidos 4-O-metil- α -D-glucurónico a razón de un ácido urónico por cada 10 unidades de xilosas. (Sjöström, 1993)

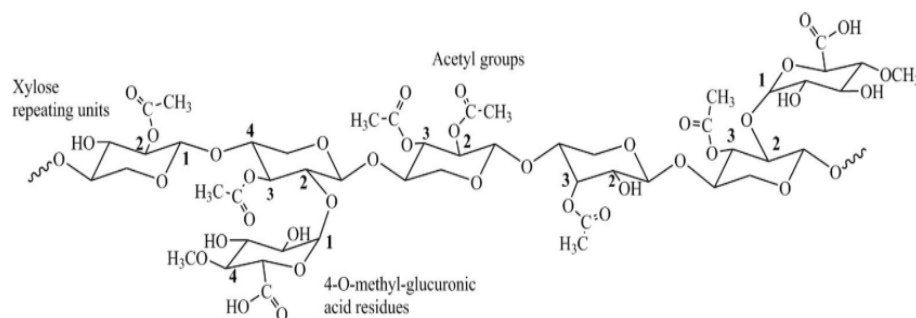


Figura 2-6. Estructura primaria del O-acetil-4-O-metilglucorono- β -D-xilano. Tomado de (Farhat *et al.*, 2017).

Pascoal Neto y colaboradores (Evtuguin *et al.*, 2003; Pascoal Neto *et al.*, 2005) han reportado que los heteroxilanos de la madera de *Eucalyptus globulus* muestran una estructura química peculiar frente a la que normalmente se encuentran en xilanos de otras latifoliadas: aproximadamente un tercio de los residuos de 4-O-metil- α -D-glucurónico unidos a la cadena principal de xilanos, se encuentran además sustituidos en la posición O-2 por unidades de D-galactopiranosas y D-glucopiranosas. Tales unidades de ácidos urónicos sustituidas (ausentes en los xilanos de abedul por ejemplo) pueden constituir puntos de enlace entre xilanos y otros polisacáridos de la pared celular, que contribuyen a retardar la degradación del xilanos y disolución durante los procesos de pulpeo o extracción de eucalipto. El grado de ramificación de los xilanos de eucalipto es también mayor que en el abedul (MeGlcA: Xylp 1-1,2 contra 0,7/10, respectivamente). Martinez Burgos (Martinez Burgos, 2013), quien utilizó *Eucalyptus globulus* de distintos genotipos de Chile, encontró que el grado de sustitución del ácido metilglucurónico varió en los distintos genotipos. La sustitución fue de 1.4 - 1.9 MeGlcA / 10 unidades de xilosa en algunos genotipos, mientras que en otros fue de 0.9 - 1.3 MeGlcA /10 unidades de xilosa.

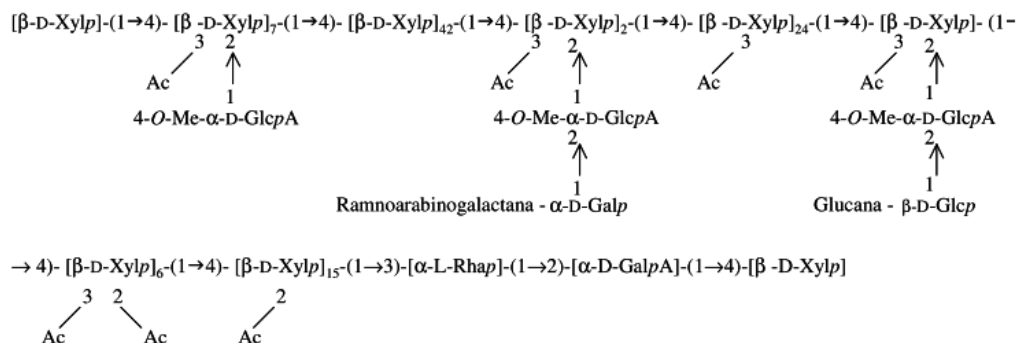


Figura 2-7. Estructura propuesta para los xilanos de *E. globulus* (incluyendo el terminal reductor constituido por el fragmento [1-3)- α -L-Rhap-(1-2)- α -D-GalpA-(1-4)-D-Xylp]), que evidencia la presencia de unidades de ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico sustituido en O-2, característica específica de los xilanos de *E. globulus* (Pascoal Neto et al., 2005).

Magaton et al. (Magaton *et al.*, 2011, 2013) estudiaron las características de los xilanos de distintas especies de eucaliptos. Confirmaron que, a diferencia de otras especies de maderas de fibra corta, los xilanos de las diferentes especies de madera de eucalipto tienen un grupo metil glucurónico (MeGlcA) sustituido en O-2, con sustitución de 9 a 26 % dependiendo de la especie de eucalipto (Tabla 2-3).

Tabla 2-3. Composición química de distintas especies de eucalipto en términos de xilosacáridos y ácidos urónicos, indicándose la frecuencia de sustitución de los grupos metil glucurono (MeGlcA). Tomado de (Magaton *et al.*, 2011, 2013)

Madera	Xilanos (%b.m.s)	Ac. Urónicos (%b.m.s)	Total MeGlcA / 10 xilasas	Grupos O-2-Sustituidos por MeGlcA / 10 xilasas
<i>E. dunnii</i>	12,4	4,0	2,1	1,5
<i>E. grandis</i>	10,2	4,7	2,8	2,2
<i>E. nitens</i>	15,8	5,3	2,1	1,4
<i>E. urograndis</i>	13,4	4,2	1,9	1,3
<i>E. urophylla</i>	10,3	4,4	2,6	2,0

En promedio, los xilanos de madera de eucalipto también mostraron un peso molecular (Mw) en el rango, o algo mayor, que otras especies de maderas de fibra corta, de acuerdo con lo que se indica en la Tabla 2-4.

Tabla 2-4. Peso molecular medio ponderado de los xilanos de distintas especies de madera de latifoliadas.

Especies	PM (kDa)	Referencias
<i>E. globulus</i>	26-33,5	(Evtuguin <i>et al.</i> , 2003; Pascoal Neto <i>et al.</i> , 2005; Magaton <i>et al.</i> , 2011; Martinez Burgos, 2013)
<i>E. urograndis</i>	26,5 - 31	(Pascoal Neto <i>et al.</i> , 2005; Magaton <i>et al.</i> , 2011)
<i>E. grandis</i>	25 - 28,4	(Pascoal Neto <i>et al.</i> , 2005; Magaton <i>et al.</i> , 2011)
<i>E. nitens</i>	26,6	(Magaton <i>et al.</i> , 2011)
<i>E. dunnii</i>	26,1	(Magaton <i>et al.</i> , 2011)
<i>B. pendula (abedul)</i>	24	(Pascoal Neto <i>et al.</i> , 2005)
<i>A. Mangium (acacia)</i>	28	(Pascoal Neto <i>et al.</i> , 2005)

2.3. Estructura de la pared celular de madera

Desde el punto de vista macroestructural, la pared celular está constituida por varias capas denominadas: Laminilla media (LM), pared primaria (P), y pared secundaria (S). Las paredes primarias de dos células adyacentes están unidas entre sí por lignina, denominándose a esta capa de unión laminilla media (LM). La cavidad interior de la célula se llama lúmen y conecta unas células con otras formando el tejido conectivo. La pared secundaria está constituida por tres capas que se diferencian en la orientación de las fibrillas de celulosa. En las capas exterior e interior (S1 y S3) las fibrillas están dispuestas formando un amplio ángulo con el eje de la célula, mientras que la disposición de las fibrillas en la capa intermedia gruesa (S2) es prácticamente paralela al eje (Sjöström, 1993)

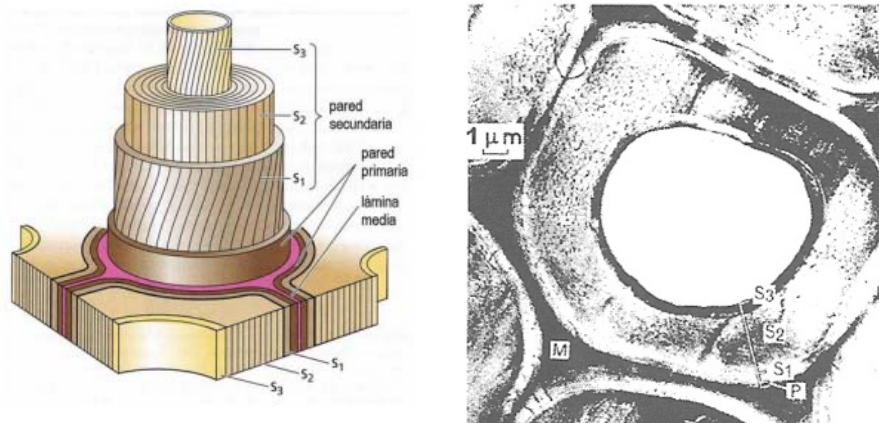


Figura 2-8. Estructura simplificada de la pared celular. Tomado de (Stenius, 2000).

Los tres componentes principales de la biomasa lignocelulósica (celulosa, lignina y hemicelulosa) se encuentran presentes en las distintas capas de la pared celular, aumentando el contenido en lignina al ir de las capas interiores a las exteriores (Figura 2-9)

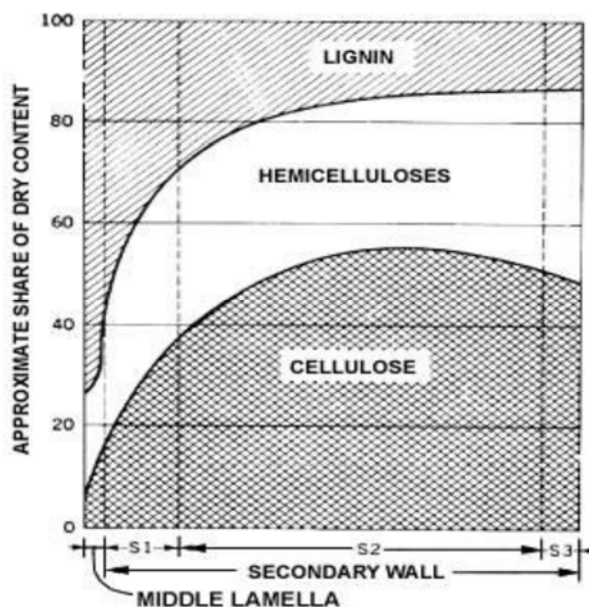


Figura 2-9. Distribución de los componentes químicos principales en las capas de la pared celular de madera (de fibra larga) (Gullichsen, 1999).

La pared secundaria de las dicotiledóneas (entre ellas las maderas de latifoliadas) son normalmente estructuras complejas de celulosas y glucuronoxilanos, usualmente reforzadas con ligninas. Estas estructuras están fuertemente consolidadas y son difícilmente atacables, incluso por microorganismos (Reis, Vian and Roland, 1994).

El grado de sustitución de los glucuronoxilanos determinaran la solubilidad de los mismos y eso afectará en la capacidad del polímero para unirse y para unir cadenas de celulosa por enlaces de hidrógeno. Glucuronoxilanos poco ramificados presentan una afinidad cercana a la celulosa pudiéndose establecer muchos enlaces por puentes de hidrógeno. Experimentos de co-cristalización de glucuronoxilanos y celulosas han mostrado que ambos se orientan de forma paralela, encontrándose los xilanos entre los espacios intermicrofibrilares (Reis, Vian and Roland, 1994).

En las maderas de fibra corta la pared secundaria está bien definida, aunque depende de la especie de madera, estacionalidad y condiciones de crecimiento, edad y tipo de célula. En las fibras se encuentra una estructura típica de 3 capas (S1, S2 y S3) estando las mismas conectadas por zonas de transición donde ocurre una rotación progresiva de las microfibrillas de celulosa mediante una transición helicoidal, donde se encuentran los glucuronoxilanos (Figura 2-10) (Reis, Vian and Roland, 1994).

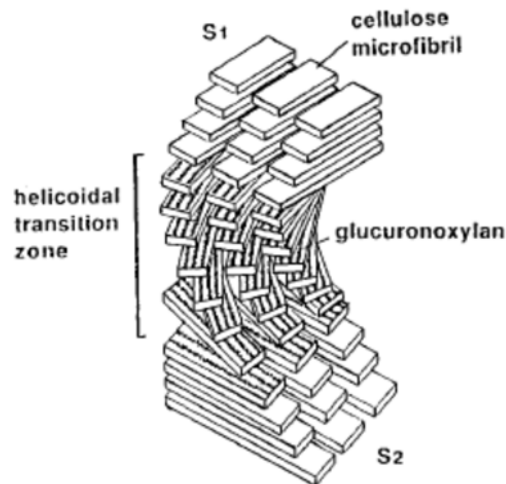


Figura 2-10. Diagrama que muestra la distribución del glucuronoxilano en la pared celular de las fibras (Tomado de Reis *et al.* 1994).

El endurecimiento de las paredes secundarias por un proceso de lignificación se produce posteriormente a la formación de la matriz de celulosa y glucuronoxilanos. La matriz celulosa-glucuronoxilano es una estructura anisotrópica y cargada electrostáticamente que actúa como una especie de huésped para la estructura de lignina. La lignina se incrusta en la estructura del mismo modo que ocurre en sólidos de bajas dimensiones de acuerdo a lo documentado en la literatura de ciencia de materiales. En éstos, monómeros exógenos pueden intercalarse en los huecos de las superficies originados por repulsiones electrostáticas internas. El compuesto insertado neutraliza el ambiente aniónico y establece puentes entre las unidades, estabilizándolas. De forma similar en la pared celular, la lignina se inserta y polimeriza en los huecos entre las microfibrillas, dejando más rígida la matriz celulosa-glucuronoxilanos y de esa forma salvaguardando la estructura anisotrópica. Asimismo, se pueden establecer enlaces entre la lignina y los carbohidratos. De esta forma disminuye la repulsión electrostática entre las microfibrillas y aumenta la fuerza cohesiva de la matriz (Reis, Vian and Roland, 1994).

De acuerdo a Dammström (Dammström, Salmén and Gatenholm, 2009) existen dos tipos de fracciones de xilanos en las maderas de latifoliadas (en particular en abedul), una asociada con la celulosa y otra asociada con la lignina. La fracción de xilanos no ramificada se asocia fundamentalmente con la celulosa mientras que la más ramificada se deposita junto con la lignina. La Figura 2-11 muestra el modelo de la pared secundaria de las frondosas propuesto por estos autores, que completa el modelo de Reis, presentado en la figura anterior.

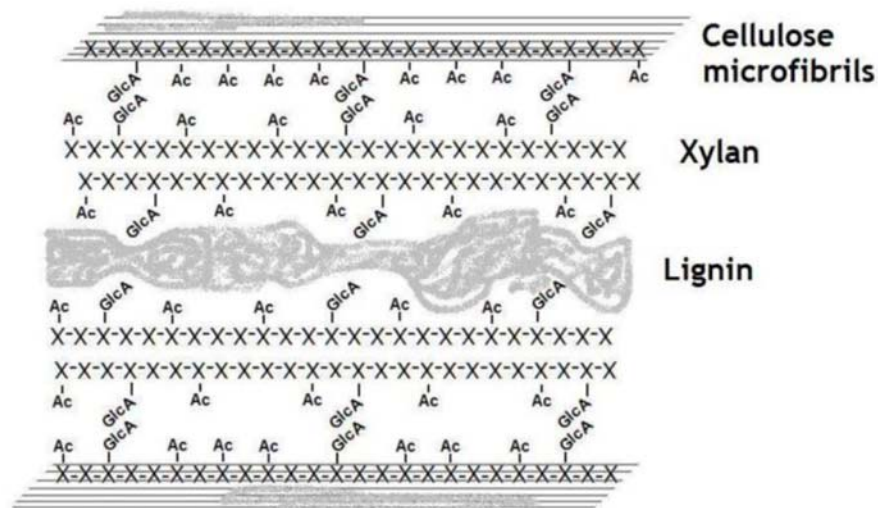


Figura 2-11. Esquema del modelo presentado por (Dammström, Salmén and Gatenholm, 2009) donde se muestra la distribución de celulosa, xilanos y lignina en la pared secundaria de las fibras de abedul.

2.4. Enlaces lignina-carbohidratos

Otro aspecto implica estudiar las uniones que ocurren entre xilanos y celulosas con lignina tendientes a la formación de enlaces lignina carbohidratos (uniones LCC). La estrecha relación entre los componentes de lignina y carbohidratos en la madera sugieren fuertemente la existencia de vínculos químicos entre estos constituyentes. La naturaleza de los diferentes enlaces entre lignina y carbohidratos es compleja y está muy lejos de ser completamente entendida (Stenius, 2000). Existen bastante evidencia de que la lignina y los polisacáridos están unidos por enlaces covalentes denominados "complejo de lignina-carbohidrato" (LCC por su nombre en inglés) (Balakshin, Capanema and Berlin, 2014). A pesar de que hay cantidades relativamente bajas de estos enlaces en la madera, juegan un papel muy importante, ya que casi toda la lignina de la madera está covalentemente unida a los polisacáridos, principalmente a las hemicelulosas. Existen tres tipos de enlaces LCC: bencil éter, fenil glucósido y ésteres (Figura 2-12). Los grupos laterales de las hemicelulosas tales como L-arabinosa, D-galactosa y ácido 4-O-metil-D-glucurónico, así como los grupos terminales de las cadenas como D-xilosa en los xilanos y D-manosa (o D-glucosa) en los glucomananos, son los más comúnmente propuestos para enlazarse con la lignina. El carbono α de las unidades de fenilpropano es el lugar más probable de conexión entre la lignina y las hemicelulosas (Stenius, 2000; Balakshin, Capanema and Berlin, 2014).

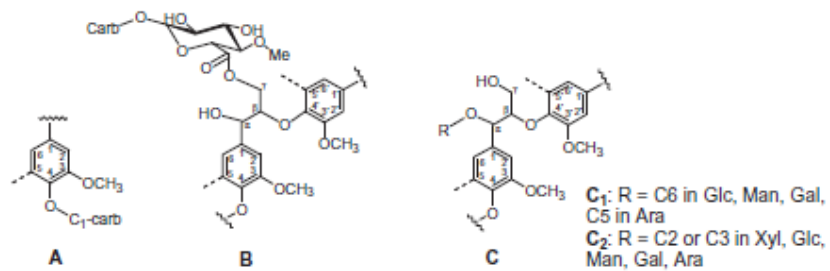


Figura 2-12. Enlaces lignina-carbohidratos típicos: A: fenil glicósido, B: éster, C: bencil-éster. Tomado de (Balakshin, Capanema and Berlin, 2014).

La existencia de enlaces lignina-carbohidratos estables crean problemas significativos en la separación selectiva de los componentes de madera en procesos de biorrefinación.

3. PRODUCTOS POSIBLES A PARTIR DE HEMICELULOSAS.

Las hemicelulosas tienen potencialmente muchos usos. Tienen una variedad de aplicaciones en productos de química fina, farmacéuticos, agrícolas, cosméticos, etc. Estos azúcares se utilizan como fuente de energía, edulcorante bajo en calorías y para la síntesis de muchos productos industriales. Por ejemplo, el furfural es un precursor de diferentes productos como combustibles, resinas, plásticos, nylon, poliéster, etc.; el xilitol es utilizado como un edulcorante bajo en calorías, los ácidos formados pueden ser utilizados en la industria alimentaria o química y se puede producir bioetanol como combustible o solvente (Area and Vallejos, 2012; Bhaumik and Dhepe, 2016).

En la Figura 3-1 se indican las posibles vías para la obtención de diversos productos químicos basados en hemicelulosas que pueden ser potencialmente producidos a partir de materiales lignocelulósicos agroindustriales.

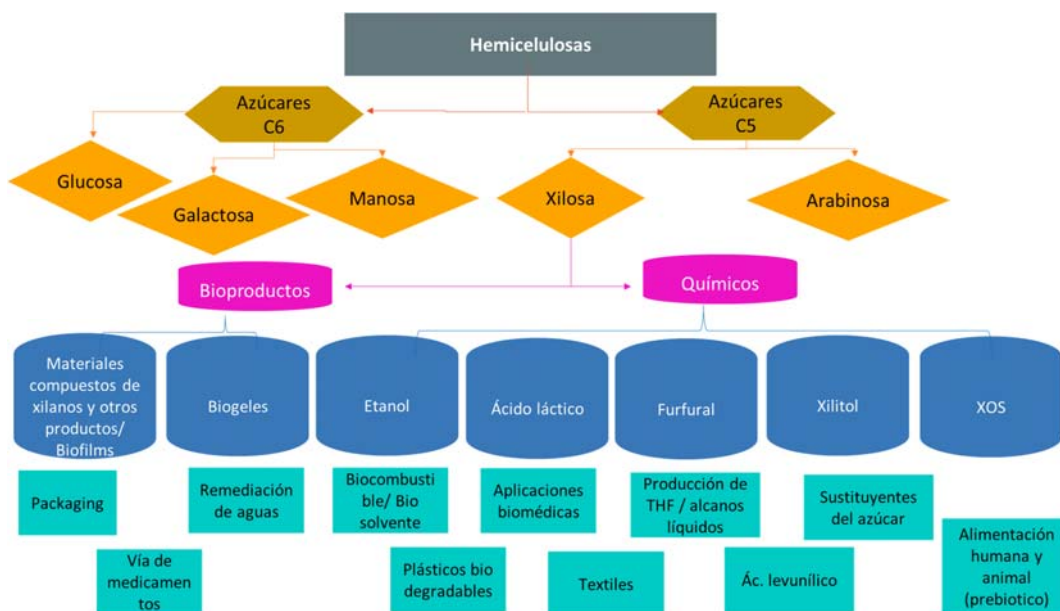


Figura 3-1. Posibles productos a ser producidos a partir de los xilanos de la biomasa lignocelulósica (Tomado de (Deutschmann and Dekker, 2012). Varios de estos productos no se producen exclusivamente a partir de xilanos, sino que se pueden producir también a partir de otros carbohidratos

Los usos actuales de las hemicelulosas a escala industrial mayoritariamente implican la producción de xilitol y furfural (Sun, Sun and Tomkinson, 2004). En los próximos ítems se hará una reseña de los productos actualmente producidos y de los potenciales productos a producir con las hemicelulosas, particularmente con los xilosacáridos provenientes de la biomasa lignocelulósica.

3.1. Bioetanol.

El uso de la biomasa para producir biocombustibles líquidos como el bioetanol ofrece soluciones atractivas para la reducción de gases de efecto invernadero (GEI), disminución de la dependencia de combustibles extranjeros, fortalecimiento de las economías rurales y el aumento de la sostenibilidad del sistema de transportes (Njoku, 2012). El bioetanol se puede utilizar de muchas maneras; sin embargo, hoy en día el uso más importante es en el sector del transporte (Mergner *et al.*, 2013).

En función de las materias primas procesadas, la producción de bioetanol se clasifica en bioetanol de primera o segunda generación (hoy día también se puede mencionar una tercera generación). El bioetanol de segunda generación se produce a partir de biomasa lignocelulósica, como los cultivos energéticos (la planta de maíz, *Miscanthus*, *Arundo donax*, etc.) y los residuos agrícolas y forestales (paja de trigo u otros cereales, bagazo, madera, ramas, etc.). Al contrario del bioetanol de primera generación, en el producido con lignocelulósicos puede utilizarse una mayor variedad de biomasa y a menudo la “planta entera”. Esto conduce a una producción a escala potencialmente mayor. Sin embargo, a pesar de que las tecnologías de segunda generación ya están disponibles a nivel laboratorio o piloto, todavía no se han implementado a nivel comercial a excepción de algunos ejemplos con una sostenibilidad aún comprometida (Mergner *et al.*, 2013; Gírio *et al.*, 2017).

El primer paso para la producción de etanol de lignocelulósicos es el pretratamiento. Para la producción de etanol combustible, las hemicelulosas se eliminan comúnmente durante la etapa inicial del procesamiento de biomasa con el objetivo de abrir la estructura para una mayor hidrólisis enzimática de celulosa. Las hemicelulosas actualmente representan la fracción más grande de polisacáridos que no son eficientemente utilizadas en las plantas piloto y de demostración de producción de etanol celulósico. Las razones se basan en la naturaleza polimérica heterogénea de las hemicelulosas y su baja fermentabilidad por las cepas microbianas industriales más comunes. (Carvalho, Duarte and Gírio, 2008; Gírio *et al.*, 2010).

El método más prometedor para la bioconversión de las hemicelulosas en azúcares fermentables es la hidrólisis enzimática, donde mayoritariamente se han estudiado las xilanasas sobre otras enzimas (mananasas, etc.) (Gírio *et al.*, 2010).

Para la producción de etanol por vía fermentativa a escala industrial se deben seleccionar microorganismos que presenten características especiales como: ser capaces de metabolizar la amplia variedad de azúcares presentes en el material lignocelulósico, principalmente xilosa, arabinosa, glucosa, galactosa y manosa, en lo posible de manera simultánea y con mínimos requerimientos nutricionales, para simplificar el proceso y reducir los costos de producción de etanol. Además de poseer altas productividades y rendimientos de etanol, los microorganismos deberían tolerar la presencia de inhibidores generados por la hidrólisis de la lignocelulosa, tener una elevada tolerancia al etanol y al estrés osmótico ocasionado por la elevada concentración de azúcares fermentables y no deberían producir subproductos indeseables (Dien, Cotta and Jeffries, 2003).

A pesar de que desde hace un par de décadas se ha intensificado la investigación y el desarrollo en la producción de bioetanol a partir de lignocelulósicos, hay dos barreras fundamentales a superar para que los procesos de producción de bioetanol lignocelulósico sean viables y económicamente competitivos. Por un lado, las celulasas para liberar glucosa a partir de celulosa son más caras que las amilasas y glucoamilasas, que están disponibles comercialmente a precios relativamente bajos para la producción de etanol a partir materias primas amiláceas (Zhao *et al.*, 2012). Por otro lado, los microorganismos etanologénicos, ya sea *S. cerevisiae* (que se ha utilizado industrialmente para la producción de etanol a partir de materias primas sacarígenas y amiláceas desde el establecimiento de esta industria), o *Z. mobilis* (que ha sido estudiada intensamente en los últimos años), no pueden fermentar los azúcares de pentosas en los hidrolizados en etanol, a velocidades y rendimientos que sean aceptables desde el punto de vista de la producción industrial. Sin considerar un uso productivo de las hemicelulosas, el bioetanol celulósico es muy caro para competir comercialmente. La producción de bioetanol a partir de ambas fracciones (celulosas y hemicelulosas) es una opción atractiva de estudiar (Carvalho, Duarte and Gírio, 2008; Gírio *et al.*, 2010). Los organismos capaces de fermentar los azúcares C5 de la biomasa lignocelulósica se pueden dividir en dos subgrupos: de origen natural y genéticamente modificados. Los microorganismos de origen natural incluyen *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, y *Pachysolen tannophilus*. Los organismos genéticamente modificados incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli* y *Zymomonas mobilis* (Silveira *et al.*, 2014). Dentro de los microorganismos fermentadores de xilosa se encuentra *E.coli* que fermenta tanto hexosas como pentosas, pero presenta baja tolerancia a inhibidores derivados del pretratamiento del material lignocelulósico reduciéndose el rendimiento de etanol. Entre las levaduras capaces de fermentar tanto glucosa y xilosa a etanol, se encuentran *Pichia stipitis*, la cual presenta altos rendimientos de etanol a partir de xilosa (Dien, Cotta and Jeffries, 2003; Silveira *et al.*, 2014).

3.2. Furfural

El furfural es un químico precursor de origen renovable que puede ser utilizado en la industria química y de productos del hogar. Fue descubierto en la década de 1820 por J. Döbereiner. En 1922 Quaker Oats Company comenzó a producir furfural a partir de cáscaras de avena, basado en un proceso batch que utiliza ácido sulfúrico concentrado. En una serie de monografías de la American Chemical Society publicadas en 1953, titulada “The Furans” se menciona que hasta esa fecha existían más de 3500 patentes relacionadas con la producción de furanos y sus derivados (Marcotullio, 2011). Hasta aproximadamente 1960, DuPont utilizó el furfural como precursor en la producción de Nylon 6-6, luego fue sustituido por precursores provenientes de la industria petrolera (Kamm, Gruber and Kamm, 2010).

El furfural es un precursor químico muy interesante, ya que es la cabeza de una familia de productos industrialmente importantes como el alcohol furfurílico, furanos, tetrahidrofurano (THF), etc. (Figura 3-2). Estos químicos al día de hoy se producen mayoritariamente a partir de petróleo, por lo que existe interés en la búsqueda de alternativas económica y tecnológicamente viables para producirlos a partir de biomasa (Kamm, Gruber and Kamm, 2010).

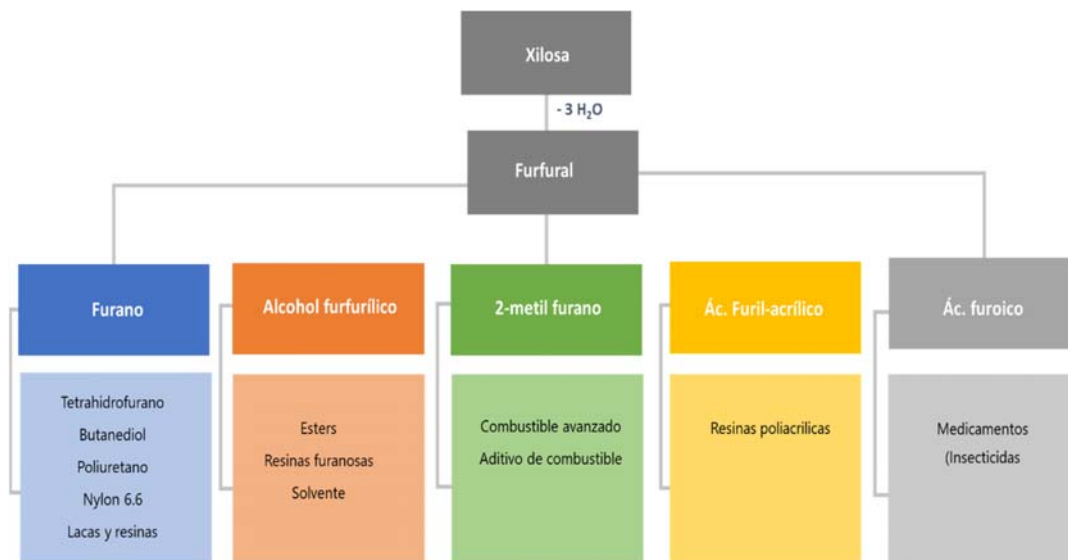


Figura 3-2. Familia de productos a partir de furfural (realizado según información de (Marcotullio, 2011; Area and Vallejos, 2012).

La mayor parte del furfural (más del 60%) es convertida en alcohol furfurílico, que se comercializa como *commodity* y se utiliza, por ejemplo, en la producción de resinas de furano. También se utiliza

como materia prima en la fabricación de furano (un intermediario en la síntesis de productos farmacéuticos, productos químicos agrícolas, estabilizantes, y productos químicos finos), y como disolvente para los aceites lubricantes de refinación, como decolorante, agente humectante, fungicida y nematocida (Kamm, Gruber and Kamm, 2010; Area and Vallejos, 2012; Bajpai, 2013).

La mayor parte de la producción de furfural actual aún se basa en versiones más o menos modificadas del proceso de Quaker Oats original (Marcotullio, 2011). Hoy en día, la mayor parte del furfural de mercado, alrededor de 300 mil toneladas/año, se produce en China, quienes utilizan fundamentalmente mazorcas de maíz como materia prima, mientras que más del 85 % de la producción de furfural se lleva a cabo en tres países: China, Sudáfrica y República Dominicana. La capacidad de producción china se caracteriza por ser ineficiente (~ 50% del rendimiento teórico) y en pequeña escala. En 2001 existían alrededor de 200 plantas en China con una producción de alrededor 1000 ton/año. Actualmente la mayor planta de producción de furfural (35 mil toneladas / año) se encuentra en República Dominicana, donde se utiliza bagazo de caña de azúcar como materia prima. Esta planta está contigua a un ingenio azucarero propiedad de “The Central Romana Corporation”, un gran productor mundial de azúcar (Marcotullio, 2011).

Las reacciones de formación de furfural se esquematizan en la Figura 3-3. Son reacciones de hidrólisis y deshidratación catalizadas por ácido y ocurren a temperaturas que oscilan entre 153 y 240 °C (Zeitsch, 2000). En estas condiciones, las pentosas (principalmente xilosa y arabinosa) pueden degradarse a productos de bajo peso molecular, principalmente ácidos orgánicos y aldehídos (Antal *et al.*, 1991; Oefner *et al.*, 1992). En las mismas condiciones, la degradación del furfural ocurre debido a reacciones de resinificación y condensación, que producen resinas y otros productos no identificados (Williams and Dunlop, 1948; Peleteiro *et al.*, 2016).

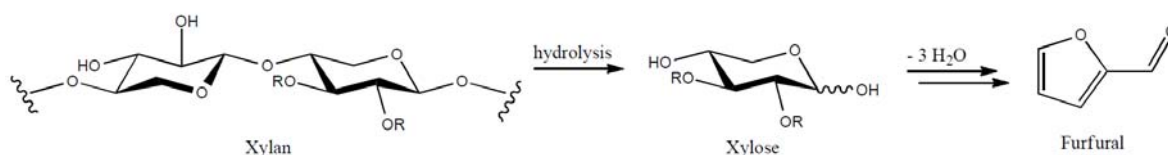


Figura 3-3. Hidrólisis de xilanos en xilosa y deshidratación de esta en furfural. Tomado de (Bariani *et al.*, 2020).

El furfural también puede sufrir fragmentación para formar varias moléculas más pequeñas, como ácido fórmico, formaldehído, acetaldehído, piruvaldehído, gluceraldehído, glicollaldehído y ácido láctico. Al igual que con la formación de furfural, estas reacciones secundarias y de pérdida son

catalizadas por los ácidos de Brønsted. Los mecanismos precisos para la formación, reacciones secundarias y de pérdida no se han aclarado por completo, y varios mecanismos se han discutido en la literatura (Antal *et al.*, 1991; Marcotullio, 2011). La producción industrial actual de furfural implica la hidrólisis ácida utilizando ácido sulfúrico o clorhídrico. Esta tecnología tiene algunos inconvenientes, incluidos los rendimientos limitados debido a las reacciones secundarias no deseadas, el alto consumo de vapor y la utilización de equipos con materiales de alto costo o corrosión de los equipos debido al uso de ácido sulfúrico caliente (Peleteiro *et al.*, 2016). La producción de furfural con ácidos minerales se puede realizar en una o dos etapas. En el proceso de una sola etapa, la despolimerización de pentosanos en xilosa y la deshidratación a furfural ocurre en el mismo reactor. En el proceso en dos etapas, la disolución y despolimerización de los pentosanos ocurren en condiciones más leves, seguidas de deshidratación de xilosa a furfural en otro reactor de menor tamaño y en condiciones ácidas más fuertes. Esto permite que el sólido remanente de la primera etapa, rico en celulosa y lignina, esté en mejores condiciones para ser utilizado en la producción de otros productos de valor agregado (bioetanol, fibras de celulosa, etc.). Además, el segundo reactor, donde se requieren condiciones ácidas más severas, es de menor tamaño, lo que conlleva a una disminución del costo de las instalaciones (Liu *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2019)

Se han desarrollado muchos estudios para mejorar la tecnología de producción de furfural con procesos que tienen mayores rendimientos y son más amigables con el medio ambiente. Estos incluyen sistemas autocatalíticos, catalizadores ácidos, sistemas bifásicos, etc. (Peleteiro *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2019). Las reacciones catalíticas representan el área con mayor desarrollo de la investigación, particularmente en el uso de ácidos sólidos (Dutta *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2019). El número de patentes que utilizan catálisis heterogénea ha aumentado durante los últimos años. Particularmente los catalizadores heterogéneos que tienen una fácil separación y recuperación serían beneficiosos en vista de los principios de la química verde (Karinen, Vilonen and Niemelä, 2011). Los resultados obtenidos hasta ahora son bastante prometedores en términos de selectividad, rendimiento y bajo tiempo de residencia. Sin embargo, muchos aspectos de la aplicación industrial de catalizadores sólidos aún requieren una evaluación cuidadosa; estos incluyen la desactivación y regeneración del catalizador, la compatibilidad del agua, la lixiviación y la viabilidad económica. Se han publicado en la literatura buenas revisiones sobre el uso de catalizadores sólidos para la producción de furfural (Karinen, Vilonen and Niemelä, 2011; Dutta *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2019).

Asimismo, también se ha investigado la producción de furfural utilizando líquidos iónicos, al igual que los nuevos métodos de separación para la formación de furfural (Peleteiro *et al.*, 2016). Sin embargo, el uso industrial de líquidos iónicos en procesos a gran escala sigue siendo difícil por razones

económicas, científicas, tecnológicas y ambientales. En particular, el costo de los líquidos iónicos es a menudo un gran inconveniente (Peleteiro *et al.*, 2016).

3.3. Xilitol

El xilitol, siendo el primer producto de base de xilosas en ser producido a gran escala y con un amplio mercado, ha generado muchísimas publicaciones y patentes referentes a su producción y aplicabilidad (Deutschmann and Dekker, 2012). Fue descubierto hace más de 100 años y sus características como endulzante bajo en calorías y agente de prevención de caries dentales lo han transformado en un componente popular de gomas de mascar, pastas dentales y productos dietéticos. También es utilizado como tratamiento parenteral y en la infección de oídos (Rao Ravella *et al.*, 2012; Vallejos and Area, 2017). Además, puede ser utilizado como precursor en la producción de ácido xilárico, glicoles (propilenglicol y etilenglicol), hidroxil furano y 1,2-propanodiol (Hernández-Pérez *et al.*, 2019). El xilitol está incluido en la lista elaborada por el Departamento de Energía de los Estados Unidos como uno de los 12 productos químicos de mayor valor agregado producidos a partir de biomasa lignocelulósica, de acuerdo con su mercado potencial (Bozell and Petersen, 2010; Biddy, Scarlata and Kinchin, 2016).

La producción de xilitol es mayoritariamente a partir de mazorcas de maíz (China), con una producción de 110.000 toneladas por año en 2012 y maderas de latifoliadas como el abedul en los Estados Unidos y Finlandia, siendo Danisco el mayor productor, utilizando hidrolizado proveniente de la industria de celulosa (Rao Ravella *et al.*, 2012; Hernández-Pérez *et al.*, 2019). Actualmente, el xilitol se produce a nivel industrial por hidrogenación química de la D-xilosa en presencia de un catalizador de níquel a temperatura y presión elevadas. Este proceso químico requiere altos costos de instalación y operación, es laborioso, y energéticamente muy intensivo. La xilosa que entra al proceso de purificación tiene que ser de alta pureza, por lo que requiere de procesos de purificación exhaustivos previo a la producción así como es necesaria la purificación del xilitol una vez producido (Rao Ravella *et al.*, 2012; Vallejos and Area, 2017).

Hay un fuerte impulso en la investigación para producir xilitol de una manera más económica y ambientalmente amigable. Una de las alternativas implica la hidrólisis de las hemicelulosas y la conversión de la xilosa de los hidrolizados crudos a xilitol por fermentación con cepas microbianas específicas. En este caso no se requeriría una purificación tan exhaustiva de la xilosa, uno de los mayores costos en la ruta de síntesis química; sin embargo, es necesaria la purificación posterior del

xilitol en el caldo de fermentación, lo que es una de las etapas críticas del proceso en términos de costos (Rao Ravella *et al.*, 2012; Vallejos and Area, 2017). Así, la producción de xilitol por procesos biotecnológicos aún no ha alcanzado su etapa industrial.

Tanto los procesos químicos como biotecnológicos para producir xilitol constan de cuatro etapas principales: (1) hidrólisis de material lignocelulósico para extraer los xilanos, (2) purificación del licor hidrolizado para obtener la solución de xilosa, (3) conversión de xilosa en xilitol, y (4) purificación de xilitol (Vallejos and Area, 2017). En la Figura 3-4 se esquematizan estas etapas.

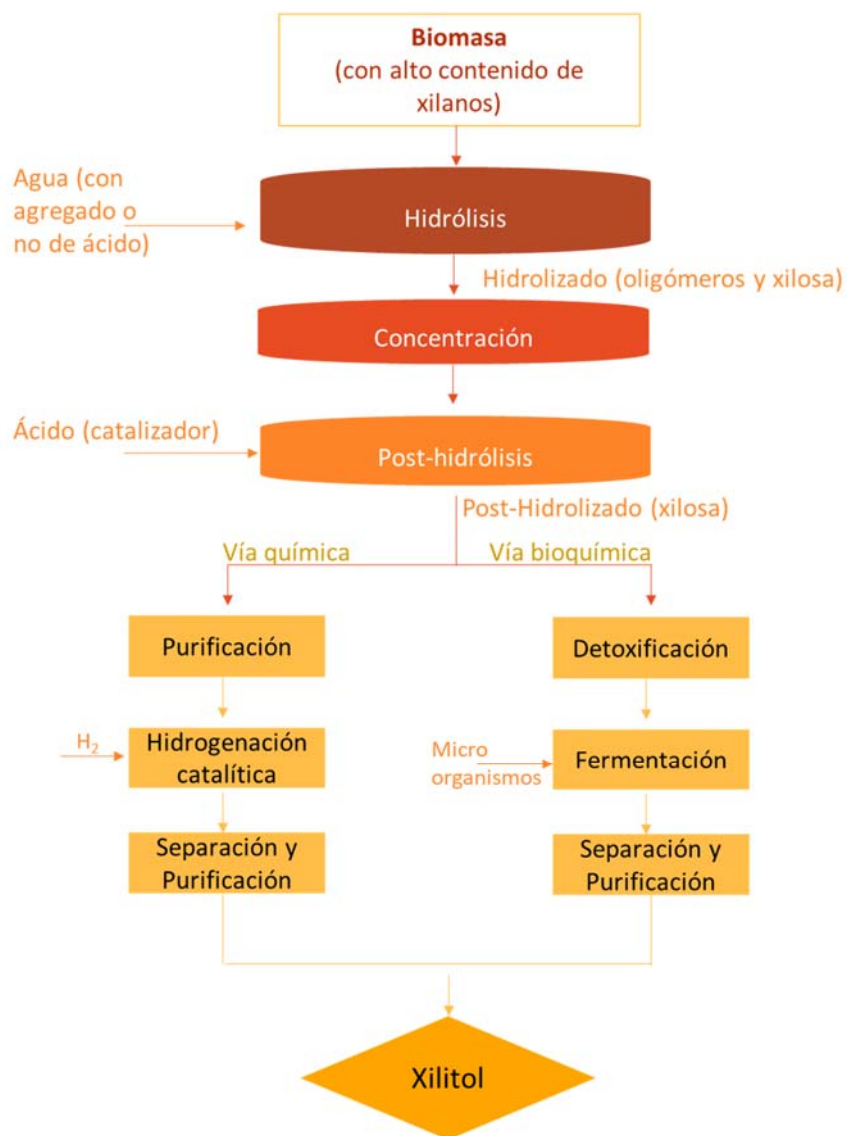


Figura 3-4. Etapas de la producción de xilitol por vía química o biotecnológica. Realizado en base a trabajos de (Hou-Rui, 2012; Vallejos and Area, 2017).

El rendimiento y la calidad del xilitol en el procesamiento químico dependen de la pureza inicial de la xilosa. La concentración de xilosa para la reacción de hidrogenación tiene que ser superior al 50%, ya que la presencia de impurezas interfiere con la reacción catalítica (Hou-Rui, 2012). Por lo tanto, son requeridas varias etapas de purificación de la solución de xilosa previo a producirse el xilitol. Del mismo modo, una vez producido el xilitol es necesario concentrar la solución y purificarla. Posteriormente, la solución concentrada de xilitol se cristaliza, normalmente en dos etapas para obtener un producto purificado (Hou-Rui, 2012; Vallejos and Area, 2017). El costo de la hidrogenación es inferior al 20% del costo total de producción de xilitol, mientras que el costo de producción de cristales de xilosa es más del 80% del costo total de producción de xilitol.

Como alternativas al método convencional, hay dos enfoques biotecnológicos que parecen prometedores: el proceso microbiano y el enfoque enzimático. En el proceso microbiano se pueden utilizar bacterias, hongos o levaduras para producir xilitol a partir de un hidrolizado de hemicelulosas, siendo la última vía la más estudiada. Éstas producen naturalmente el xilitol como un intermediario en la asimilación de la D-xilosa con la ayuda de dos enzimas: la D-xilosa reductasa (XR) y la D-xilitol deshidrogenasa (XDH). Dentro de las levaduras productoras de xilitol se destacan *Candida guilliermondii*, *Debaromyces hansenii*, *Candida tropicalis*, *Candida boidinii*, *Pachysolen tannophilus* y *Pichia stipitis*, siendo las más utilizadas las del género *Candida* (Felipe, 2004; Rafiqul and Sakinah, 2013). El rendimiento de este proceso está en un rango de 65-85% cuando se utiliza la levadura de tipo salvaje y entre 86-100% del valor teórico cuando se utilizan levaduras recombinantes (Felipe, 2004; Hernández-Pérez *et al.*, 2019).

La producción de xilitol a través del proceso microbiano está limitada por factores que incluyen el control de las condiciones de cultivo (temperatura, pH, agitación, aireación, inhibidores celulares, etc.), necesidad de nutrientes, etc. Por ello, la aplicación del proceso fermentativo a nivel industrial lleva mucho tiempo, requiriendo grandes instalaciones. Hay que considerar, además, que la producción de xilitol consume bastas cantidades de agua para diferentes usos, por ej., vapor y preparación de medios. Al mismo tiempo, las condiciones de esterilización y la preparación rutinaria de inóculos involucran consumo de energía, tiempo y mano de obra, lo que provoca una reducción de la productividad. El reciclaje celular en el proceso microbiano requiere la separación de los mismos. Por todas estas razones, el proceso con levaduras aún no tiene las ventajas del proceso químico, debido fundamentalmente a la baja productividad de xilitol y los problemas de procesamiento aguas abajo (Rafiqul and Sakinah, 2013; Vallejos and Area, 2017; Hernández-Pérez *et al.*, 2019).

Por otro lado, la producción enzimática de xilitol ofrece varias ventajas sobre la producción fermentativa, pero precisa un ambiente altamente controlado, lo que lo hace un método menos favorable (Hernández-Pérez *et al.*, 2019).

3.4. Xilooligosacáridos

Los xilooligosacáridos (XOS) son oligómeros basados en xilosa que pueden estar parcialmente sustituidos por grupos como acetilo y urónicos, dependiendo del material lignocelulósico de los que se extraen y del proceso aplicado. Tienen un grado de polimerización bajo, entre 2 -10 y están presentes naturalmente en la miel, frutas, verduras, brotes de bambú, etc., aunque en concentraciones mínimas (Mäkeläinen *et al.*, 2010; Jayapal *et al.*, 2013).

Los xilooligosacáridos sustituidos tienen algunas características específicas que están impulsando los esfuerzos de investigación para desarrollar aplicaciones en campos relacionados con la industria alimentaria y farmacéutica. Se pueden usar como fibras dietéticas solubles debido a que aportan pocas calorías y presentan propiedades organolépticas aceptables. Además, son no carcinogénicos y actúan como prebióticos que promueven el crecimiento de las bifidobacterias en el colon (Nabarlatz, Ebringerová and Montané, 2007). Los prebióticos son principalmente fibras alimenticias no digeribles en el estómago, que afectan de manera beneficiosa la salud del huésped al estimular selectivamente el crecimiento y / o actividad de algunos géneros de microorganismos en el colon, generalmente lactobacilos y bifidobacterias (Pandey, Naik and Vakil, 2015). Una estrategia que se utiliza para estimular el crecimiento y la actividad de la flora microbiana benéfica en el intestino frente a la flora patógena es incorporar en los alimentos bacterias como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* acompañadas por prebióticos (Kabel, 2002). Ejemplos de prebióticos comúnmente utilizados en la alimentación humana son los galactooligosacáridos, fructooligosacáridos (FOS), inulina y sus hidrolizados (Sanz, Gibson and Rastall, 2005; Pandey, Naik and Vakil, 2015).

Los XOS han sido considerados durante varios años como uno de los nuevos productos prebióticos de mayor potencial. El mercado mundial de ingredientes prebióticos se estimó en USD 4.07 Mmillones en 2017, y se espera que alcance un valor de USD 7.37 Mmillones para 2023 (Amorim *et al.*, 2019). Si los XOS se pudieran producir de manera rentable podrían desempeñar un papel importante en la ampliación de los mercados de prebióticos en todo el mundo. En el Proyecto AFORE (del 7^{mo} Programa Marco de la Unión Europea), Danisco demostró que los xilanos provenientes de la madera podrían ser una potencial materia prima para la producción XOS de alta pureza (Afore, 2013).

Sin embargo, la producción de XOS es aún más costosa que otros prebióticos. Hay un amplio consenso que la forma de superar estas barreras es mediante el uso de residuos lignocelulósicos baratos y abundantes como materia prima y aplicando estrategias integradas de procesos enmarcadas en una biorrefinería (Afore, 2013; Amorim *et al.*, 2019).

Las propiedades estructurales, así como el nivel de polimerización (DP) y de sustitución de la cadena de los oligosacáridos son muy importantes para sus usos como prebióticos, ya que la estructura influye en la actividad prebiótica. Sanz *et al.* (Sanz, Gibson and Rastall, 2005) estudiaron la influencia de los enlaces en los grupos glicosídicos y llegaron a la conclusión que los enlaces 1-2, 1-4 y 1-6 generan altos índices prebióticos. Makelainen *et al.* (Mäkeläinen *et al.*, 2010) analizaron el efecto prebiótico de XOS y FOS comerciales de distintos orígenes y con diferente grado de polimerización y distribución de pesos moleculares (DP2, DP entre 2-5, DP entre 2-10 y con DP entre 35-40 (xilanos)) en un simulador de colon. Concluyeron que los XOS comerciales con DP entre 2-5 y entre 2-10 mejoraron el crecimiento de bifidobacterias, y que los XOS con mayor grado de polimerización mejoraron significativamente el crecimiento de *B.lactis*. Los xilanos no fueron tan bien utilizados por los microbios del colon, aunque la fermentación de xilanos también dio como resultado un aumento en el número de las bifidobacterias totales. Por su parte, Van Craeyveld *et al.* (Van Craeyveld *et al.*, 2008) trabajaron con preparaciones de arabinoxilosacáridos (AXOS) de distintos grados de polimerización y niveles de sustitución de las cadenas a partir de salvado de trigo. Reportaron efectos diversos dependiendo del nivel de polimerización, DP bajos (≤ 3), DP altos (60) y preparaciones con DP entre 12 y 15 pero grados promedio de sustitución diferentes. De todos los AXOS probados, las muestras con grado de polimerización medio de 5 y grado de sustitución del 27 % de las unidades fueron las que mostraron la mejor combinación de efectos deseables sobre las características de salud intestinal. Por su parte, Moura *et al.* (Moura *et al.*, 2008) utilizaron xilosacáridos provenientes de eucalipto, mazorcas de maíz y granos de cebada residuales de la industria cervecera y prepararon XOS con distintos rangos de DP, entre 2- 25, 2-14, 3-12 y 2-5, los que fueron evaluados en el tracto gastrointestinal de cerdos. Indicaron que los XOS de cadena corta se consumían mucho más rápidamente que los de cadena más larga, por lo que sugieren que estos últimos persistirán en todo el tracto gastrointestinal y por ello presentan mejores propiedades. Por lo antes expuesto, no hay consenso aún sobre cuáles son las cualidades de los XOS a producir y es un área donde aún resta mucha investigación por realizar.

La composición y la estructura de los XOS es influenciada por la fuente del material y el proceso de producción. Los procesos generales utilizados para aislar a los xilooligosacáridos a partir de materiales lignocelulósicos se esquematizan en la Figura 3-5.

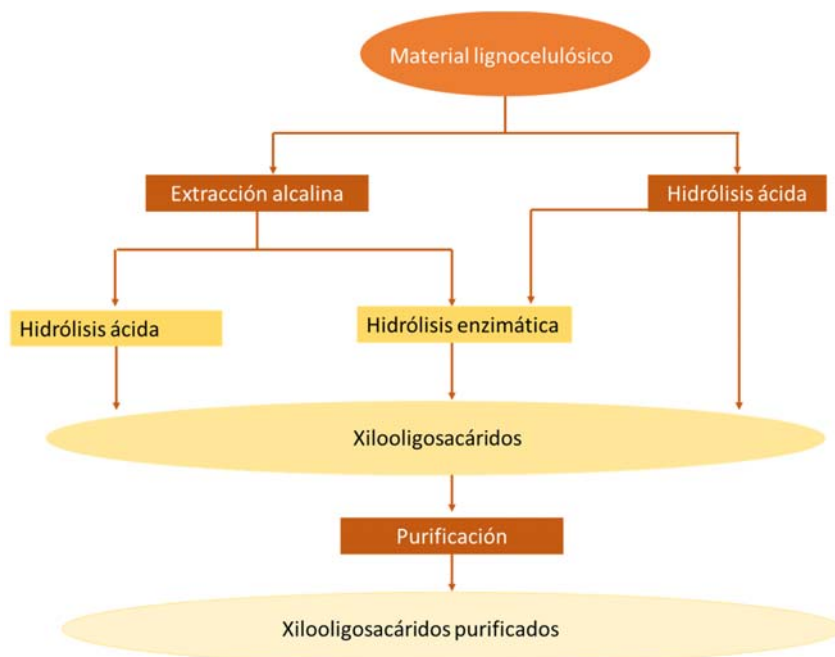


Figura 3-5. Esquema de obtención de XOS a partir de materiales lignocelulósicos (realizado en base a (Marcondes, 2018))

Dentro de la hidrólisis ácida se encuentra el tratamiento hidrotérmico o autohidrólisis que se lleva a cabo en medios ligeramente ácidos debido a la escisión parcial de grupos acetilo, que produce ácido acético. Este tratamiento es uno de los más utilizados para la producción de XOS. Los xilooligosacáridos producidos mantienen una fracción significativa de grupos acetilo y ácidos urónicos conectados y esto les da características particulares, como una muy alta solubilidad en agua. Además, si se realiza la autohidrólisis a temperaturas moderadas produce XOS de mayor peso molecular, sin modificar sustancialmente la celulosa y lignina. Mediante el control de la temperatura y el tiempo de reacción es posible influir en las características de los xilooligosacáridos tales como el contenido de acetilos y la distribución de masa molar, sin embargo, la naturaleza del material es determinante (Nabarlatz, Farriol and Montane, 2004, 2005; Azevedo Carvalho *et al.*, 2013).

La hidrólisis alcalina se ha mostrado como la mejor alternativa para separar los xilanos y que queden expuestos a un tratamiento posterior ya sea químico o enzimático. Sin embargo, al no preservar los grupos acetilos presentes, la solubilidad en agua de los xilanos es menor que en otros pH (Akpınar, Erdogan and Bostancı, 2009; Azevedo Carvalho *et al.*, 2013).

Existen numerosos ejemplos en la bibliografía donde se producen XOS con diferentes tecnologías de pretratamiento y materiales lignocelulósicos. En la Tabla 3-1

referencia. se listan algunos de los trabajos encontrados en bibliografía a modo de ejemplos de las diferentes condiciones y materiales a utilizar y los resultados obtenidos. En general, los tratamientos enzimáticos permiten tener los XOS con niveles de polimerización más estrechos, mayoritariamente como DP 2-3, mientras que los métodos químicos, muestran una distribución más amplia de los DP.

Dado que el tratamiento químico en medios acuosos no es selectivo, la obtención de XOS con alta pureza requiere refinación y muchas veces, concentración. Este es un problema difícil, que ha sido abordado en la literatura por numerosas estrategias, incluyendo etapas de autohidrólisis secuenciales, adsorción, extracción con solventes, intercambio iónico, separación cromatográfica o por tecnologías de membranas, entre otras (Vázquez *et al.*, 2005; Nabarlatz, Ebringerová and Montané, 2007; Gullón *et al.*, 2017). Varias de estas tecnologías serán discutidas en un Capítulo siguiente, por ello no son abordadas aquí.

Biomasa lignocelulósica	Pretratamiento	Condiciones pretratamiento	XOS	DP	Referencias
Bagazo de caña de azúcar	Tratamiento ácido o explosión de vapor catalizada con H ₂ SO ₄ o SO ₂ .	Tratamiento ácido: H ₂ SO ₄ 0,1-0,5 %, 121-150°C, 15-60 minutos. Explosión de vapor: 130 -200 °C, 5 – 30 minutos, H ₂ SO ₄ : 0,1 -3 %, SO ₂ 0,9 %	Valores máximos de recuperación de xilosacáridos entre 60-70 %. En esos casos, 40 % corresponden a XOS	Distribución homogénea entre DP 2-6 y fracción mayores que DP 6.	(Carvalho <i>et al.</i> , 2018)
Bagazo de caña de azúcar	Tratamiento alcalino / Tratamiento enzimático	10% KOH a 70 °C, 5% KOH a 121 °C y 24% KOH a 35 °C / endoxilanas 120 U/g AXOS extraído	Extracción 10,3- 19,6 % de los xilanos originales. De estos 11,7 - 17,8 % se encuentran como XOS. No se indica DP.		(de Figueiredo <i>et al.</i> , 2017)
Bagazo de caña de azúcar	Tratamiento hidrotérmico o ácido	Entre 138 °C y 200 °C por 5 a 55 minutos, 0 a 1,3 % H ₂ SO ₄	Recuperación entre 8 y 56 % de los xilosacáridos iniciales, 43% como XOS en la mejor condición.		(Marcondes, Milagres and Arantes, 2020)
Rastrojo de maíz	Autohidrólisis. Posterior purificación y concentración con membranas, liofilizado e intercambio iónico.	Calentamiento no isotérmico. 1-Autohidrólisis una etapa hasta 205 °C, 2- 2 etapas: 130 °C y 205°C	13,65 g/L XOS luego de purificación, concentraciones menores de otros compuestos. No se indica DP		(Buruiana <i>et al.</i> , 2017)
<i>Eucalyptus globulus</i>	Autohidrólisis (2- etapas). Posterior concentración y purificación por membranas y liofilizado	130 °C para remover extractivos, 175 °C, 9 minutos	XOS 40,4 g/L, 88% pureza luego concentración y purificación.	DP < 12	(Gullón <i>et al.</i> , 2011)
Paja de trigo	Explosión de vapor / hidrólisis enzimática	200 °C, 4 minutos/ endoxilanas 4-8 U/mL, 4-24 horas	28,5 g/L	16,8 - 25,5% monómeros y otros productos; 62,8 -70,3% DP 2-6; 9,2 -20,4 DP > 6	(Álvarez <i>et al.</i> , 2017)
Liquidámbar	Autohidrólisis. Purificación con resinas de adsorción y liofilizado	180 °C, 40 minutos	6,3 % XOS/b.m.s (51 % de los xilosacáridos extraídos). 66% XOS en polvo liofilizado. No indican DP		(Huang <i>et al.</i> , 2016)
Licor preextraído de pulpa de disolución (no se indica especie de madera)	Tratamiento alcalino/Concentración por membranas/tratamiento ácido o tratamiento enzimático	Trat. alcalino: no se indican condiciones. Trat. Ácido: 0,1 – 2,0 % H ₂ SO ₄ ; 70-135 °C, 15-70 minutos Trat. Enzimático: 1- 24 horas, 50-150 UI/g	Mayor rendimiento de XOS=45.2% con 1% H ₂ SO ₄ a 120 °C, 60 minutos. Trat enzimático: XOS del 43,0% con 120 UI g sustrato por 8 h.	XOS principal de hidrólisis ácida fue X6, mientras que X2 y X3 fueron los principales de la hidrólisis enzimática	(Wang <i>et al.</i> , 2018)

Tabla 3-1. Diferentes biomasa y tratamientos para la producción y purificación de XOS .

3.5. Xilanos

Los xilanos poliméricos a pesar de su abundancia, aún no se han explotado y comercializado como biopolímeros aislados y altamente purificados debido posiblemente a sus costos de producción (Edlund, Ryberg and Albertsson, 2010; Mikkonen and Tenkanen, 2012). Sin embargo, existe un interés creciente en las aplicaciones de los xilanos como polímeros. Las principales líneas de investigación basadas en xilanos se han centrado en la formación de biofilms, recubrimientos, espumas, geles, así como las modificaciones químicas de los xilanos para la producción de los productos antes mencionados (Area and Vallejos, 2012; Deutschmann and Dekker, 2012).

Para la producción de estos materiales, la estructura molecular de las hemicelulosas determina las propiedades de los compuestos preparados a partir de estos polisacáridos. La solubilidad y las propiedades reológicas están fuertemente relacionadas con la estructura y con el tratamiento realizado. Para la preparación de biomateriales deben ser consideradas propiedades estructurales, tales como la composición química, el grado de polimerización, grado de sustitución y el patrón de sustitución. La sustitución de la cadena de xilanos puede ser un factor clave que influye por ejemplo, en la solubilidad en agua. Además, los sustituyentes y el patrón de sustitución del polímero dependen de la naturaleza del material y es afectado por la forma en que los xilanos son extraídos y purificados (Ebringerova *et al.*, 2000). Del mismo modo, la modificación química de los xilanos es una estrategia válida para modificar sus propiedades.

3.5.1. Biofilms

Los bioplásticos en general han atraído gran atención como potencial reemplazo de productos plásticos convencionales producidos en base a petróleo (Deutschmann and Dekker, 2012; Brodin *et al.*, 2017). En Uruguay, el consumo de plásticos convencionales fue de 28.449 ton en 2016 (Baraibar and Andrada, 2017). Los plásticos son populares porque son a la vez económicos, livianos, resistentes a la oxidación, inalterables a los agentes atmosféricos y versátiles. Sin embargo, estas mismas propiedades los convierte en residuos difíciles de eliminar y, por ende, en un grave problema ambiental (Valero-Valdivieso, Ortegón and Uscategui, 2013). En los últimos años, han surgido muchos tipos nuevos de bioplásticos. Los mismos se dividen en dos grupos principales. Por un lado, están aquellos biopolímeros que tienen una nueva estructura química prácticamente desconocida hasta hace unos años en relación con los plásticos (por ejemplo, nuevos poliésteres de base biológica como el PLA); mientras que, por otro lado, están los denominados sustitutos de base biológica, con la misma estructura química que el plástico convencional, pero de base biológica. Dentro de estos,

los más destacados son el Bio-PET y el polietileno de base biológica (Bio-PE) (Brodin *et al.*, 2017; IfBB-Institute for Bioplastics and Biocomposites, 2019).

El número de publicaciones científicas y patentes sobre películas basadas en xilanos y mananos ha aumentado en los últimos años. Las películas y recubrimientos de materiales renovables tienen numerosas aplicaciones potenciales en la industria alimentaria y médica, incluyendo envases de alimentos, apósitos para heridas, y vehículos de medicamentos (Deutschmann and Dekker, 2012; Mikkonen and Tenkanen, 2012). La formación de biofilms a partir de acetatos de hemicelulosas ya era reportado en 1949 por Smart y Whistler (Smart and Whistler, 1949).

Como ha sido mencionado, la capacidad de formación de película de los xilanos es, entre otras, función del grado de polimerización y de la heterogeneidad del polímero, la frecuencia y regularidad de los sustituyentes, así como la naturaleza química. De estas características dependerán las propiedades de barrera mecánicas y térmicas de las películas y recubrimientos a base de xilanos. Poseen propiedades atractivas como bajo nivel de permeabilidad al oxígeno y de aromas y alta transmitancia de luz, que lo hace adecuado para aplicaciones de embalaje (Hansen and Plackett, 2008; Mikkonen and Tenkanen, 2012). Aunque la mayoría de las preparaciones de xilanos puros no forma películas, con la adición de otros materiales poliméricos, como quitosano, nanofibras de celulosa y otras fibras, glucomananos o alcohol polivinílico, etc, o mediante la modificación química de los xilanos se puede lograr la formación de película y con ello mejorar las propiedades de barrera mecánica y de permeabilidad (Hansen and Plackett, 2008; Deutschmann and Dekker, 2012; Mikkonen and Tenkanen, 2012). A continuación, se presenta una reseña de las diferentes estrategias utilizadas para la producción de biofilms a partir de xilanos y los resultados obtenidos.

En los trabajos de Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2011) y Heikkinen *et al.* (Heikkinen *et al.*, 2013) se evaluó como la sustitución de las cadenas de xilanos afectan las capacidades de adsorción de agua y propiedades de tracción de los films formados. En ambos casos concluyeron que el grado de sustitución es muy importante en las propiedades de los films formados, trabajando el primero con salvado de trigo (rico en arabinoxilanos) extraído en medio alcalino y precipitando diferentes fracciones con etanol y el segundo utilizando distintos arabinoxilanos provenientes de harina de trigo. Cuanto más irregular era la cadena de xilanos en solución, menos cristalino resultó el material obtenido al quitar el disolvente y por lo tanto mayor la probabilidad de formar una película autoportante de xilanos. Se encontró también que el número de unidades xilosa sin sustituir afecta la solubilidad en agua y provoca un aumento de la cristalinidad de la película.

Consecuentemente, los xilanos menos sustituidos son más cristalinos y menos solubles en agua o etanol (Zhang *et al.*, 2011; Heikkinen *et al.*, 2013).

El uso de plastificantes es generalmente necesario para mejorar la flexibilidad del film. En el caso de los films de hemicelulosas, los plastificantes más utilizados son polioles como el sorbitol, xilitol y glicerol (Hansen and Plackett, 2008). Gabriell *et al.* (Gabriell *et al.*, 2000) trabajaron con xilanos extraídos de madera de álamo. A partir de 5% de adición de quitosano se comienza a observar la formación de films, mientras que a partir de 10% se observan films autoportantes. Sin embargo, se encontró que las películas con altas cantidades de xilanos presentaban elevada fragilidad. Al tratarse de una estructura lineal, produce un alto poder de empaquetamiento de las cadenas. La capacidad de las hemicelulosas para cristalizar está probablemente afectada por el proceso de extracción alcalino utilizado. Los grupos acetilo que están presentes en los xilanos nativos impiden que la cadena de xilanos cristalice. Estos grupos acetilo son eliminados en el proceso de extracción, lo que deja xilanos con una mayor capacidad para cristalizar. Por otro lado, cuando se embeben en agua, las películas conteniendo entre 5 y 20 % de quitosano forman hidrogeles, mientras que las que contienen más de 20% de quitosano se disuelven en agua. Las propiedades de formación de películas e hidrogeles se atribuyeron a fracciones cristalinas de xilanos unidas a cadenas de quitosano, así como a las interacciones electrostáticas entre los grupos ácidos en las hemicelulosas y los grupos amino de los quitosanos (Gabriell *et al.*, 2000). Gröndahl *et al.* (Gröndahl, Eriksson and Gatenholm, 2004) trabajaron con xilanos extraídos por tratamiento alcalino a partir de madera de álamo. Prepararon films mezclando los glucuronoxilanos con xilitol o sorbitol como agentes plastificantes y agua desionizada. El contenido de los polioles se varió entre 20 y 50% en peso. Los films preparados solo con glucuronoxilanos son muy frágiles y fragmentan al ser secadas. Las posibles explicaciones de la pobre capacidad de formación de película pueden ser la longitud insuficiente de la cadena del polímero, alta temperatura de transición vítrea, o baja solubilidad. Al añadir sorbitol o xilitol se formaron films transparentes continuos, flexibles y que presentan menor temperatura de transición vítrea, teniendo además una buena cohesión mecánica. Las películas con 35% de sorbitol exhibieron excelentes propiedades de barrera de oxígeno a 50% de HR. La permeabilidad al oxígeno fue menor que la de almidón plastificado y en el mismo rango que el del material polimérico sintético usado comercialmente (EVOH) (Gröndahl, Eriksson and Gatenholm, 2004). Mikkonen *et al.* (Mikkonen *et al.*, 2009) analizaron también al glicerol y sorbitol como plastificantes en films preparados con arabinoxilanos extraídos de cáscara de avena. Las propiedades de tracción de los films variaron con el tipo y la cantidad del plastificante. Para films con 10% (p / p) de plastificante el resultado fue el inverso, los que contenían glicerol tenían mayor resistencia a la tracción que los que contenían

sorbitol, pero con un 40 % de contenido de plastificante. Asimismo, los films con sorbitol conservaron mejor sus propiedades de tracción durante 5 meses de almacenamiento y tuvieron menos permeabilidad al vapor de agua, mientras que la permeabilidad al oxígeno fue similar.

Analizando las potencialidades comerciales de estos productos, cabe destacar que en 2008 y posteriormente en 2013, la empresa sueca Xylophane® (Figura 3-6) registró patentes en películas de hemicelulosas, indicando que las mismas utilizan hemicelulosas poliméricas (en particular xilanos) con un peso molecular de menos de 50 000 g/mol, y al menos un componente seleccionado de un grupo constituido por plastificantes, celulosa y un oligómero sintético. También se describe que dicha película puede ser utilizada para recubrimientos flexibles para envasado y como una barrera para el oxígeno, aromas y/o grasa (Gatenholm *et al.*, 2008; Gröndahl *et al.*, 2013).



Figura 3-6. Muestras de xilanos extraídos y de los biofilms formados. Tomada de <http://www.xylophane.com/>

Otra alternativa muy estudiada es la producción de films de xilanos con otro copolímero de cadena larga y origen biológico, de forma de mejorar las resistencias mecánicas y la hidrofobicidad. Entre ellos el quitosano, CMC (carboximetilcelulosa) o más recientemente las nanofibras de celulosa han sido reportados con resultados satisfactorios en cuanto a la mejora de las propiedades fisicoquímicas y resistencias mecánicas de los films (Saxena *et al.*, 2009; Hansen *et al.*, 2012; Schnell *et al.*, 2017).

Por otro lado, la modificación química de los xilanos ya sea por modificación interna o a nivel de superficie es una manera de evitar los problemas de hidrofiliidad y resistencia de los films (Mikkonen *et al.*, 2015; Sousa *et al.*, 2016). Al igual que la celulosa, las hemicelulosas tienen abundancia de grupos hidroxilo libres distribuidos a lo largo de la cadena principal y secundarias, y es, por lo tanto, un candidato ideal para la funcionalización química (Alekhina *et al.*, 2014; Vega *et al.*, 2016). Mediante la formación de derivados de hemicelulosas a través de la funcionalización de algunos grupos hidroxilos disponibles, propiedades tales como la cristalinidad, la solubilidad, y la hidrofilia pueden ser modificadas. Se han explorado estas opciones utilizando técnicas tales como esterificación, eterificación, o “grafting”. Se han formado ésteres de hemicelulosas a través de

reacciones con cloruros o anhídridos. Por ejemplo, la acetilación de la hemicelulosas se puede realizar bajo condiciones similares que para la celulosa con un aumento previsto de la hidrofobicidad y de procesabilidad térmica (Fang *et al.*, 2000; Gröndahl *et al.*, 2003). Se han explorado también reacciones de eterificación, incluyendo carboximetilación, alquilación y bencilación (Mikkonen *et al.*, 2015; Sousa *et al.*, 2016). Asimismo, los grupos hidroxilos libres de las hemicelulosas se han utilizado como sitios iniciales para llevar a cabo polimerizaciones de una serie de monómeros por grafting (Hansen and Plackett, 2008; Laine *et al.*, 2013; Petzold-Welcke *et al.*, 2014; Vega *et al.*, 2016). Particularmente, en el trabajo de Li & Pan (Li and Pan, 2018) se presenta una revisión completa de las diferentes estrategias realizadas para modificar los xilanos para su utilización como films.

3.5.2. Hidrogeles

Los denominados hidrogeles refieren a redes tridimensionales, hidrófilas y poliméricas capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos. Reciben cada vez mayor atención debido a muchas propiedades favorables, tales como la hidrofilia, la consistencia que imita a los tejidos blandos, alta permeabilidad a los metabolitos y al oxígeno, y a su capacidad de recuperación (Peppas *et al.*, 2000).

Otra característica interesante es que las diferentes funcionalidades pueden ser incorporadas en el reticulado, física o químicamente, para producir hidrogeles “inteligentes” Estos hidrogeles exhiben múltiples respuestas a los cambios en las condiciones externas, tales como temperatura, pH, salinidad, campo eléctrico, y el entorno químico, y por lo tanto son materiales altamente atractivos en los campos de medicina, biotecnología y medioambiente. Particularmente en medicina, los hidrogeles pueden ser ampliamente utilizados como materiales de tejidos, cartílagos y tendones, así como biosensores, lentes oculares, portadores inmovilizados para la encapsulación de células vivas, materiales de barrera y como sistemas de suministro controlado de fármacos. En este último caso, los hidrogeles sensibles a cambios de pH han recibido considerable atención en el campo de la administración oral de fármacos, no sólo porque podrían proteger el medicamento contra la desnaturalización ácida y reducir la estimulación nociva de las drogas en el estómago, sino también porque podrían prolongar el tiempo de residencia de las drogas y reducir la frecuencia de dosificación (Sun *et al.*, 2013).

Entre la amplia variedad de macromoléculas utilizadas para la formación de hidrogeles, los polisacáridos son particularmente ventajosos en comparación con polímeros sintéticos, debido a que son biocompatibles, biodegradables, no tóxicos y económicos frente a otras moléculas (Peng *et al.*, 2011). Reportes de Ebringerova *et al.* (Ebringerova *et al.*, 2000; Ebringerova, Hromadkova and Heinze, 2005), entre otros, indican que los xilanos se digieren poco en el entorno fisiológico del estómago, pero son consumidos por las bacterias anaeróbicas en el colon. Esta propiedad única de los xilanos le brinda ventajas en la preparación de hidrogeles sensibles al pH para la liberación controlada de fármacos orales.



Figura 3-7. Hidrogel formado con glucomananos y sorbitol. Tomado de (Tenkanen *et al.*, 2016).

Particularmente, Gabrielli *et al.* (Gabrielli and Gatenholm, 1998; Gabrielli *et al.*, 2000) ensayaron hidrogeles producidos a partir de hemicelulosas de latifoliadas y quitosano. En (Gabrielli and Gatenholm, 1998) se ensayaron hidrogeles con quitosano y xilanos de abedul obtenidos comercialmente (Sigma), observando que películas con un contenido de quitosano por debajo de 30% se hincharon en agua, formándose hidrogeles. La presencia de hasta un 15% de quitosano no afecta en gran medida el grado de hinchamiento. Sin embargo, la adición de 15 a 30% de quitosano resulta en un aumento considerable de la absorción de agua. Por encima de 30% de quitosano, las muestras comenzaron gradualmente a disolverse durante las mediciones de hinchamiento, mientras que películas de quitosano puro se disuelven fácilmente en agua. Se estudió el comportamiento de los hidrogeles frente a estímulos externos, tales como el pH y la concentración de sal, demostrando que los hidrogeles formados responden de una manera reversible a los cambios en los estímulos ambientales. El grado de hinchamiento es significativamente menor cuando se trabaja en medio alcalino. Este trabajo propone que el hinchamiento es causado por la diferencia entre la presión osmótica de los iones móviles en el gel y en la solución circundante, que se describe por la teoría de Donnan.

En un trabajo posterior del grupo (Gabrielii *et al.*, 2000) se formaron hidrogeles de quitosano y xilanos aislados de álamo mediante una extracción con alcalina y posterior ultrafiltración. Estructuralmente estaban conformadas por una cadena principal de (1-4) β -D-xilano sustituida por ácido 4-O-metil-D-glucorónico en la C2, aproximadamente cada 8 unidades de glucosa. No se encontraron grupos acetilo y sólo se determinaron pequeñas cantidades de lignina. Cuando se sumergen en agua caliente, las películas con 5-20% de quitosano formaron hidrogeles y el grado de hinchamiento de los hidrogeles aumentó a medida que las películas contienen más quitosano. Films con más de 20% de quitosano se disuelven en agua. Las propiedades de formación de películas y de hidrogel se atribuyeron a la estructura cristalina de los xilanos ligados a las cadenas de quitosano, así como a las interacciones electrostáticas entre los grupos ácidos de la hemicelulosa y los grupos amino en el quitosano.

Se han extraído xilanos de eucaliptos (*Eucalyptus urograndis*) con el objetivo de estudiar la preparación de hidrogeles a ser utilizados como vehículos que permitan la distribución de fármacos en el cuerpo humano. El trabajo de Fonseca Silva *et al.* (Fonseca Silva *et al.*, 2011) hace hincapié en el efecto de los grupos acetilo mediante la comparación de xilanos con características estructurales diferentes, por ejemplo, la presencia o ausencia de los mismos. Se extrajeron xilanos acetilados y no acetilados utilizando DMSO y KOH. Para las preparaciones de hidrogeles, se conjugaron las cadenas principales de xilanos con 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA) y los hidrogeles obtenidos se caracterizaron en términos de su morfología, capacidad de hinchamiento, y propiedades reológicas. Los resultados mostraron que los hidrogeles producidos con xilanos no acetilados tenían un contenido de agua más altos que los producidos con xilanos acetilados. Por otro lado, los hidrogeles presentan diferentes morfologías macroscópicas; los geles elaborados a partir de xilanos no acetilados son más suaves, mientras que los producidos de xilanos acetilados son más difíciles de gelificar y lucen similares a un sólido. Todas las formulaciones ensayadas produjeron geles con estructuras porosas en las que el tamaño de los poros parece ser afectado tanto por el tipo de xilanos como por su nivel de sustitución. Las propiedades reológicas están fuertemente relacionadas con el número de enlaces intermoleculares formados en los hidrogeles. La densidad de reticulación de la red parece afectar también la absorción de agua (hinchazón) y el comportamiento de los hidrogeles; una red menos densa confiere más volumen libre y consecuentemente más capacidad de absorber agua. El comportamiento de hinchamiento de un hidrogel es un parámetro importante para la liberación del fármaco porque determina la concentración óptima de carga de fármaco.

3.5.3. Xilanos o derivados como modificadores de superficies.

El uso de polisacáridos derivados de la biomasa como agentes modificadores de superficie es un enfoque atractivo para la ingeniería de materiales fibrosos, particularmente mejorando las propiedades mecánicas de las fibras y actuando en la industria papelera como agentes de retención y auxiliares en el estucado (Vega *et al.*, 2016). Es generalmente aceptado que una parte de los xilanos disueltos en las primeras etapas de pulpeo se adsorberá / precipitará en las fibras de la pulpa a medida que avanza la cocción (Sjöström, 1993; Danielsson and Lindström, 2005).

Para comprender el mecanismo de la reposición de xilanos durante el pulpeo alcalino, la mayoría de los estudios han sido llevados a cabo en condiciones alcalinas y a altas temperaturas. De los mismos se han obtenido las siguientes conclusiones. La adsorción de xilanos se mejora mediante una reducción del pH, dentro del dominio alcalino (Danielsson and Lindström, 2005; Köhnke, 2010). Esto se debe, hasta cierto punto, a la disminución en la repulsión de carga negativa entre la superficie de celulosa y los residuos de ácidos urónicos de los xilanos (Köhnke, 2010). La adsorción ocurre a mayor extensión a mayor fuerza iónica, que probablemente es el resultado de minimizar la repulsión de carga negativa al enmascarar las cargas negativas por otros iones (Köhnke, 2010). Respecto al peso molecular de las cadenas, la bibliografía indica que se necesita una longitud mínima de la cadena principal de al menos 15 residuos de xilosa para la adsorción de xilanos (Alén, 2000; Kabel *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta la termodinámica, los polímeros más largos tienen una fuerza impulsora más fuerte para la adsorción, porque pierden menos entropía (por unidad de masa) tras la adsorción (Alén, 2000). Sin embargo, dado que las fibras de pulpa son porosas, el peso molecular de una molécula adsorbente, es decir, el tamaño molecular tiene impacto en el área superficial accesible y, por tanto, en la cantidad adsorbida (Alén, 2000; Köhnke, 2010).

Por lo antedicho, es aceptado el agregado de xilanos a las fibras (particularmente de fibra larga) durante el procesamiento de la pulpa de celulosa para facilitar el refinado y mejorar las propiedades mecánicas de la red de fibras (Rydholm, 1965; Schönberg *et al.*, 2001).

Considerando que los xilanos son polisacáridos y la química de estos es muy conocida, es factible introducir diferentes grupos funcionales a las cadenas, tal de facilitar la interacción con las fibras y añadir nuevas funcionalidades (Vega *et al.*, 2016). Dentro de estos, la cationización es uno de los procedimientos más estudiados (Bai, Hu and Xu, 2012). La industria papelera utiliza polisacáridos catiónicos para mejorar las propiedades papeleras. Estos polisacáridos modificados están cargados positivamente para favorecer las interacciones con las fibras de celulosa, que como se mencionó, están cargadas negativamente. Normalmente, la cationización consiste en la derivatización de los

polisacáridos con un reactivo catiónico, por la eterificación de los grupos hidroxilos. Para esta aplicación, el almidón cationizado es el reactivo más utilizado en la industria papelera. Sin embargo, es interesante sustituir el mismo por un polisacárido no competitivo con la industria de alimentos. Las hemicelulosas además se encuentran en la propia industria forestal (Bai, Hu and Xu, 2012), lo que facilita su implementación.

La modificación química de los xilanos es un camino prometedor hacia nuevos biopolímeros con grupos éteres y ésteres y con propiedades específicas que dependen de los grupos funcionales, el grado de sustitución y el patrón de sustitución. Los derivados de los xilanos no solo se pueden utilizar para mejorar las propiedades de los films o en la industria papelera, sino que tienen aplicaciones potenciales en muchos campos diferentes, como productos farmacéuticos para el cuidado de la salud, productos de higiene y purificación de agua, industria alimentaria y adhesivos, entre otros, desarrollándose constantemente nuevos productos y aplicaciones (Petzold-Welcke *et al.*, 2014; Vega *et al.*, 2016).

4. MÉTODOS DE PRETRATAMIENTO DE LA BIOMASA LIGNOCELUÓSICA

4.1. Características del pretratamiento

La utilización de materiales lignocelulósicos requiere un tratamiento previo que permita separar la estrecha asociación entre los componentes principales de la pared celular vegetal (celulosa, hemicelulosas y lignina). El mismo juega un papel fundamental en una biorrefinería a partir de materiales lignocelulósicos, con el objetivo de procesar óptimamente los tres principales componentes para la posterior obtención de productos químicos y/o biocombustibles (Carvalho, Duarte and Gírio, 2008; Galbe and Zacchi, 2012). La Figura 4-1 representa esquemáticamente la función del pretratamiento.

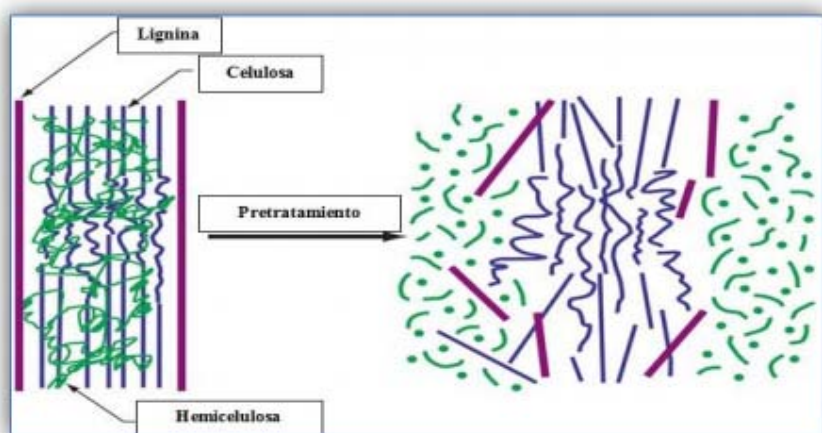


Figura 4-1. Representación esquemática de la función del pretratamiento en la biomasa lignocelulósica (adaptado de (Mosier *et al.*, 2005).

Este tema ha sido abordado tradicionalmente con el enfoque fundamentalmente puesto en el producto principal (o único) a producir. Uno de estos abordajes proviene del sector de producción de etanol de segunda generación, quienes consideran etapas adicionales de pretratamiento y detoxificación, a la ya estandarizada producción de bioetanol de primera generación (Galbe and Zacchi, 2012). Otro enfoque es a partir de los productores de pulpa de celulosa, que buscan la integración de la cadena con nuevos productos y de allí la concepción de nuevas etapas previas (pretratamiento) o posteriores (post-tratamiento) a la producción del producto principal (pulpa de celulosa), (van Heiningen, 2006). En ambos enfoques, el pretratamiento está contemplado principalmente desde la conservación de las propiedades del producto a obtener a partir de la celulosa (pulpa o bioetanol) y busca la valorización de las otras corrientes. Posiblemente esto sea así por ser la glucosa (o sus derivados, por ej. celulosa) el compuesto mayoritario en la biomasa lignocelulósica y por la existencia de productos comercialmente consolidados a partir de ésta.

Se han realizado importantes esfuerzos de investigación para encontrar métodos de pretratamiento rápidos y eficientes. Para ello, el método de pretratamiento seleccionado debe tener varias características:

- Alcanzar una alta recuperación de todos los componentes principales del material lignocelulósico.
- Alcanzar una alta recuperación en celulosa fácilmente digerible enzimáticamente (en el caso de la utilización por vías biotecnológicas, ej.: bioetanol) o con las características adecuadas para su conversión en el producto final deseado (nanocelulosa, etc.).
- No producir productos de degradación de azúcares o lignina, o hacerlo en bajas cantidades.
- Obtener una alta concentración de sólidos, así como una alta concentración de sólidos disueltos en la fracción líquida, tal que los costos de concentración sean mínimos.
- Requerir una baja demanda de energía o realizarse de manera que la energía pueda ser reutilizada en otros pasos del proceso como calor secundario.
- Presentar bajos costos de capital y operativos.

En general, los métodos de pretratamiento pertenecen a una de las siguientes categorías: físicos (p. ej. molienda, trituración, irradiación, sonicación); químico (p. ej. álcali, ácido, agentes oxidantes, solventes orgánicos, líquidos iónicos, etc.); fisicoquímicos (ej.; pretratamiento con vapor, oxidación húmeda, hidrotermólisis) o biológicos (Galbe and Zacchi, 2012), pudiendo aplicarse dos o más de estos en forma secuencial (Kim, Dien and Singh, 2016). En la Figura 4-2 se muestra un listado de los pretratamientos comúnmente reportados en la literatura.

Referente a la separación de las hemicelulosas, dependiendo del proceso y las condiciones utilizadas durante el pretratamiento, los azúcares que las componen pueden permanecer como polisacáridos, oligosacáridos o monómeros y/o degradarse a ácidos débiles, derivados de furanos, etc. (Carvalho, Duarte and Gírio, 2008). En las siguientes secciones se realiza una revisión detallada de los métodos de pretratamiento más utilizados actualmente con especial énfasis en los mecanismos que tienen lugar para la separación de las hemicelulosas de la matriz lignocelulósica.



Figura 4-2. Ejemplos de tipos de pretratamiento de la biomasa (diseño propio de acuerdo a información de (Kim, Lee and Kim, 2016)).

4.2. Pretratamiento físico

A menudo se necesita reducir el tamaño de las partículas para facilitar la manipulación del material y aumentar la relación superficie / volumen. Esto se puede hacer astillando, triturando, moliendo o por extrusión de la biomasa a utilizar. El pretratamiento mecánico generalmente se lleva a cabo antes de un siguiente paso de procesamiento, y el tamaño de partícula deseado depende de estos pasos posteriores. Para el pretratamiento mecánico, son muy importantes los costos de capital, los costos operativos, las posibilidades de ampliación y la depreciación del equipo (Harmsen *et al.*, 2010). Los molinos de cuchillas y de martillos son adecuados para muestras secas, pero no rompen las paredes celulares y por ello no son usados con fines de pretratamiento, aunque son importantes para reducir el tamaño de las partículas y aumentar la fluidodinámica de la biomasa. Los molinos de bolas, molinos de disco y extrusoras son los principales métodos utilizados para el pretratamiento mecánico (Kim, Dien and Singh, 2016). Se pueden utilizar con muestras secas o húmedas y al utilizar fuerzas de cizallamiento y compresión permiten la reducción de tamaño y de cristalinidad de la biomasa pretratada. Sin embargo, involucra procesamientos largos en tiempo y con un consumo energético alto lo que lo pueden hacer inviable a gran escala. En ese sentido, el tratamiento mecánico por extrusión, en una o dos etapas es el más eficiente. Las extrusoras proporcionarán un alto cizallamiento, rápida

transferencia de calor y mezcla eficaz en un tiempo de residencia más corto. Con ello, la estructura física y química del material será modificada, resultando en una gran área específica, que permite aumentar la accesibilidad (Zheng and Rehmann, 2014).

La refinación es un tratamiento mecánico más intensivo, donde se abre la estructura de la biomasa por fibrilación externa y delaminación interna de las fibras (Kim, Dien and Singh, 2016). Mediante el cizallamiento, se rompen las paredes exteriores de fibra (P y S1) removiéndose la pared primaria (P). La fibrilación interna, causada por las fuerzas de compresión que actúan de forma cíclica dentro del refinador, rompe los enlaces de hidrógeno intrafibra produciéndose la delaminación de las paredes P y S1 de la fibra. La rotura de los enlaces internos que se encuentran entre las fibrillas celulósicas, entre fibrillas y hemicelulosas, entre celulosa y lignina, y entre hemicelulosas y lignina provoca que la estructura de los poros dentro de la pared celular se expanda e hinche, dejando la estructura más flexible y accesible (Smook, 2003; Gharehkhani *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2016).

Por su parte los pretratamientos con radiación, hoy en día, tienen aplicación a escala de laboratorio. Particularmente, la técnica de ultrasonidos es bien conocida industrialmente para el tratamiento de lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales y por ello el interés en su desarrollo como método de pretratamiento. La extracción asistida por ultrasonido es un proceso que utiliza energía acústica y solventes para extraer los compuestos de diversas matrices vegetales. La propagación de ondas de ultrasonido y los fenómenos de cavitación resultantes hacen que las burbujas de solventes en el interior de la biomasa colapsen y de esa forma se auxilia la ruptura de las paredes celulares, favoreciéndose la extracción (Ebringerová and Hromádková, 2010; Harmsen *et al.*, 2010).

Las microondas son ondas no ionizantes de baja frecuencia. El procesamiento por microondas (MW) permite un calentamiento de la biomasa rápido y uniforme y por ello se puede emplear como auxiliar en pretratamientos hidrotérmicos. El calentamiento por irradiación de MW es explicado por efectos térmicos y atérmicos. El térmico causa el ablandamiento de la lignina y de los componentes de la pared celular por un aumento de temperatura y presión. El atérmico se refiere a fuerzas que se generan debido a la relajación y polarización de las sustancias dieléctricas en presencia de un campo electromagnético. La realineación de las moléculas polares da como resultado un desplazamiento que causa la ruptura de los enlaces de hidrógeno, abriendo la pared celular y rompiendo la estructura cristalina de la celulosa (Kumar *et al.*, 2020).

4.3. Pretratamiento químico.

Una clasificación general habitual para sistemas acuosos considera el pH del método de pretratamiento seleccionado, en este caso se habla de pretratamientos ácidos, alcalinos, neutros o de autohidrólisis (hidrotérmico, explosión de vapor). Esta clasificación, por supuesto, no es válida para métodos donde se utilizan solventes orgánicos (organosolv), líquidos iónicos u otros.

4.3.1. Pretratamiento ácido

El pretratamiento ácido es utilizado desde el siglo XIX y se puede dividir de acuerdo a las condiciones de uso en dos grandes grupos, i) a temperatura ambiente y con ácidos concentrados y ii) utilizando ácidos diluidos a altas temperaturas (entre 100 y 200 °C) (Carvalho, Duarte and Gírio, 2008; Trajano and Wyman, 2013).

Dos de las principales ventajas de las reacciones a pH bajo son la fácil disponibilidad de catalizadores como el H_2SO_4 y SO_2 (los mayormente utilizados) y los altos rendimientos de producto, fundamentalmente en términos de hexosas, para su posterior hidrólisis y fermentación. Sin embargo, los costos de capital de los reactores y equipos asociados utilizados para las reacciones a pH ácido son elevados debido a la necesidad de materiales resistentes a la corrosión. Además, el sólido y las corrientes líquidas resultantes del pretratamiento a pH ácido frecuentemente requieren lavado o neutralización, lo que implican costos extras (Trajano and Wyman, 2013).

Los ácidos concentrados remueven principalmente la celulosa y hemicelulosas, lo que resulta en una corriente líquida conteniendo estos carbohidratos y sus derivados y una fase sólida enriquecida en lignina (Carvalho, Duarte and Gírio, 2008). Debido a la naturaleza cristalina de la celulosa, se requiere un pH muy bajo, altas temperaturas o tiempos prolongados para hidrolizar cantidades significativas de celulosa en glucosa. En el proceso de hidrólisis ácida con ácido concentrado, este reacciona con los enlaces de hidrógeno, rompiendo la estructura cristalina de la celulosa y produciéndose oligosacáridos. Los ácidos concentrados permiten operar a baja / media temperatura, donde ocurre una baja formación de productos de degradación (ácidos levulínico y fórmico e hidroximetilfurfural). Sin embargo, la velocidad de formación de estos productos es severamente afectada por cambios pequeños en la temperatura del tratamiento, incluso, cuando se trabaja con ácidos diluidos a mayor temperatura (Carvalho, Duarte and Gírio, 2008; Trajano and Wyman, 2013; Yoon, Han and Shin, 2014).

Como se indicó en el Capítulo 2, debido a su estructura ramificada, las hemicelulosas son amorfas y mucho más susceptible a la hidrólisis ácida que la celulosa. De hecho, dependiendo de las condiciones utilizadas, las hemicelulosas pueden removerse casi por completo con un daño limitado a la celulosa. Los grupos acetilos de las cadenas de hemicelulosas son removidos al principio de la reacción, permitiendo abrir su estructura. Los carbohidratos que componen las hemicelulosas se pueden liberar en solución como oligómeros o monómeros y su composición depende de la temperatura, el tiempo y la concentración de ácido utilizados. Una vez en solución, las pentosas (xilosas, arabinosas) pueden reaccionar para formar productos de deshidratación como el furfural, que asimismo pueden reaccionar entre sí o con azúcares para formar ácido fórmico y/o productos más complejos (resinas, gomas, etc.), (Antal *et al.*, 1991; Trajano and Wyman, 2013). La Figura 4-3 esquematiza las reacciones que tienen lugar hasta la formación de furfural.



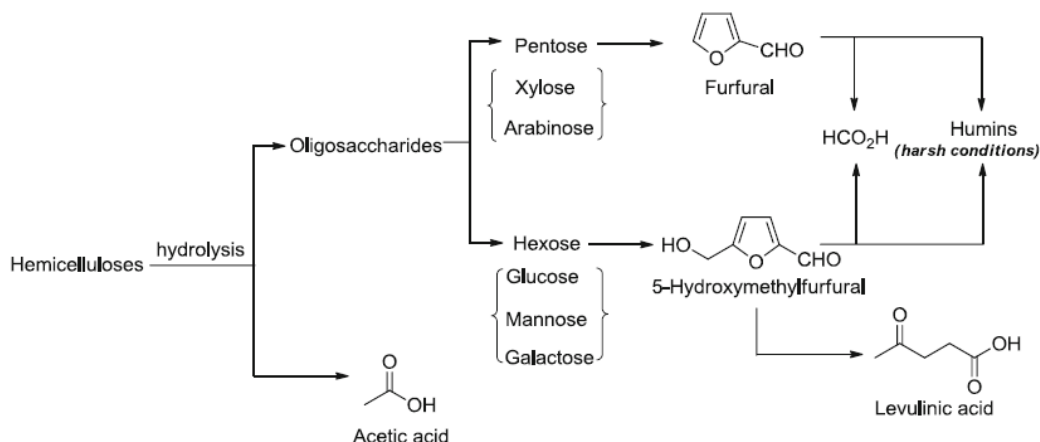


Figura 4-4. Reacciones que ocurren en el pretratamiento hidrotérmico de la biomasa lignocelulósica, que permiten la formación de azúcares y productos de degradación (Tomado de Xiao, Song and Sun, 2017).

Existen numerosos trabajos donde se utiliza el pretratamiento hidrotérmico para la remoción de hemicelulosas, muchos de ellos enfocados también a la producción de bioetanol a partir del sólido resultante. Se ha utilizado principalmente en trabajos con maderas de latifoliadas (Garrote and Parajo, 2002; Tunc and Van Heiningen, 2008; Borrega, Nieminen and Sixta, 2011; Chirat, Lachenal and Sanglard, 2012; Rangel *et al.*, 2016) y con residuos agrícolas (Kabel *et al.*, 2002; Garrote *et al.*, 2007; Xiao, Song and Sun, 2017). Sin embargo, ha demostrado ser menos efectivo para el pretratamiento de maderas de coníferas, los que requieren de condiciones más intensas, debido a su mayor contenido de ligninas (Yoon, Macewan and van Heiningen, 2008; Vallejos, Felissia and Area, 2017)

Las condiciones normalmente aplicadas en el tratamiento hidrotérmico se encuentran en el rango entre 150-230 °C. El tiempo de reacción puede variar desde segundos hasta horas, dependiendo de la temperatura (Garrote, Dominguez and Parajo, 1999; Carvalheiro *et al.*, 2016; Vallejos, Felissia and Area, 2017). Otro parámetro importante es la relación líquido-sólido (en esta tesis denominada como L/W (licor/madera)). Esta relación varía entre 2 y 100 (p/p), siendo los valores más comunes alrededor de 10. El tamaño de la biomasa a tratar es determinante en la relación L/W, ya que afecta la capacidad de retención de líquido de la biomasa (Carvalheiro *et al.*, 2016; Vallejos, Felissia and Area, 2017).

Mediante el tratamiento hidrotérmico se puede lograr una alta solubilización de extractivos y hemicelulosas, casi completa de estas últimas, dependiendo de las condiciones aplicadas. A medida que transcurre el tiempo de reacción, los oligosacáridos formados durante la extracción se hidrolizan formando sus monómeros correspondientes y los productos de descomposición previamente mencionados (Carvalheiro *et al.*, 2016; Vallejos, Felissia and Area, 2017).

Durante el procesamiento hidrotérmico se rompen los enlaces de lignina-carbohidrato, por lo que puede solubilizarse parcialmente la lignina. En general, el tratamiento hidrotérmico no tiene un efecto importante sobre la lignina, aunque depende de la materia prima y las condiciones

operativas. La lignina puede sufrir tanto degradación como reacciones de repolimerización, siendo las unidades de sirigilo los fragmentos de lignina más susceptibles a la degradación hidrotérmica. En general, la fracción que se solubiliza aumenta con el aumento de la severidad hasta alcanzar un máximo, y luego se produce un aumento aparente de la recuperación de lignina en el sólido, principalmente debido a reacciones de repolimerización (Garrote, Dominguez and Parajo, 1999; Carvalheiro *et al.*, 2016).

Para controlar la severidad del tratamiento, tradicionalmente se utilizan dos conceptos, el factor P, el cual es análogo al factor H de la industria de celulosa y el factor de severidad (Ro).

El concepto de factor P fue desarrollado por Brasch & Free en 1964. Calcularon la velocidad relativa de prehidrólisis para cualquier temperatura deseada, asumiendo que la misma se triplica cada 10 °C de aumento de temperatura (Sixta, 2006). C.K. Lin en 1979 aplicó el concepto de factor H en la prehidrólisis utilizando una energía de activación típica de la escisión de enlaces glicosídicos de carbohidratos en la madera. De esta forma el factor P permite expresar el tiempo y la temperatura de trabajo en una sola variable (Ecuación 4-1) (Sixta, 2006):

$$P = \int_{t_0}^t k_{rel} dt \quad \text{Ecuación 4-1}$$

$$\ln(k_{H,100^\circ C}) = \ln k_0 - \frac{E_{a,h}}{R} * \frac{1}{373} \quad \text{Ecuación 4-2}$$

$$k_{rel} = \frac{k_H(T)}{k_{100^\circ C}} = \exp\left(40,48 - \frac{15106}{T}\right) \quad \text{Ecuación 4-3}$$

Donde k_{rel} es la constante de velocidad de hidrólisis catalizada por ácidos de los enlaces glicosídicos. Se utiliza el modelo de Arrhenius para expresar la dependencia de la temperatura de la constante velocidad y se toma la constante a 100 °C como referencia. Existen varios trabajos donde se calcula la Energía de activación de esta reacción y el valor sugerido para maderas de latifoliadas es de 125,6 kJ. Reordenando y sustituyendo las ecuaciones se obtiene la expresión presentada en la Ecuación 4-3. La velocidad relativa se grafica en función del tiempo y el área bajo la curva representa el "factor de prehidrólisis" o "factor P" (Ecuación 4-4).

$$P = \int_{t_0}^t \frac{k_H(T)}{k_{100^\circ C}} dt = \int_{t_0}^t \exp\left(40,48 - \frac{15106}{T}\right) \quad \text{Ecuación 4-4}$$

Por su parte, Chornet y Overend desarrollaron en la década del setenta un índice más sencillo, capaz de ser usado rápidamente por los investigadores y técnicos, con las herramientas existentes en la época. De esta forma, el Factor de Severidad, comúnmente denominado como R_0 se define como se indica en la Ecuación 4-5.

$$R_0 = t \exp\left(\frac{T - 100}{14,75}\right)$$

Ecuación 4-5

Donde t = tiempo en minutos y T = temperatura en °C.

El término exponencial proviene de la afirmación heurística de que la velocidad de reacción se duplica cada 10 °C de aumento de temperatura (Overend, Chornet and Gascoigne, 1987).

4.3.3. Pretratamiento por explosión de vapor

El pretratamiento por explosión de vapor (SE) es uno de los métodos más exitosos y ampliamente utilizados para fraccionar la biomasa lignocelulósica y mejorar la digestibilidad enzimática del sólido resultante. Es una variante del tratamiento hidrotérmico, que combina efectos térmicos, químicos y mecánicos que actúan sobre la biomasa, rompiendo las fibras del material lignocelulósico, solubilizando las hemicelulosas, alterando la cristalinidad de la celulosa e induciendo transformaciones a la lignina (Pereira Ramos, 2003; Duque *et al.*, 2016). Es reconocido como una tecnología práctica y versátil que permite su escalado. Al utilizar agua (vapor) como reactivo para el pretratamiento, presenta, además, las demás ventajas ambientales señaladas para el pretratamiento hidrotérmico.

Es un tipo de pretratamiento hidrotérmico en donde la biomasa se calienta rápidamente en un reactor presurizado, utilizando vapor saturado a temperaturas típicamente entre 160 y 240 °C y manteniendo las condiciones de temperatura y presión durante un corto período de tiempo que puede variar desde segundos a varios minutos. Posteriormente, la presión se libera rápidamente descargándose la biomasa violentamente en un tanque colector. La estructura de la pared celular de la biomasa lignocelulósica se altera en consecuencia originando un aumento de la porosidad del material, despolimerización parcial y solubilización de las hemicelulosas, redistribución de lignina y apertura parcial de las cadenas de celulosa produciendo un material marrón oscuro del cual se hidrolizaron parcial o totalmente las hemicelulosas (Pereira Ramos, 2003; Carvalheiro, Duarte and Gírio, 2008).

Durante el proceso a presiones elevadas, el vapor condensa e impregna la biomasa, iniciando las reacciones de autohidrólisis debido a los ácidos orgánicos generados a partir de los grupos acetilo de las hemicelulosas. Esto resulta en la escisión de enlaces glicosídicos y posterior solubilización de las hemicelulosas. Cuando la presión se libera abruptamente, la humedad condensada dentro las fibras lignocelulósicas se evapora de nuevo, provocando la rotura mecánica de la matriz lignocelulósica con lo que se logra además la reducción del tamaño de partícula de la biomasa pretratada (Duque *et al.*, 2016).

La fracción líquida (prehidrolizado o licor), contiene los azúcares solubilizados, principalmente provenientes de las hemicelulosas del material, fragmentos de lignina fácilmente soluble y los productos de degradación generados durante el pretratamiento. La fracción sólida insoluble está enriquecida en celulosa y lignina (Pereira Ramos, 2003; Duque *et al.*, 2016).

Los resultados del pretratamiento por explosión de vapor dependen del tiempo de residencia, la temperatura, el tipo y tamaño de la biomasa (aserrín, pinchips, chips) y el contenido de humedad de la misma (Harmsen *et al.*, 2010; Duque *et al.*, 2016).

Originalmente, el pretratamiento por explosión de vapor era una tecnología batch, pero actualmente se utiliza en forma batch o continua, siendo esta última la más usada en escala piloto y demostrativa (Pereira Ramos, 2003; Duque *et al.*, 2016).

Respecto a los tipos de biomasa, una ventaja de este tratamiento es su versatilidad en el uso de biomasa, reportándose buenos resultados al trabajar con madera de latifoliadas (Palmqvist *et al.*, 1996; Martín-Sampedro *et al.*, 2012; Chiarello *et al.*, 2016), bagazo de caña de azúcar ((Rabelo *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2018), paja de trigo (Sun *et al.*, 2005), entre otros. Sin embargo, la explosión de vapor sobre maderas de coníferas tiene un rendimiento menor, dado por el carácter recalcitrante de esta biomasa (Duque *et al.*, 2016; Stoffel *et al.*, 2017).

De forma de mejorar el rendimiento de la explosión de vapor, se introdujo hace unos años el uso de catalizadores ácidos. Con ello se logra mejorar la solubilización de las hemicelulosas y la hidrólisis enzimática de celulosa. Son mayormente utilizados en maderas de coníferas, donde se da en menor extensión la autohidrólisis dado el menor contenido de grupos acetilos de las hemicelulosas (Pereira Ramos, 2003; Stoffel *et al.*, 2017). En otro tipo de biomasa se pueden utilizar también como forma de reducir las temperaturas a aplicar en el pretratamiento de explosión (Pereira Ramos, 2003; Sassner *et al.*, 2008; Duque *et al.*, 2016). En la explosión de vapor catalizada por ácido, la biomasa lignocelulósica se impregna con el catalizador elegido (normalmente H_2SO_4 o SO_2 , en una proporción entre 0.3 % y 3 % p / p) y se lo deja reaccionar, generalmente a temperatura ambiente y durante algunas horas, antes de su introducción en el reactor de explosión (Galbe and Wallberg, 2019).

4.3.4. Pretratamientos alcalinos

La aplicación de álcali se utiliza como pretratamiento dado que tiene varias características deseables. Los métodos alcalinos utilizan principalmente productos químicos no corrosivos y en muchos casos es factible su recuperación, con la consecuente ventaja económica y ambiental que ello implica frente a otros pretratamientos químicos.

El pretratamiento alcalino utiliza hidróxidos de sodio, potasio, calcio o amonio como reactivos y normalmente se realiza a temperaturas más bajas que en el caso del pretratamiento con ácidos o hidrotérmico. El hidróxido de sodio y calcio (cal) son los catalizadores más comunes (conc. 0,05-0,15 g de álcali / g de biomasa) aunque los tratamientos de percolación con amonio recirculado (ARP) o explosión / expansión de fibra por amonio (AFEX) también son habituales.

El pretratamiento con hidróxido de sodio o calcio se realiza normalmente a temperaturas entre 20-130 °C, con tiempos de reacción que van desde minutos a horas o días, dependiendo de la temperatura de trabajo (Carvalho, Duarte and Gírio, 2008; Kim, Lee and Kim, 2016; Kumar *et al.*, 2020). En materiales con alto contenido de lignina, como la madera, este pretratamiento es menos eficiente, por lo que es más habitual su utilización en residuos agrícolas y agroindustriales (Kumar *et al.*, 2020)

En la hidrólisis alcalina ocurre la solvatación de las fibras, produciéndose el hinchamiento de las mismas. Los enlaces ésteres intermoleculares que provocan la reticulación de las cadenas se saponifican, abriendo la estructura de las hemicelulosas y lignina y produciendo la escisión de enlaces glicosídicos de la cadena de hemicelulosas. Los grupos acetilos y urónicos reaccionan también con el álcali, separándose de la fibra. Dependiendo de las condiciones aplicadas, puede ocurrir la despolimerización de moléculas de lignina por escisión de enlaces moleculares internos del tipo α y β -aril éter, lo que contribuye a la degradación de la lignina. Todos estos cambios mejoran el acceso a las cadenas de celulosa, las que se tornan menos cristalinas con el tratamiento al reaccionar los enlaces de puente de hidrogeno que las unen. En condiciones de mayor intensidad pueden ocurrir reacciones de “peeling” de las cadenas de hemicelulosas y de celulosa, causando la disminución del grado de polimerización (Carvalho, Duarte and Gírio, 2008; Zhao, Zhang and Liu, 2012; Lehto and Alén, 2013).

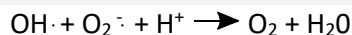
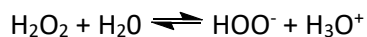
Se han reportado trabajos de pretratamiento alcalino aplicados a varios tipos de biomasa (Hespell, 1998; Ebringerova *et al.*, 2000), fundamentalmente para mejorar la posterior hidrólisis enzimática para la producción de bioetanol a partir del residuo sólido resultante (Parajó, Alonso and Vázquez, 1994; Park and Kim, 2012) , para extraer las hemicelulosas previo al pulpeo Kraft (Al-dajani and Tschirner, no date; Helmerius *et al.*, 2010; Lehto and Alén, 2013) o más recientemente en la extracción de hemicelulosas y producción de nanocelulosa a partir del sólido post-extracción (Svård, Brännvall and Edlund, 2015; Svård *et al.*, 2019).

La cal, en comparación con NaOH y KOH, tiene un costo más bajo y es industrialmente más fácil de manipular y conservar. Puede recuperarse del hidrolizado mediante precipitación por barboteo de CO₂, de modo que el carbonato formado pueda ser reconvertido a cal. Su desventaja es que al precipitar arrastra carbohidratos ocluidos y además deja un contenido salino en la solución, que puede generar problemas en el proceso posterior (Carvalho, Duarte and Gírio, 2008; Kim, Lee and Kim, 2016).

Una variante al tratamiento alcalino es el tratamiento “cercano a la neutralidad” (“*near neutral*”) donde se trabaja con licor verde (carbonato de sodio/sulfuro de sodio), particularmente en operaciones asociadas a plantas de pulpa de celulosa. En este caso se trabaja en el rango entre 2-8 % de alcali activo (como NaOH) y con sulfidez de alrededor de 30 % entre 125 -160 °C por tiempos entre 45 y 150 minutos (van Heiningen *et al.*, 2011; Luo, Genco and Zou, 2012). El concepto de este tratamiento se basa en que, por resultados previos, cuando se realiza un tratamiento hidrotérmico previo al pulpeo, bajan sensiblemente las propiedades mecánicas de la pulpa obtenida y cuando se trabaja con un tratamiento alcalino (pH 13-14), el rendimiento del pulpeo posterior se resiente por la pre-extracción realizada. Sin embargo, cuando las extracciones se realizan en condiciones alcalinas más suaves (licor verde entre 2- 4 %), el NaOH neutraliza el ácido acético liberado en el proceso de extracción, y no hay un ataque tan

significativo a las cadenas de celulosa, por lo que el rendimiento del pulpeo posterior se mantiene en condiciones similares a cuando no se realiza pre-extracción. En la pre-extracción se obtiene una corriente rica en hemicelulosas y ácido acético, que puede ser valorizada (Walton, 2009; van Heiningen *et al.*, 2011).

Dentro de los pretratamientos alcalinos, otra variante es la adición al álcali de un agente oxidante (aire/oxígeno o H₂O₂). El mecanismo de reacción es similar al de la hidrólisis alcalina, pero se auxilia con un efecto oxidativo sobre la lignina, aumentando su escisión de la biomasa lignocelulósica. Los tratamientos con peróxido alcalino parecen tener una cinética más rápida a baja temperatura, presentando así ventajas tecnológicas y económicas sobre los tratamientos alcalinos convencionales (Carvalho, Duarte and Gírio, 2008; Kumar *et al.*, 2020). El uso de H₂O₂ se basa en su disociación en medio alcalino, generando el anión hidroperóxido (HOO⁻), quien a su vez reacciona con H₂O₂ del medio para dar lugar a la formación de superóxido (O₂⁻) y un radical hidroxilo (OH[·]). En ausencia de estos reactivos, ambos radicales se combinan para formar oxígeno y agua (Ecuación 4-6). Sin embargo, en presencia de otros compuestos, por ejemplo el material lignocelulósico, estos radicales reaccionan, formándose una baja cantidad de O₂ (Dutra *et al.*, 2018).



Ecuación 4-6

Entre los pretratamientos alcalinos, los tratamientos a base de amoníaco han sido extensamente investigados ya que este es fácilmente recuperable, no corrosivo y relativamente barato (Kim, Lee and Kim, 2016). Los principales efectos de los pretratamientos con amoníaco incluyen la eliminación o modificación de lignina, el aumento de superficie y / o tamaño de poro y la modificación de las estructuras de celulosa y hemicelulosas. En forma acuosa, provoca el hinchamiento de la biomasa, lo que conlleva un cambio morfológico significativo y también afecta el grado de cristalinidad de la celulosa. Su asociación con otros pretratamientos como la explosión de vapor o el tratamiento hidrotérmico ha demostrado ser una estrategia eficaz para recuperar selectivamente las distintas fracciones lignocelulósicas (Carvalho, Duarte and Gírio, 2008; Kim, Lee and Kim, 2016).

El tratamiento por percolación de amoníaco reciclado (ARP por sus siglas en inglés) ha sido utilizado para tratar materiales herbáceos y maderas de latifoliadas. Se realiza en un reactor de lecho empacado, de tipo de flujo directo (percolación) que opera en modo de recirculación del amoníaco utilizado (Kim, Lee and Kim, 2016; Zhao, Shao and Chundawat, 2020). Una característica de este tipo de reactor es que puede minimizar la repolimerización y reprecipitación de lignina solubilizada sobre la superficie de la biomasa porque la lignina soluble se descarga del reactor tan pronto como se forma (Kim, Lee and Kim, 2016). Los parámetros normalmente utilizados son: concentración de amoníaco entre 2,5 y 20 % (típicamente, 10-15%); tiempo de reacción, hasta 90 min y temperatura entre 140 y 210 ° C con tasa de percolación de

5 ml / min. En rastrojo de maíz se han reportado rendimientos de 70-85 % de eliminación de lignina y 50% de eliminación de hemicelulosas (ambos comparando la biomasa y el sólido pretratado), encontrándose las hemicelulosas en solución fundamentalmente como oligosacáridos (Carvalho, Duarte and Gírio, 2008; Zhao, Shao and Chundawat, 2020) .

El proceso AFEX (explosión de fibra en amonio) se puede presentar como una combinación de explosión de vapor y pretratamientos alcalinos. La biomasa se trata por unos minutos, en modo discontinuo con amoníaco líquido anhidro (1-2 kg de amoníaco / kg de biomasa) a temperaturas moderadas (40-140 ° C) y alta presión (250-300 psi). El mecanismo de reacción se produce por una combinación de efectos químicos y físicos que permite la escisión del complejo lignina-carbohidratos, hidrolizar las hemicelulosas y abrir la estructura cristalina de la celulosa, lo que conduce a una mayor superficie accesible para los tratamientos posteriores (Carvalho, Duarte and Gírio, 2008; Kim, Lee and Kim, 2016; Zhao, Shao and Chundawat, 2020). Se ha aplicado con éxito (desde el punto de vista de recuperación de glucosa para fermentación) en materiales herbáceos y residuos agrícolas, pero los rendimientos bajan sensiblemente en maderas de latifoliadas y no es un buen tratamiento para maderas de coníferas. Además, el uso de alta presión y el manejo de amoníaco encarecen el equipamiento y pueden generar problemas de seguridad. La recuperación del amoníaco es otro aspecto que no ha sido completamente desarrollado ya que es un proceso energéticamente muy demandante (Carvalho, Duarte and Gírio, 2008; Kim, Lee and Kim, 2016).

4.3.5. Otros pretratamientos químicos

4.3.5.1. Proceso organosolv

Este proceso utiliza solventes orgánicos miscibles en agua como etanol, metanol, etilenglicol, acetona, etc. Desde 1931 se ha sugerido como una ruta alternativa de producción de pulpa de celulosa, basado en la deslignificación de la madera con una mezcla de etanol:agua a alta temperatura (Sixta, 2006).

Cómo método de pretratamiento, comúnmente este proceso tiene lugar en presencia de un catalizador ácido, básico o salino. Se utilizan normalmente ácidos minerales (por ejemplo, HCl, H₂SO₄, H₃PO₄) como catalizadores para acelerar la deslignificación y disolución de las hemicelulosas, pudiéndose usar también algunos ácidos orgánicos como ácido fórmico, oxálico, acetilsalicílico y salicílico. También se ha encontrado que álcalis como NaOH, KOH, cal, NH₄OH, Na₂SO₃ o las aminas mejoran la deslignificación. Las temperaturas utilizadas para los pretratamientos catalizados suelen ser inferiores a 180 °C. mientras que se utilizan mayores temperaturas (185-210 ° C) cuando no se agrega un catalizador exógeno. Cuando se utilizan ácidos orgánicos de cadena corta como catalizadores se puede trabajar a menores temperaturas, alrededor de 100 °C, ya que la lignina tiene una buena solubilidad en ellos (Kumar and Sharma, 2017; Zhao *et al.*, 2017).

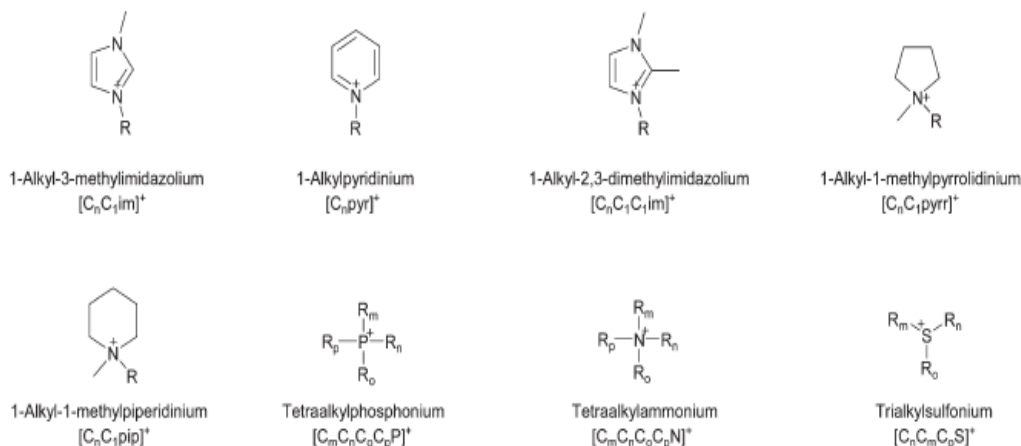
La presencia de solventes orgánicos reduce la viscosidad del medio de pretratamiento, mejorando la penetración en la biomasa, lo que facilita una eliminación más eficiente de la

lignina. Durante el pretratamiento se rompen los enlaces internos entre la lignina y las hemicelulosas, separando la biomasa lignocelulósica en sus principales fracciones macromoleculares: celulosa, hemicelulosas y lignina. Durante el tratamiento la mayor parte de la lignina y hemicelulosas se degrada a fragmentos de bajo peso molecular, disolviéndose en el solvente utilizado, de esta forma se obtiene un sólido rico en celulosa y un licor con lignina y hemicelulosas disueltas. La presencia de solvente puede retardar la redeposición de lignina en los otros componentes de la biomasa una vez completada la separación. La segunda separación se logra diluyendo el licor obtenido, donde precipita la lignina y queda fundamentalmente xilosa en solución (Bozell *et al.*, 2011; Zhang, Pei and Wang, 2016; Kumar and Sharma, 2017).

El inconveniente principal de este proceso es el alto costo de los solventes, aunque se puede minimizar recuperando y reciclando los solventes mediante operaciones de evaporación y condensación (Kumar and Sharma, 2017).

4.3.5.2. Pretratamiento con líquidos iónicos

Los líquidos iónicos (LI) son un grupo especial de sales orgánicas que pueden existir en forma líquida a temperaturas relativamente bajas (menos de 100 °C) y algunas incluso pueden existir como líquidos a temperatura ambiente. Suelen ser sales u óxidos fundidos. Tienen viscosidades más altas (similares a los aceites) que los solventes orgánicos convencionales, baja presión de vapor y alta estabilidad térmica. Son solventes especiales que pueden disolver compuestos químicos que de otro modo se consideran insolubles en solventes convencionales (da Costa Lopes *et al.*, 2013; Luo, Cai and Gu, 2013). Los líquidos iónicos modernos contienen cationes orgánicos, generalmente iones amonio cuaternario de forma alifática o aromática, de acuerdo a la Figura 4-5 (Brandt *et al.*, 2013).



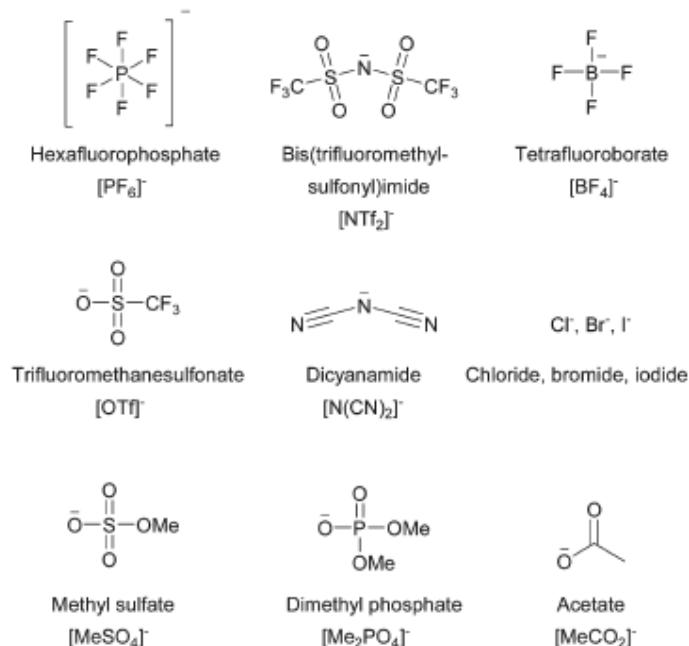


Figura 4-5. Ejemplos de líquidos iónicos utilizados para el pretratamiento de biomasa. En la parte superior, líquidos iónicos de cationes orgánicos y la parte inferior, aniones usados en líquidos iónicos (tomado de (Brandt *et al.*, 2013)).

La celulosa ha sido uno de los biopolímeros más estudiados con estos solventes ya que tiene una solubilidad alta en una variedad de LI. Muchos LI disuelven también la lignina y las hemicelulosas, por lo que pueden utilizarse para un fraccionamiento completo de la biomasa (da Costa Lopes *et al.*, 2013; Luo, Cai and Gu, 2013).

La capacidad de los LI para disolver carbohidratos y lignina es considerada como una interrupción efectiva de las interacciones no covalentes entre estos polímeros (da Costa Lopes *et al.*, 2013). Swatloski *et al.* (Swatloski *et al.*, 2002) propusieron que la alta concentración y actividad de Cl⁻ en un líquido iónico, como [C4mim] Cl, puede romper eficazmente la extensa red de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares en la celulosa, lo que permite que la celulosa se disuelva en el LI. Se ha observado que los LI aniónicos tienen buena capacidad para la disolución de celulosa. Se han identificado varios que contienen aniones (ej.: cloruro, carboxilatos (acetato, formiato, propionato, lactato), dialquil fosfatos, dialquil y trialquilfosfonatos) que pueden formar enlaces de hidrógeno fuertes con los grupos hidroxilo. Particularmente, el poder de disolución de estos líquidos iónicos relevantes se ha atribuido a fuertes interacciones de enlaces de hidrógeno entre los aniones y los grupos hidroxilo ecuatoriales en la celulosa (Brandt *et al.*, 2013; Luo, Cai and Gu, 2013).

Se han ensayado en madera de coníferas y latifoliadas y las condiciones de tiempo y temperatura de los ensayos depende del LI a utilizar. En la literatura se han encontrado trabajos desde 100 a 185 °C, con tiempos desde 7 minutos a 48 horas (Brandt *et al.*, 2013; da Costa Lopes *et al.*, 2013; Luo, Cai and Gu, 2013). La viscosidad de los LI es otro parámetro importante, dado que afecta la mezcla y la transferencia de masa entre el material lignocelulósicos y los LI. El tamaño de la

biomasa es otro parámetro clave en el tratamiento. Asimismo, se debe controlar que la presencia de agua sea nula o muy baja (menor a 1%) (da Costa Lopes *et al.*, 2013).

La etapa de disolución es el paso inicial que garantiza el procesamiento exitoso de biomasa. Sin embargo, la adecuada recuperación de cada fracción es necesaria para maximizar la utilización de la misma. Esto se realiza normalmente con el agregado de un solvente precipitante (o “antisolvente”), como agua, acetona, diclorometano y/o acetonitrilo (da Costa Lopes *et al.*, 2013; Luo, Cai and Gu, 2013). Después de la regeneración, la cristalinidad de la celulosa está muy reducida en comparación con el de la celulosa del material lignocelulósico original. En líquidos iónicos con aniones básicos, las hemicelulosas disueltas siguen siendo en gran parte oligoméricas o poliméricas, al igual que en los procesos típicos de deconstrucción alcalina. Se han realizado algunos trabajos con hidrólisis ácida utilizando líquidos iónicos acidificados. En este caso, los componentes de las hemicelulosas y celulosa se hidrolizan a monómeros solubles y oligómeros cortos, sin embargo, los rendimientos han sido bajos (Brandt *et al.*, 2013).

Debido al alto costo y la potencial toxicidad de los líquidos iónicos, estos deben reciclarse después del pretratamiento de biomasa. Para ello se han ensayado procesos de evaporación, destilación, extracción líquido - líquido, entre otros (Luo, Cai and Gu, 2013).

4.4. Pretratamiento biológico

Se considera el pretratamiento biológico como un proceso seguro para el medio ambiente y de bajo consumo energético. Existen en la naturaleza abundantes microorganismos que pueden digerir y degradar específicamente la celulosa, hemicelulosas o lignina. Los pretratamientos biológicos son realizados por microorganismos como los hongos marrones, blancos y de podredumbre blanda que principalmente degradan lignina y hemicelulosa y poca cantidad de celulosa. La degradación de la lignina por los hongos blancos se produce debido a que estos generan enzimas que degradan la lignina como peroxidasas y lacasas (Kumar and Sharma, 2017; Galbe and Wallberg, 2019).

El tratamiento biológico no es parte de este trabajo y por ello no se profundizará en él.

5. PROCESOS DE CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS HEMICELULOSAS.

5.1. Descripción general de los métodos utilizados en la bibliografía

Como se ha visto en el capítulo anterior, los métodos de pretratamientos mayoritariamente utilizados no logran separar el componente de interés totalmente de los otros componentes de la biomasa, siendo entonces necesaria una purificación posterior. Al igual que en los pretratamientos, históricamente los métodos de purificación han estado enfocados en la separación de inhibidores de hidrólisis enzimática y/o fermentación de la celulosa. De esta forma, en muchas oportunidades en la bibliografía se asocian los procesos de purificación con procesos de detoxificación (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Kumar *et al.*, 2020). Otra línea de trabajo que ha sido muy estudiada es la separación de componentes de interés a partir del licor de plantas de celulosa kraft o al sulfito (van Heiningen, 2006; Jönsson, 2016; Wallberg *et al.*, 2018).

Las tecnologías mencionadas a continuación se han utilizado en la separación de diferentes compuestos de la biomasa. En este capítulo se pone especial énfasis en su aplicación en la separación y concentración de las corrientes que contienen las hemicelulosas y se revisan en detalle las tecnologías posteriormente utilizadas en el trabajo experimental.

Las tecnologías más frecuentemente utilizadas para la purificación o detoxificación de los carbohidratos proveniente de la biomasa son:

- a) Adsorción en carbón activado
- b) Precipitación con hidróxido de calcio (encalado)
- c) Precipitación con solventes
- d) Evaporación
- e) Extracción con solventes (extracción líquido-líquido)
- f) Resinas de intercambio o de adsorción
- g) Membranas de micro, ultra y nanofiltración

En muchos casos se utiliza una combinación de estos procedimientos para la obtención del producto de interés.

5.2. Precipitación con solventes.

El fraccionamiento o separación por precipitación con solventes implica el agregado de un solvente (denominado no solvente o antisolvente), diferente al que disuelve al compuesto de interés, lográndose la precipitación gradual de los polisacáridos de la solución. Este método utiliza equipamiento económico disponible comercialmente (frente a otras tecnologías), lo que lo hace fácilmente escalable y por ello es un método con un muy buen potencial para el fraccionamiento de polisacáridos (Peng *et al.*, 2012; Hu and Goff, 2018).

Normalmente, los polisacáridos se encuentran disueltos en soluciones acuosas, donde las moléculas de polisacárido están unidas con moléculas de agua por enlaces de hidrógeno, que permiten mantenerlos en solución. Al agregar agentes deshidratantes como el etanol o isopropanol, se rompen estos enlaces, produciéndose la precipitación de los polisacáridos. La constante dieléctrica de un solvente está estrechamente relacionada con su capacidad para aumentar las fuerzas de atracción entre moléculas de soluto, por lo que al agregar un solvente con una constante dieléctrica menor se pueden producir cambios conformacionales en el polímero, aumentar su agregado y precipitarlo (Gonzales *et al.*, 1990; Jian *et al.*, 2014). Los alcoholes (etanol, isopropanol) tienen una constante dieléctrica menor (menor polaridad) a la del agua (80 F/m para el agua y 20 a 35 F/m para los distintos alcoholes, a 25 °C), por lo que se han utilizado mucho como antisolventes o agentes de precipitación (Peng *et al.*, 2009; Jian *et al.*, 2014; Hu and Goff, 2018). Al ir agregando al medio polar una cantidad suficiente de solvente menos polar, irá ocurriendo la precipitación de los polisacáridos.

Para el caso de las hemicelulosas, el etanol es el antisolvente más utilizado, pero también se utiliza metanol, isopropanol, acetona y otros solventes orgánicos (Peng *et al.*, 2012; Hu and Goff, 2018). Estos solventes son además miscibles con el agua. El orden de polaridad de estos solventes es metanol > etanol > isopropanol > acetona, por lo que *a priori* la eficiencia de precipitación es del orden de metanol > etanol > isopropanol > acetona. Entre estos precipitantes, el etanol es el más utilizado por su seguridad, disponibilidad y costo (Hu *et al.*, 2015; Hu and Goff, 2018).

Polisacáridos de distintos pesos moleculares o con estructuras químicas distintas tienen diferentes solubilidades. Huggins (Huggins, 1942) demostró termodinámicamente que la solubilidad de un polímero es dependiente de su peso molecular, disminuyendo su solubilidad a medida que aumenta la extensión de la cadena. Además del peso molecular, la mayoría de los polisacáridos presentan solubilidades diferenciales, dadas por variaciones en las proporciones de los distintos azúcares y grupos laterales, tipo de enlace, grado y disposición de la ramificación y / o grado de sustitución (Jian *et al.*, 2014; Hu and Goff, 2018).

Agregar una pequeña cantidad de no solvente inicialmente provoca la precipitación de los polisacáridos menos solubles y la eficiencia de la precipitación aumenta al aumentar el agregado del no solvente. Del mismo modo, se puede realizar el fraccionamiento de las distintas fracciones de polisacáridos basándose en su solubilidad diferenciada, regulando la cantidad de no solvente añadido y realizando la adición en etapas de acuerdo con el esquema mostrado en la Figura 5-1.

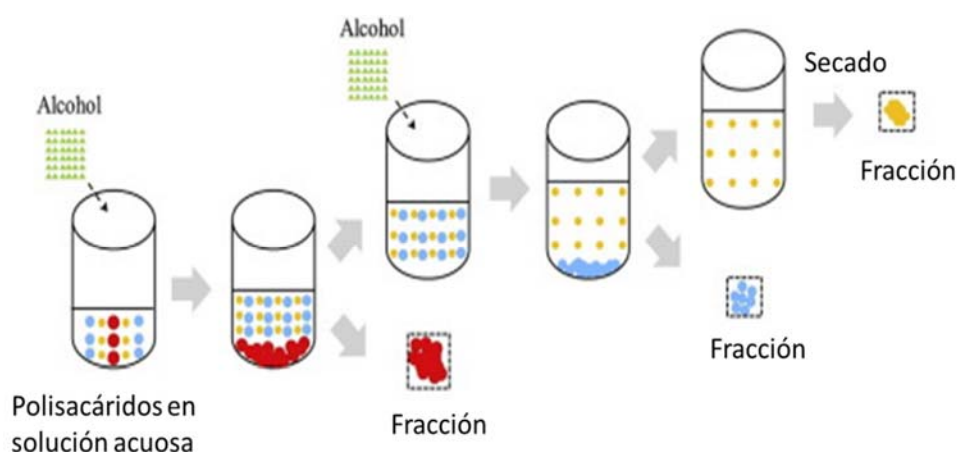


Figura 5-1. Representación esquemática de polisacáridos fraccionados por precipitación en etapas (en gradiente) con solventes (adaptado de (Hu and Goff, 2018)).

De esta forma, para la precipitación de polisacáridos más solubles se requiere una mayor proporción del no-solvente. Particularmente para el caso de las hemicelulosas, diferentes reportes indican que las hemicelulosas menos ramificadas precipitan en porcentajes más bajos de etanol y se logran precipitar hemicelulosas más ramificadas a mayor concentración de etanol (Peng *et al.*, 2009; Bian *et al.*, 2010).

Por otro lado, trabajar a baja temperatura disminuye la polaridad de los solventes y la solubilidad de polisacáridos, mejorando así la eficiencia de la precipitación. De esta forma, es habitual que luego del agregado de solvente se deje el sistema a 4 °C durante 24 horas o más, de forma que ocurra los cambios conformacionales mencionados y la precipitación de los polisacáridos (Bian *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2015). El tiempo de precipitación y sedimentación es otro factor por controlar, ya que a pesar de que en alcoholes la precipitación de los polisacáridos puede ser rápida, es necesario dejar un tiempo sustancial para que ocurra el agregado del precipitado y su sedimentación.

Otro parámetro que controlar es la concentración de polisacárido, ya que determina su solubilidad. La concentración no puede ser demasiado alta, fundamentalmente si se quiere realizar un

fraccionamiento gradual de los distintos polisacáridos. En condiciones de alta concentración ocurre en mayor extensión la coprecipitación de distintas fracciones. Sin embargo, si la concentración es muy baja, disminuirá la recuperación de polisacárido y aumentará sensiblemente el consumo de no-solvente (Hu *et al.*, 2015).

El pH de la solución acuosa es otro factor que puede tener incidencia en la eficiencia y características de la precipitación. Los grupos hidroxilo en la cadena de polisacáridos se encuentran ionizados a pH alto, lo que puede afectar la solubilidad del polisacárido. Asimismo, la solubilidad de los polisacáridos cargados es más sensible al pH, ya que el mismo afecta el nivel de ionización de grupos carboxilo y amino que pueden ser parte del polisacárido (Guo *et al.*, 2016; Hu and Goff, 2018). Hu *et al.* (Hu *et al.*, 2015) trabajando con soluciones de dextranos puras, encontraron que la mayor eficiencia de precipitación se obtiene a pH neutros o cercanos a la neutralidad. En el caso de la precipitación de las hemicelulosas, ya en 1926 O'Dwyer sugería realizar la precipitación de hemicelulosas a partir de licores alcalinos de madera de haya, agregando un "exceso suficiente" de ácido acético (O'Dwyer, 1926), no indicándose en este caso el pH de trabajo. En la revisión de literatura, se encontraron varios trabajos donde el agregado del no-solvente se realiza a pH 5,5 o 6, no justificándose esta elección (Peng *et al.*, 2009; Bian *et al.*, 2010; Egüés *et al.*, 2012).

Del mismo modo, hay que considerar la solubilidad de otros componentes, presentes en la solución y de los cuales se quiere separar el polisacárido. Por ejemplo, la presencia de lignina o compuestos fenólicos en los licores provenientes de biomasa lignocelulósica. En este caso el pH incide en la solubilidad del polisacárido (hemicelulosas en este caso), pero puede tener una incidencia más fuerte en la solubilidad de la lignina, por ejemplo. Por ello, encontrar el pH óptimo de trabajo no solo incide en la eficiencia de precipitación del polisacárido de interés, sino también en la separación de los otros componentes de la solución de partida.

5.3. Extracción con solventes (extracción líquido-líquido)

La extracción líquido-líquido (ELL) o extracción con solventes, es un sistema ternario típico en la industria química. Se ha utilizado en una amplia gama de aplicaciones para recuperar materiales deseables o eliminar impurezas no deseados de mezclas líquidas. La ELL es un proceso de transferencia de masa donde ocurre la transferencia de uno o más solutos entre dos líquidos inmiscibles, típicamente una solución acuosa y un solvente orgánico. De esta forma, están involucrados tres componentes en el proceso de ELL: soluto, solvente y extractante. La eficiencia de este método depende de la diferencia de solubilidad del compuesto a extraer entre los dos disolventes. Para un sistema dado, el soluto se

distribuirá en los distintos solventes en una determinada proporción determinada por su constante de reparto (Zhang and Hu, 2013; Bokhary, Leitch and Liao, 2020). Formalmente, al establecerse el equilibrio, el soluto estará repartido entre ambas fases de acuerdo con la Ecuación 5-2 , suponiendo que inicialmente el soluto esta disuelto en fase acuosa y se utiliza un solvente orgánico como extrayente.

Para la elección del solvente de extracción es necesario considerar el coeficiente de reparto, el coeficiente de distribución, el factor de separación y el factor de extracción. Además, son importantes otras propiedades del solvente a incorporar como: la inmiscibilidad frente al solvente en que está originalmente disuelto el compuesto de interés. También es importante tener en cuenta la recuperabilidad, densidad, tensión superficial, reactividad química, así como otras propiedades químicas (viscosidad, toxicidad, presión de vapor y congelamiento, etc.) (Treybal, 1988).

- Coeficiente de reparto: En el estado de equilibrio ideal, la concentración de soluto es lo suficientemente baja como para que cada molécula de soluto esté rodeada por solvente y se encuentra en el mismo estado molecular en los dos solventes. Por lo tanto, la fracción en peso de soluto en el extractante (y) dividida por la fracción en peso de soluto en el diluyente (x) en equilibrio es constante y está dada por el coeficiente de reparto como se indica en la Ecuación 5-1, denominado relación de partición (K) (Seader, Henley and Roper, 2011; Zhang and Hu, 2013):

$$K = \frac{y}{x} \quad \text{Ecuación 5-1}$$

- En la práctica, la relación de partición no es una constante por lo que se utiliza **el Coeficiente de distribución (A)** para describir la relación entre la concentración de soluto en el extractante (por ej. orgánico) y en el solvente (por ej. agua).



$$A = \frac{[S]_{org}}{[S]_{ac}} \quad \text{Ecuación 5-3}$$

El coeficiente de distribución se ve afectado además por la temperatura, el pH, así como cualquier otro soluto presente en la solución acuosa o en el extractante. A medida que aumenta el valor de A, el soluto se extrae más fácilmente.

- El **factor de Separación** (S_f) o Selectividad es un factor adimensional que mide el enriquecimiento relativo del soluto en una fase respecto a los otros componentes, luego de una etapa de separación.

$$S_f = \frac{S_e/R_e}{S_d/R_d}$$

Ecuación 5-4

S_e : Concentración del soluto deseado en el extrayente

S_d : Concentración del soluto deseado en el solvente original

R_e : Concentración del soluto no deseado en el extrayente

R_d : Concentración del soluto no deseado en el solvente original

Por otro lado, la extracción con solventes puede realizarse en una o varias etapas o en continuo a contracorriente. Del análisis de los diagramas trifásicos se desprende claramente que es más efectivo dividir el volumen de solvente en varias etapas de extracción, que realizar la extracción en una etapa (Treybal, 1988).

Relativo a la aplicación de las extracciones líquido-líquido en biorrefinerías, existen varios antecedentes. Se han utilizado en la recuperación de hemicelulosas y azúcares monoméricos de corrientes acuosas, separación de xilitol o furfural, extracción de ácidos carboxílicos de hidrolizados de biomasa, recuperación de biocombustibles (bioetanol y biobutanol) de caldos de fermentación, separación de lignina de licor negro., etc. (Zhang and Hu, 2013; Bokhary, Leitch and Liao, 2020). En la Tabla 5-1 se listan, a modo de ejemplo, algunas aplicaciones reportadas en bibliografía.

Tabla 5-1. Algunos ejemplos del uso de la extracción líquido-líquido en trabajos de biorrefinerías lignocelulósicas o producción de bioetanol.

Materia Prima	Condiciones de extracción	Resultados principales	Referencias
<i>Eucalyptus globulus</i> (hidrolizado posterior al tratamiento ácido)	Cloroformo, acetato de etilo, tricloroetileno, dietil éter o hexano, 3 etapas, 6 horas totales.	Remoción de compuestos fenólicos entre 28 – 50 % para los distintos solventes (rendimientos combinados con encalado). Mejora la producción posterior de xilitol por fermentación.	(Parajó, Domínguez and Domínguez, 1997)
Licor de pulpeo al sulfito (SSL)	Acetato de etilo, cloroformo, benceno, hexano, tricloroetileno y dietil éter. Para el mejor extractante (acetato de etilo) varios pH (1,5 a 6,5), varias etapas diferentes (1 a 3) y relaciones fase acuosa:extrayente (1:1 a 1:5). Tiempo de decantación: 30 a 390 minutos.	Mejor solvente extractante: acetato de etilo a pH original del licor: 3,6 en 1 etapa de extracción, con una relación 1:3 (fase acuosa: extractante) y 30 minutos de tiempo de decantación. Se recuperan 6,31 g GAE/L SSL (no se cuantifica valor en el SSL). Se recuperan 18,46 % de HMF, 12,5 % de furfural y 41,7 % de ácido acético, con una pérdida menor de azúcares (0,72 %).	(Llano <i>et al.</i> , 2015)
Licor de tratamiento hidrotérmico de <i>Eucalyptus globulus</i>	Acetato de etilo o dietil éter en 1 etapa con relaciones fase acuosa:extrayente entre 1:1 a 1:9. Temperatura: 10 a 40 °C, pH entre 3 y 6,5.	En las mejores condiciones (acetato de etilo) con una relación 1:5 se remueven 83-84 % de compuestos fenólicos que tienen propiedades antioxidantes (no es sensible a la temperatura). La misma eficiencia se logra en 2 etapas con una relación 1:1.	(Cruz <i>et al.</i> , 1999)
Residuos de poda de olivo (licor de hidrólisis ácida)	Cloroformo, hexano o acetato de etilo en 1 etapa, relaciones fase acuosa:extrayente entre 2:1 a 1:3	Remoción de inhibidores de fermentación furfural (94 %), HMF (40 %), compuestos fenólicos (49%) y ácido acético (no reporta eficiencia). Los valores en () indican	(Mateo <i>et al.</i> , 2013)

		la remoción en la mejor condición, en acetato de etilo, que resultó ser el mejor solvente.	
Mezcla de agua-etanol luego de fermentación	13 solventes orgánicos, relación fase acuosa:extrayente de 2:1	3 solventes (acetato de isoamilo, alcohol isooctílico y acetato de n-butilo) dieron los mejores resultados en términos de menor pérdida de etanol y mejor coeficiente de separación.	(Koullas, Umealu and Koukios, 1999)
Extracción en licor verde y de tratamiento hidrotérmico de mezcla de frondosas de América del norte	Oxido de Trioctilfosina (TOPO). Temperatura: 30 a 110 °C, 6 ciclos de agitación durante 6 segundos cada 6 minutos. pH entre 1,0 y 5,5. Relaciones de fase acuosa/fase orgánica entre 1:2 y 5:1.	Más del 70% del ácido acético se extrajo en una etapa a pH<3. Poco efecto de la temperatura. La extracción mejoró al aumentar la fracción de volumen de fase orgánica.	(Um <i>et al.</i> , 2011)

5.4. Resinas de intercambio y de adsorción

Los fenómenos de adsorción y el intercambio iónico pueden considerarse procesos similares, ya que en ambos un compuesto en solución es retenido por un sólido. El intercambio iónico puede clasificarse como un proceso de adsorción electrostática donde el mecanismo de intercambio se da por las diferencias de fuerzas atractivas de Coulomb entre los iones presentes y grupos funcionales cargados (Berrios *et al.*, 2013).

Las resinas de intercambio iónico son materiales sólidos capaces de absorber iones cargados de una solución y liberar una cantidad equivalente de otros iones en la misma. La estructura de la resina es una red polimérica insoluble con grupos funcionales que tienen carga positiva o negativa. La carga de los grupos funcionales de la resina es compensada por contra iones que, dependiendo de su afinidad, pueden posteriormente ser reemplazados por iones de igual carga (Alexandratos, 2009).

El intercambio iónico es un proceso estequiométrico, es decir, por cada ion removido de la solución a purificar, otro ion de igual carga es separado de la resina de intercambio y liberado a la solución. Sin embargo, el proceso de adsorción no es estequiométrico.

La Figura 5-2 describe un ciclo de uso de las resinas. Se observan las etapas de a) inicio del ciclo, donde los grupos funcionales están unidos a un contraión, b) uso de la resina (intercambio de iones u especies con mayor afinidad que el contraión que está ocupando el sitio activo de la resina); c) agotamiento, una vez que todos (o un alto porcentaje) de los contraiones han sido intercambiados, d) regeneración, con una solución concentrada que permite por mayor concentración de los contraiones volver a ocupar los sitios activos, desplazando los iones intercambiados y e) lavado a contracorriente para remover el excedente de regenerante y partículas ocluidas, con lo que la resina queda pronta para ser utilizada nuevamente.

La clasificación de las resinas de intercambio iónico depende de las propiedades físicas de la matriz y de los grupos funcionales asociados. Dependiendo de su capacidad para intercambiar especies cargadas positiva o negativamente, las resinas son clasificadas como intercambiadores de cationes o aniones, respectivamente. Las resinas de iones fuertemente ácidos y básicos están completamente ionizadas y, por tanto, son eficaces en casi todos los valores de pH (0 - 14). Los intercambiadores débilmente ácidos son típicamente eficaces en el rango de pH 5 – 14 mientras que las resinas débilmente básicas son efectivas en el rango de pH 0 – 9 (Berrios *et al.*, 2013).

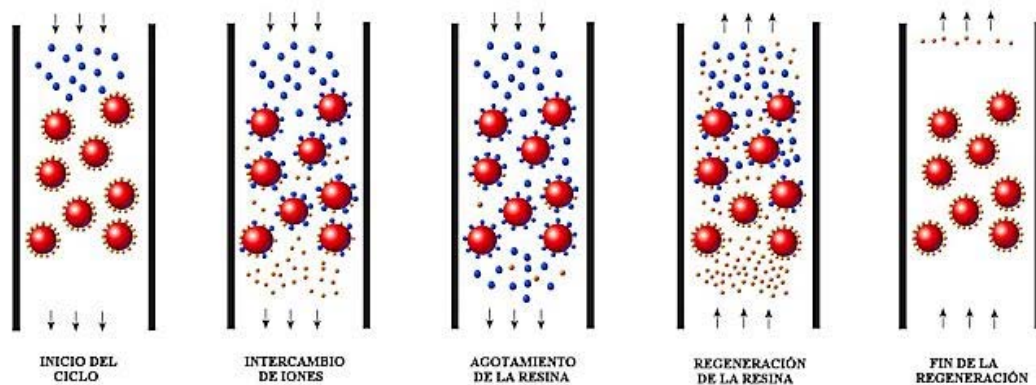


Figura 5-2. Ciclos de uso de las resinas de intercambio (Tomado de General Water Company-Argentina)

La capacidad de intercambio iónico alcanzable depende de la concentración de grupos funcionales y su disponibilidad como sitio de intercambio; siendo este último dependiente de la matriz de soporte. La capacidad de reticulación de la matriz determinará el grado de hinchamiento de la resina y la difusión de las especies dentro de la resina, afectando asimismo la capacidad de intercambio, la difusividad intrapartícula, la facilidad de regeneración y la estabilidad fisicoquímica. El grado de reticulación también afecta la velocidad de intercambio iónico. La difusividad intrapartícula disminuye casi exponencialmente con el tamaño de la matriz (Berrios *et al.*, 2013). Otras propiedades importantes que se han de considerar también son: la selectividad de la resina, la densidad, el tamaño de partícula y la estabilidad y vida útil de la misma.

Para el diseño de un sistema de intercambio iónico normalmente se utiliza la Ecuación 5-5.

$$V_{resina}(L_R) = \frac{\text{concentración}[eq/L] \cdot Q[L/h] \cdot \text{tiempo}[h]}{\text{capacidad}[eq/L_R]} \quad \text{Ecuación 5-5}$$

Donde V_{resina} es el volumen de resina a emplear, la concentración en equivalentes por litro refiere a la concentración de los compuestos a intercambiar en la solución, Q refiere al caudal de solución y tiempo al tiempo definido entre ciclo de regeneraciones de la resina. La capacidad indica la capacidad de intercambio de la resina, el que viene dado de origen por el fabricante y que se puede medir fácilmente en el laboratorio en los casos de las resinas de intercambio iónico.

Teóricamente, la masa de resina iónica necesaria se puede describir de acuerdo con las expresiones empíricas de Langmuir o Freundlich. La expresión de Langmuir se expresa de acuerdo con la Ecuación 5-6.

$$q_e = \frac{q_{\max} b C_e}{1 + b C_e} \quad \text{Ecuación 5-6}$$

Donde q_e es la cantidad de compuestos adsorbidos en el equilibrio (mg/g), C_e es la concentración de compuestos en equilibrio en solución (mg/L), $q_{\max}$ es la capacidad máxima de adsorción de la columna y b es la constante de Langmuir relacionada con el calor de adsorción del proceso (Paul Chen, Yang, *et al.*, 2006).

Por su parte, la expresión de Freundlich se indica en la Ecuación 5-7.

$$q_e = K_f C_e^n \quad \text{Ecuación 5-7}$$

Donde K_f es la constante de adsorción de Freundlich y n está relacionada con la intensidad de la adsorción.

Las constantes de adsorción de ambas ecuaciones se pueden obtener experimentalmente por regresiones lineales o no lineales, resultando la segunda ecuación en un ajuste mejor de los datos experimentales. Sin embargo, estas ecuaciones empíricas no describen bien el mecanismo de sorción cuando hay especies iónicas. Para ello se ha desarrollado la teoría IX (o teoría de elución por gradiente), pero solamente para soluciones simples donde solo está presente la especie a intercambiar (Freiling, 1955; Paul Chen, Yang, *et al.*, 2006). Esta teoría permite hallar una expresión para la fracción equivalente del compuesto de interés que queda retenido en la resina, la misma está dada por la Ecuación 5-8.

$$\overline{X_A} = \frac{K_{A \rightarrow B} X_A}{1 + (K_{A \rightarrow B} - 1) X_A} \quad \text{Ecuación 5-8}$$

Donde $\overline{X_A}$ es la fracción equivalente del compuesto de interés retenido en la resina, $K_{A \rightarrow B}$ la constante termodinámica de la reacción de intercambio y X_A la fracción equivalente del compuesto de interés

en la solución. A y B son los compuestos en la solución y $\bar{A}$ y $\bar{B}$ refiere a los compuestos adsorbidos en la resina. Para el cálculo de $K_{A \rightarrow B}$ se considera la reacción expresada en la Ecuación 5-9.

$m\bar{A}^{n+} + n\bar{B}^{m+} \Leftrightarrow m\bar{A}^{n+} + n\bar{B}^{m+}$	Ecuación 5-9
$K_{A \rightarrow B} = \frac{\{\bar{A}^{n+}\}^m \{\bar{B}^{m+}\}^n}{\{A^{n+}\}^m \{B^{m+}\}^n}$ $K_{A \rightarrow B} = \left(\frac{\{\bar{A}^{n+}\}}{\{A^{n+}\}} \right)^m \left(\frac{\{\bar{B}^{m+}\}}{\{B^{m+}\}} \right)^n$	
$K_{A \rightarrow B} = \frac{K_A}{K_B}$	Ecuación 5-10

Donde los corchetes representan la concentración de los compuestos y la barra en la parte superior indica las especies retenidas en la resina. Cuando no se pueden hallar los valores de concentración de las especies requeridos para la ecuación se puede utilizar la Ecuación 5-10, donde K_A y K_B se encuentran tabulados en la literatura, para las especies iónicas habitualmente intercambiadas (Paul Chen, Yang, *et al.*, 2006).

Mientras que la capacidad de intercambio de las resinas de intercambio iónico se atribuye principalmente a la presencia de enlaces de hidrógeno, se cree que los factores responsables de la efectividad en la adsorción de las resinas no polares (o de adsorción) son la hidrofobicidad, la gran superficie específica y la estructura macrorreticular muy interconectada. Particularmente, la capacidad de adsorción de los compuestos fenólicos en las resinas de estireno-divinilbenceno es atribuida a la interacción hidrofóbica π - π entre los anillos fenólicos y la matriz (Yu and Christopher, 2017). En estos casos, las ecuaciones de Langmuir y/o Freundlich se han utilizado para modelar el comportamiento teórico del fenómeno de adsorción y hay algunos ejemplos exitosos de aplicación en el ajuste de estos modelos al uso de resinas de adsorción del tipo XAD para la purificación de xilosacáridos (Gottumukkala *et al.*, 2014; Yu and Christopher, 2017; Cao *et al.*, 2020).

En el área de las biorrefinerías, existen varios ejemplos de uso de las resinas de intercambio iónico o de adsorción. Inicialmente fueron utilizadas para la detoxificación de los licores a fermentar para la producción de bioetanol o xilitol (Larsson *et al.*, 1999; Weil *et al.*, 2002; de Carvalho *et al.*, 2004). Más recientemente hay varios ejemplos de utilización para la remoción de ácidos alifáticos o compuestos

fenólicos de los licores ricos en carbohidratos, como xilosa, glucosa o manosa(Lehto and Alén, 2012; Yu and Christopher, 2017). La Tabla 5-2 muestra ejemplos del uso de estas reportados en la bibliografía.

Tabla 5-2. Algunos ejemplos del uso resinas de intercambio iónico y de adsorción en trabajos de biorrefinerías lignocelulósicas.

Materia Prima	Condiciones de uso de las resinas	Resultados principales	Referencias
Abeto (hidrolizado posterior al tratamiento ácido)	Resina de intercambio aniónico fuerte (Bio-Rad AG 1-X8) a pH 10 y pH 5 durante 1 hora en modo batch.	Remoción de compuestos fenólicos casi completamente a pH 5 y a un 25 % de la inicial a pH 10. Mejora importante en la productividad de etanol. Pérdida de 26% de azúcares fermentables (glucosa y manosa).	(Larsson <i>et al.</i> , 1999)
Rastrojo de maíz (hidrolizado ácido)	Resinas de intercambio aniónico fuerte (6 diferentes), en columna, flujo de 3 ml/min y 3 volúmenes de lecho.	Para el caso de la Purolite A 103 que dio mejores resultados: remoción de más de 95 % de HMF, furfural, ácido acético y color y una recuperación de xilosa del 94%.	(Nilvebrant <i>et al.</i> , 2001)
Bagazo de caña (hidrolizado posterior tratamiento ácido)	Detoxificación para posterior producción de xilitol por fermentación. 3 resinas aniónicas fuertes en serie + 1 resina catiónica fuerte.	El sistema de 4 columnas en serie logró la remoción de 82,1 % furfural, 66,5% HMF, 61,9 % lignina soluble.	(de Carvalho <i>et al.</i> , 2004)
Granos de cebada luego de procesados (licor de tratamiento hidrotérmico)	Resina aniónica débil (Dowex-MWA1) o resina catiónica fuerte (IRN-77). 1 hora de tratamiento en batch, relación 5:1 volumen:masa. Resina aniónica a pH 5,5 y 0,77. Resina catiónica a pH 5,5 y 10. Remoción de resina por filtración y ajuste de eluido a pH 5,5.	Detoxificación para la producción de xilitol. Resina aniónica a pH 0,77 (mejor resultado en aniónica): recuperación de 93% monosacáridos, remoción de 48% ác. acético, 58% ác. fórmico, 64% furfural, 44 % HMF. Resina catiónica a pH 5,5 (mejor condición): recuperación de 100 % monosacáridos, escasa remoción de los componentes no deseados, solo 67 % de remoción de furfural.	(Carvalho <i>et al.</i> , 2005)

Bagazo de caña de azúcar (licor de tratamiento hidrotérmico)	Detoxificación para la producción de xilitol. Líquido post hidrólisis ácida, encalado y adsorción con carbón activado. Resina aniónica débil (Amberlite IRA-67) 10-15 g resina/100 mL.	Remoción de 96 % ác. Acético.	(Vallejos <i>et al.</i> , 2016)
Mezcla de chips del norte de Estados Unidos (licor de extracción con licor verde 2% y licor de tratamiento hidrotérmico)	Resina de adsorción (Amberlite XAD-4). 4 g de resina en columna + 5 mL solución por 10 minutos.	Remoción completa de furfural y compuestos fenólicos de ambos extractos. Luego de dos lavados con agua, recuperación de + de 95 % de glucosa y xilosa. Baja remoción de ácidos alifáticos (menos de 20 %).	(Schwartz and Lawoko, 2010)
Álamo (licor de tratamiento de explosión de vapor)	Resinas de adsorción XAD-4 y resinas aniónicas fuertes (IRA-400) e IRA-958, en batch, 12,5 g resina/20 ml hidrolizado, 150 rpm, 8 horas a 23 °C.	97% de remoción de lignina soluble con XAD-4, 97,6 % con IRA 400 con OH como contraíón y 79,6 % con Cl como contraíón. 54,6% con IRA-958. No se reporta recuperación de carbohidratos	(Yu and Christopher, 2017)
Paja de arroz (tratamiento ácido)	Resinas de adsorción Amberlite XAD-4, XAD-7 y XAD-16 y resina aniónica fuerte Seralite 400. Relación 1% resina/hidrolizado en batch, 200 rpm durante 8 horas a 30 °C.	Con XAD-16 se logran las mejores remociones, aunque no se indica la recuperación de carbohidratos. Remoción con XAD-16:60 % ácido fórmico y 75% ácido acético.	(Gottumukkala <i>et al.</i> , 2014)

5.5. Membranas de micro, ultra y nanofiltración

Los procesos con membranas son normalmente procesos de separación y la tecnología de separación con membranas ha sido adoptada por diferentes tipos de industrias en los último 50 años, habiendo aumentado su uso y versatilidad en los últimos años (Ho and Sirkar, 1992; Paul Chen, Mou, *et al.*, 2006; Thuvander, 2018). El equipamiento es a menudo más pequeño y modular que los sistemas de separación convencionales y los costos de capital han disminuido considerablemente en los últimos años, por lo que se considera una tecnología eficiente desde el punto de vista de los costos de operación y energéticos (Ho and Sirkar, 1992; Thuvander, 2018).

Una membrana se define como una barrera intermedia que separa dos fases y / o actúa como una pared activa o pasiva que restringe el transporte de varios compuestos químicos de manera selectiva. Se trata de una capa delgada que puede separar materiales en función de sus propiedades físicas y químicas cuando una fuerza impulsora, ya sea un gradiente de potencial químico (concentración o gradiente de presión) o eléctrico se aplica a través de la membrana. Una membrana puede ser homogénea o heterogénea, simétrica o asimétrica, sólida o líquida; puede tener carga positiva o negativa o ser neutra (Paul Chen, Mou, *et al.*, 2006; Palacio, Prádanos and Hernández, 2014). La Figura 5-3 muestra un esquema básico del funcionamiento de las membranas, mientras que los distintos tipos de membranas mencionados se esquematizan en la Figura 5-4.

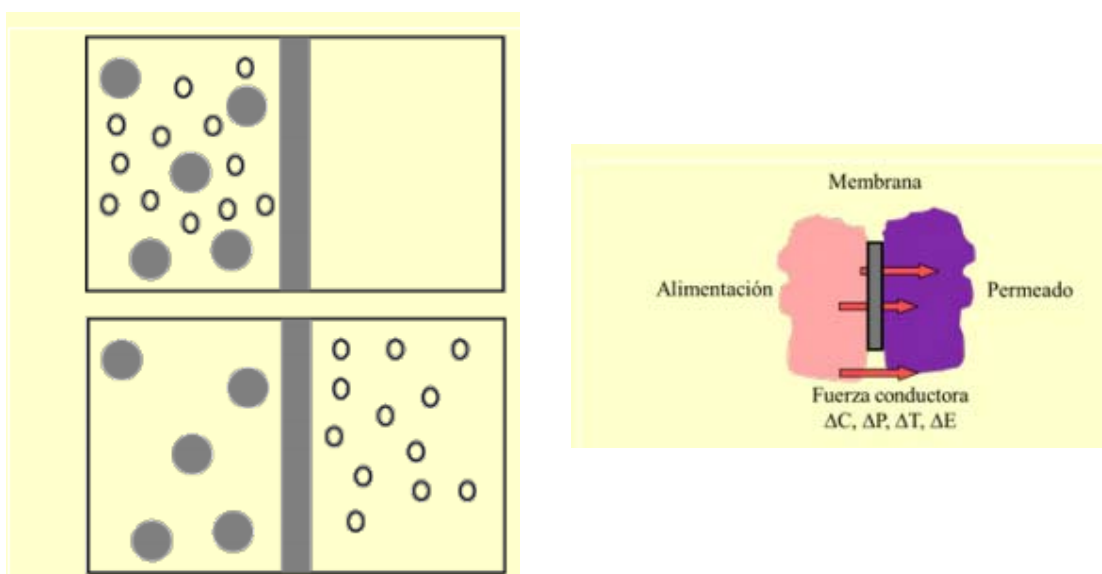


Figura 5-3. Representación esquemática de la separación por membranas. Tomado de (Palacio, Prádanos and Hernández, 2014).

Algunos requisitos básicos para las membranas son: lograr alto flujo del producto, tener buena resistencia mecánica para soportar la estructura física y tener buena selectividad para separar las sustancias deseadas. Generalmente, la alta selectividad está relacionada con propiedades de la membrana, como poros pequeños y alta resistencia hidráulica o baja permeabilidad. Puede verse comprometida por una distribución de tamaños de poro muy grande. La permeabilidad aumenta con el aumento de la densidad de los poros y la resistencia total de la membrana es directamente proporcional a su espesor. Por tanto, una buena membrana debe tener un rango estrecho de tamaños de poro, una alta porosidad y una capa delgada de material (Paul Chen, Mou, *et al.*, 2006; Palacio, Prádanos and Hernández, 2014).

Las membranas pueden ser densas o porosas. La separación por membranas densas se basa en la interacción fisicoquímica entre los componentes permeables y el material de la membrana. Las membranas porosas, por otro lado, se basan la separación en la exclusión de tamaño.

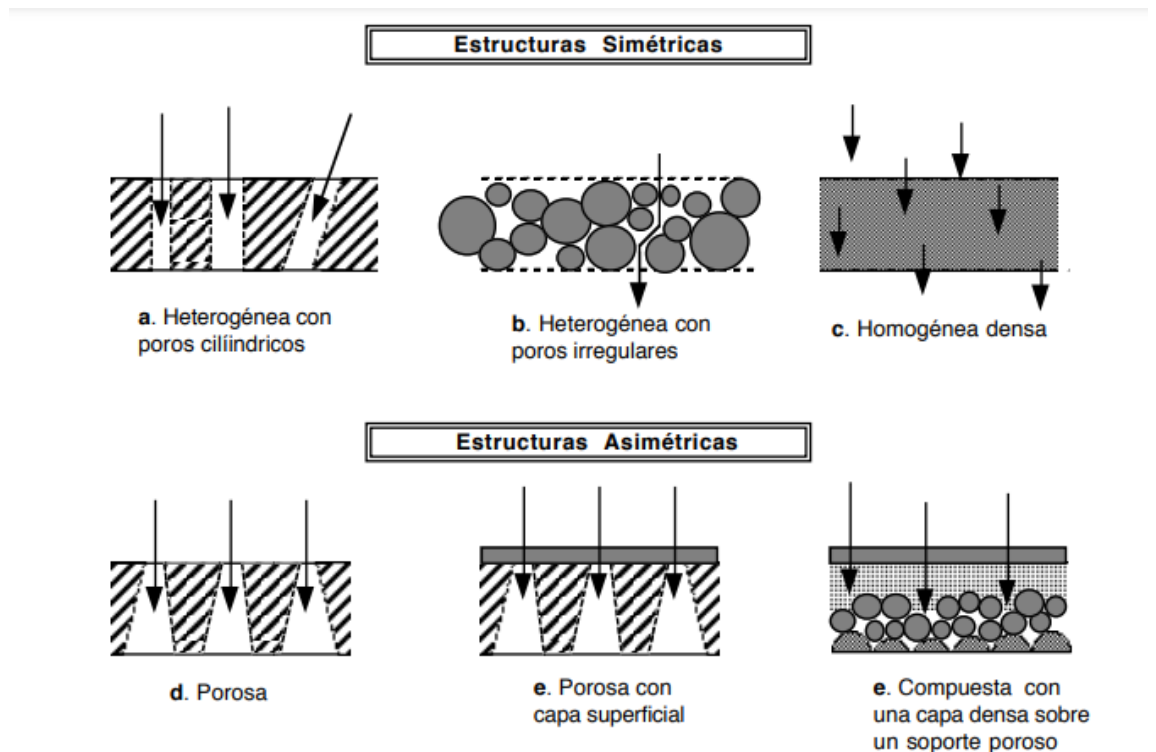


Figura 5-4. Representación esquemática de la estructura de las membranas artificiales.

Las membranas se pueden clasificar en orgánicas (o poliméricas) o inorgánicas (cerámicas o metálicas), de acuerdo con su composición y su morfología es dependiente de la naturaleza del material a utilizar y del proceso de fabricación.

De acuerdo con la forma de filtración, los procesos se pueden considerar de filtración frontal (o “Dead end”) o de filtración tangencial, como se muestra en la Figura 5-5. Los sistemas de separación de membranas constan de una corriente de alimentación y dos corrientes de salida: el permeado y el retenido o concentrado. El permeado es la porción de fluido que pasó a través de la membrana y el retenido constituye la corriente de fluido que fue rechazada por la membrana (Paul Chen, Mou, *et al.*, 2006; Alfa Laval, 2020).

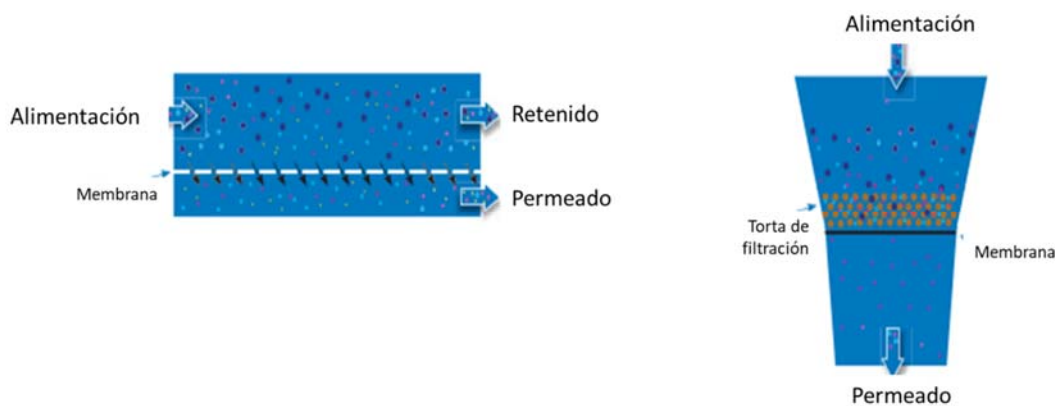


Figura 5-5. Filtración tangencial (izquierda) y filtración frontal. Adaptado de (Alfa Laval, 2020).

La filtración tangencial (o en flujo cruzado) tiene importantes ventajas integradas sobre la filtración frontal ya que el flujo de alimentación es procesado continuamente a través de la membrana, y una vez establecido el estado estacionario, la torta de filtración se mantiene estable y no aumenta la resistencia al filtrado. Esto hace posible operar de forma continua y automatizada, logrando mejor control de calidad del producto y extendiendo la vida útil de las membranas (Alfa Laval, 2020).

Las membranas de filtración habitualmente se caracterizan según el peso molecular de las sustancias retenidas, es decir, el peso molecular de corte (“o corte de la membrana”), denominado MWCO. El corte de la membrana es igual al peso molecular donde se retiene el 90% de un compuesto con peso molecular exactamente conocido. Para la separación de soluciones líquidas, generalmente se consideran cuatro categorías de membranas de acuerdo al tamaño del material a separar del líquido de alimentación, estos son: ósmosis inversa, nanofiltración, ultrafiltración y microfiltración, en orden

creciente tamaño de poro (Paul Chen, Mou, *et al.*, 2006; Alfa Laval, 2020). En la Figura 5-6 se esquematizan los distintos procesos de separación por membranas, así como las presiones normalmente aplicadas de acuerdo al tipo de procesamiento con membranas utilizado.

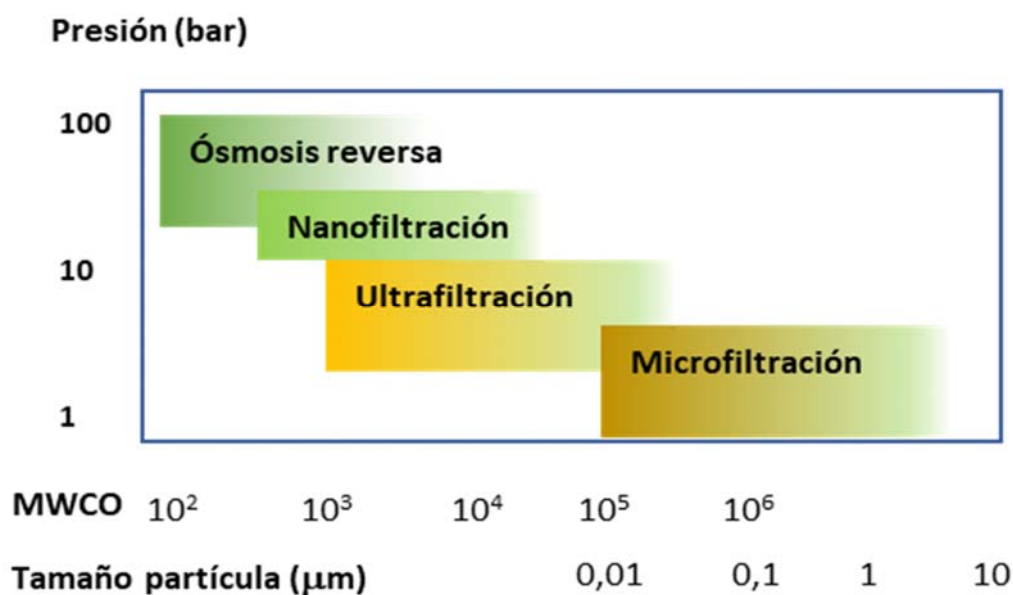


Figura 5-6. Clasificaciones de los procesos convencionales de separación con membranas. Tomado de (Thuvander, 2018).

De las membranas utilizadas en la separación en líquidos, la ósmosis inversa (RO) utiliza las de poros más pequeños (aproximadamente con tamaños de corte menores a 100 -200 Da). En principio, el agua es el único líquido que puede atravesar la membrana, todos los demás compuestos (sales, azúcares, etc.) idealmente no podrán atravesarla. La nanofiltración (NF) no es una separación tan fina como la ósmosis inversa, trabajando con cortes de membrana entre 200 y 1.000 Da aproximadamente. Los usos de las membranas de nanofiltración son más versátiles que la anterior. La nanofiltración permite que iones pequeños atraviesen la membrana, excluyendo iones más grandes y la mayoría de los componentes orgánicos. La ultrafiltración (UF) implica el uso de membranas en el que los poros son más grandes y la presión utilizada es relativamente baja. Sales, azúcares, ácidos orgánicos y péptidos pequeños pueden atravesar la membrana, mientras que las proteínas, grasas y polisacáridos de mayor tamaño no pueden. Un tamaño de corte entre 1.000 y 100.000 Da se considera en el rango de la ultrafiltración. En la microfiltración (MF), no atraviesan la membrana los sólidos en suspensión, las bacterias y los glóbulos de grasa mientras que sustancias de menor tamaño deberían atravesarla (Thuvander, 2018; Alfa Laval, 2020).

La eficiencia de un proceso de filtración con membrana depende de una serie de parámetros relacionados con las propiedades de la membrana y de la alimentación, así como de parámetros operativos, por ejemplo, si se está trabajando con flujo cruzado (tangencial) o flujo frontal. Como en esta tesis se trabajará con este último, se indican las ecuaciones a tener en cuenta en esta situación.

Para el cálculo del flujo volumétrico (o permeado, J) se utiliza la ley de Darcy (Ecuación 5-11), mientras que la Figura 5-7 esquematiza los distintos parámetros a considerar.

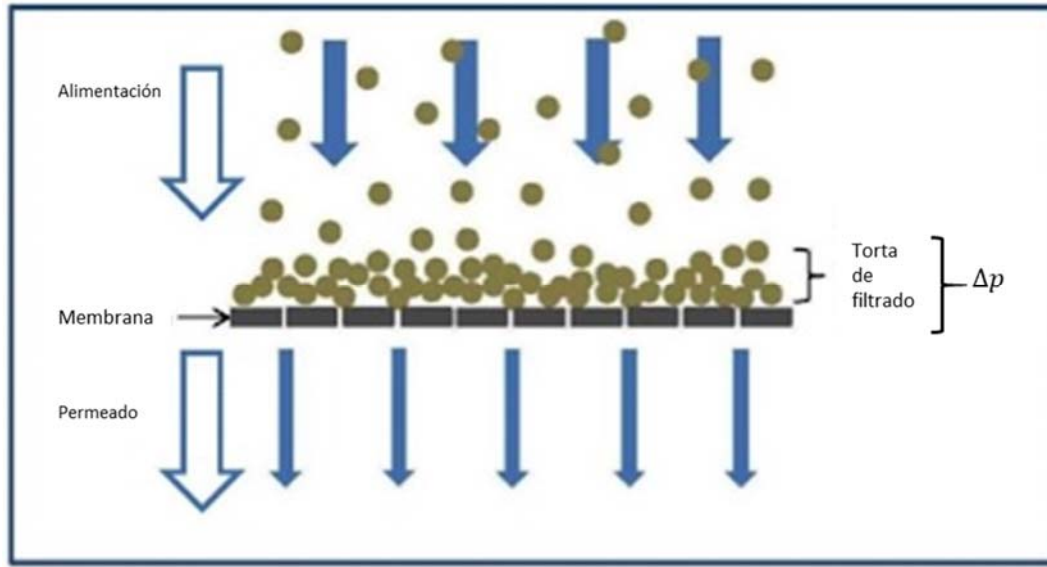


Figura 5-7. Esquema de la filtración frontal indicando los parámetros involucrados. Tomado de (Ho and Sirkar, 1992)

$$J \equiv \frac{1}{A} \frac{dV}{dt} = \frac{\Delta p}{\eta_0 (R_m + R_c)} \quad \text{Ecuación 5-11}$$

Donde V es el volumen de permeado, A es el área de membrana, t es el tiempo de filtración, Δp es la caída de presión al atravesar la membrana y la torta de filtrado, η_0 es la viscosidad del fluido, R_m es la resistencia de la membrana, la que puede incrementarse en el tiempo dado por el ensuciamiento ("fouling") de la membrana y la compactación de los poros y R_c es la resistencia que realiza la torta de filtración, que también puede aumentar con el tiempo dado por el incremento del espesor y la compactación de la misma (Ho and Sirkar, 1992).

Dos conceptos normalmente utilizados en la práctica y donde los fabricantes de membranas reportan valores de referencia, son los conceptos de Permeabilidad (P) y Permeabilidad relativa (P_{rel}), definidos por las siguientes ecuaciones:

$$P = \frac{m_p}{A \cdot t \cdot p} \quad \text{Ecuación 5-12}$$

$$P_{rel} = \frac{P}{PWP} \quad \text{Ecuación 5-13}$$

Donde m_p es la masa de permeado, A es el área de membrana, t el tiempo aplicado, p la presión aplicada. PWP es la permeabilidad obtenida cuando se utiliza agua pura en las mismas condiciones del ensayo (Koivula *et al.*, 2013).

A su vez, el factor de reducción de volumen (VRF) se define a partir de las masas del líquido de alimentación (m_f) y la masa de permeado (m_p), ya que se asume que las diferencias de densidades entre estas son despreciables.

$$VRF = \frac{m_f}{m_f - m_p} \quad \text{Ecuación 5-14}$$

Por otra parte, la acumulación de suciedad en la superficie de la membrana y dentro de los poros aumentará la resistencia a la filtración, reduciendo el flujo y afectando también la selectividad de la membrana. Hay varios mecanismos responsables del ensuciamiento de la membrana: adsorción de material en los poros, taponamiento de los poros, formación de una torta de sólidos y/o precipitación de sustancias inorgánicas (incrustaciones) en la superficie de la membrana. Particularmente, en el caso del material lignocelulósico es habitual el ensuciamiento de la membrana con extractivos hidrófobos, polisacáridos y lignina (Thuvander, 2018). Para determinar cómo afecta el fouling luego de los ensayos con membranas se puede calcular la reducción del flujo de agua pura (PWF_R) de acuerdo a la siguiente ecuación (Koivula *et al.*, 2013):

$$PWF_R = \frac{PWF_b - PWF_a}{PWF_b} * 100 \quad \text{Ecuación 5-15}$$

Donde PWF_b es el flujo de agua pura al realizar la determinación luego del/los ensayos con la solución a tratar y PWF_a es el flujo de agua pura realizado previo al ensayo con la solución a tratar. Para el cálculo de estos flujos de agua, se tiene en cuenta la masa de permeado en el tiempo de ensayo y el área de la membrana utilizada.

Ha sido reportado desde hace varios años el uso de la tecnología de membranas en efluentes o corrientes de proceso de las plantas de pulpa de celulosa (Kraft, termoquímica, etc.). Del mismo modo, existen varios ejemplos de utilización de esta tecnología en el área de las biorrefinerías. En los próximos párrafos se indican algunos de estos ejemplos.

Jönsson *et al.* (Jönsson, Nordin and Wallberg, 2008) utilizaron 4 licores negros Kraft provenientes de distintos efectos de evaporación de plantas suecas de madera de latifoliadas y coníferas, es decir con distintos contenido de sólidos y composición en términos de tipos de lignina y hemicelulosas. Ensayaron la ultrafiltración de los licores con membranas cerámicas entre 4000 y 100000 Da, a 60 °C y 200 kPa. Encontraron una retención selectiva de las hemicelulosas frente a la lignina, siendo la separación más efectiva en madera de latifoliadas.

Ziesig *et al.* (Ziesig, Tomani and Theliander, 2014) utilizaron licor negro de *Eucalyptus globulus* y licor negro de coníferas (40 % sólidos secos en ambos casos) con el objetivo de concentrar la lignina y separarla de hemicelulosas y iones metálicos previo a precipitar la primera. Realizando una micro y ultrafiltración en serie, utilizando membranas cerámicas de 0,2 μ m, 300 kDa y 15 kDa de corte nominal a temperaturas de 70-85 °C. Para ambos licores reportaron que lograron retener selectivamente las hemicelulosas, pasando fundamentalmente la lignina al permeado. Respecto al contenido de iones, al precipitar la lignina proveniente de licor negro de eucalipto, la misma presentó un menor contenido de calcio frente a la lignina precipitada sin ultrafiltrar, y la lignina proveniente de pino presentó un menor contenido de Ca, Si y Al, entre otros iones que formaban parte del licor original.

Por su parte, Thuvander *et al.* (Thuvander, Lipnizki and Jönsson, 2019) reportaron la recuperación “in situ” de galactoglumananos a partir del agua de proceso en una planta de pulpeo termomecánico de madera de abeto. Utilizaron un sistema de microfiltración y ultrafiltración en serie. Para la microfiltración se utilizó un equipo de membranas cerámicas tubulares con 26 elementos filtrantes, que otorgaron una gran área de filtración, trabajando en el entorno de 75 °C. El permeado de esta membrana fue filtrado por una membrana en conformación de espiral fabricada en celulosa regenerada y con un corte nominal de 10 kDa. En un ensayo de microfiltración de 10 días de duración, se logró retener en el orden de 60-70 % de las hemicelulosas presentes. La retención de las

hemicelulosas en los ensayos de ultrafiltración fue entre el 80-93 % de las hemicelulosas presentes en el permeado de la microfiltración.

En el trabajo de Egües *et al.* (Egües *et al.*, 2012) se trabajó con licor hidrotérmico obtenido a partir de residuos de maíz. El mismo se ultrafiltró en serie con un sistema de membranas multicanales de filtrado tangencial, el cual permitió obtener una importante área superficial. Se utilizaron membranas cerámicas de 1,5 y 10 kDa aplicando una presión máxima de 4 bar. En el retenido de la membrana de 10 kDa se encontró la mayor fracción de hemicelulosas, permaneciendo los monómeros en el permeado de la membrana de menor corte.

Koivula *et al.* (Koivula *et al.*, 2013) utilizaron licores de autohidrólisis de abedul y de una mezcla de eucalipto/pino y trabajaron con un sistema de filtración frontal y membranas de Polisulfona y polietersulfona de 5.000 y 4.000 Da, respectivamente. Reportaron que la filtración en abedul no fue posible y para el caso de pino/eucalipto el flujo obtenido (trabajando a una P de 5 bar) fue extremadamente bajo. Para mejorar esto, realizaron un tratamiento previo con resinas de adsorción (Purolite XAD7 y XAD 16), logrando mejorar significativamente los flujos de filtrado en ambos casos.

En el trabajo de Gullón *et al.* (Gullón *et al.*, 2008) a partir de licor hidrotérmico de *Eucalyptus Globulus*, se utilizaron membranas cerámicas tubulares de nano (1 kDa) y ultrafiltración (5, 15 y 50 kDa) para refinar y concentrar los oligosacáridos obtenidos. Se encontraron problemas importantes de reducción de flujo por fouling irreversible a medida que transcurrían los ensayos. Las membranas de 1 y 5 kDa permitieron la separación selectiva de oligosacáridos de los monómeros y la concentración de los primeros en el retenido.

PARTE EXPERIMENTAL

6. PRETRATAMIENTOS: PRE-EXTRACCIÓN CON LICOR VERDE SOBRE CHIPS PREVIO AL PULPEO KRAFT

Este trabajo fue parte del Proyecto de Investigación ANII-FSE_1_2011_1_6456- “Recuperación de hemicelulosas previo al pulpeo Kraft como materia prima para la producción de bioetanol”, del cual fui responsable. En este documento se analizará el efecto del pretratamiento con licor verde sobre la extracción de hemicelulosas en chips industriales de *Eucalyptus grandis* y se mencionará brevemente cómo afecta las propiedades de la pulpa de celulosa obtenida. La producción de bioetanol a partir del licor extraído no es parte de esta tesis.

De este proyecto surgieron hasta el momento tres publicaciones en revistas referadas:

- CABRERA M.N.; ARROSBIDE F.; FRANZONI P.; CASSELLA N. “Integrated forest biorefineries: green liquor extraction in eucalyptus wood prior to kraft pulping. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2016. ISSN: 21906815; DOI: 10.1007/s13399-016-0203-0.
Este artículo está directamente relacionado con este capítulo. En él, fui el redactor principal, quien ideó los experimentos y dirigió el trabajo experimental. Participé en la realización de experimentos y realicé el tratamiento de datos.
- GUIGOU M.; CEBREIROS F.; CABRERA M.N.; FERRARI M.D.; LAREO C. “Bioethanol production from *Eucalyptus grandis* hemicellulose recovered before kraft pulping using an integrated biorefinery concept.” *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2016; ISSN: 21906815; DOI: 10.1007/s13399-016-0218-6
Este artículo es complementario al trabajo de este capítulo. En el mismo, fui redactor secundario y quien ideó los experimentos de pre-extracción. Participo en la realización de experimentos e hice el tratamiento de datos de esa parte del documento. Participé en las discusiones sobre las acciones para llevar a cabo la producción de bioetanol con el licor extraído.
- CEBREIROS F., GUIGOU M.D., CABRERA M.N. “Integrated forest biorefineries: Recovery of acetic acid as a by-product from eucalyptus wood hemicellulosic hydrolysates by solvent extraction”, *Industrial Crops and Products*, 2017, v.: 109 p.:101 - 108, ISSN: 09266690, DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.08.012
Este artículo es complementario al trabajo de este capítulo. Fui redactor secundario. Este trabajo es fruto de una Pasantía de Grado en Ingeniería Química, de la cual fui tutora. Participé en la diagramación de los ensayos y procesamiento de resultados, así como en la discusión de resultados.

6.1. Objetivos específicos

- Evaluar las mejores condiciones de extracción de xilosacáridos de chips de eucalipto previo al pulpeo Kraft, procurando no perder la calidad de la pulpa a producir con los chips extraídos.
- Estudiar los productos formados en la extracción con licor verde, usando como variables la temperatura y tiempo de extracción y la carga de licor verde utilizada.

6.2. Metodología

La Figura 6-1 muestra los ensayos que se realizaron en el marco del Proyecto. La línea punteada indica los ensayos que serán discutidos en este capítulo.



Figura 6-1. Esquema de los procesos realizados. La línea punteada indica los procesos que serán discutidos en este capítulo.

6.2.1. Preparación y caracterización de la biomasa utilizada.

Se utilizaron chips industriales de *Eucalyptus grandis* de la planta de pulpa de celulosa de UPM-Fray Bentos. Se tomaron los chips luego del cribado de estos por tamaño. Los chips fueron secados a 40 °C y mantenidos en ambiente seco hasta su uso. La Figura 6-2 muestra una imagen de los chips utilizados y la Tabla 6-1, la composición química de estos. El contenido de extractivos fue determinado por la norma TAPPI T264 cm-07, cenizas por TAPPI standard method T211 om-02 y el contenido de carbohidratos y lignina según NREL/TP-510-42618 (2012), midiéndose la lignina soluble en ácido a 205nm de acuerdo con TAPPI-UM250.

Tabla 6-1. Composición química de la biomasa utilizada en base madera seca (%b.m.s.) (n=4).



Figura 6-2. Chips industriales utilizados.

Componente	% ± σ
Extractivos (acetona/agua)	2,4 ± 0,1
Cenizas	0,4 ± 0,1
Lignina soluble	3,1 ± 0,2
Lignina insoluble	24,9 ± 0,9
Lignina total	28,0 ± 1,0
Xilanos	13,2 ± 0,1
Glucanos	44,9 ± 4,4
Arabinanos	< 1
Grupos acetilo (como HAc)	3,8 ± 0,1

6.2.2. Ensayos de extracción con licor verde

Los ensayos de extracción se realizaron en reactores de acero inoxidable de 1,4 L que se colocaron dentro de un reactor circulante Kumagai Riki Kogyo (Japón) de 15 litros (Figura 6-3). La relación licor: madera (L/W) fue 3.5. Las extracciones se realizaron utilizando agua (0 % GL) y diferentes concentraciones de licor verde (% GL), trabajando entre 1 y 6 % GL. El licor verde fue preparado en el laboratorio, utilizando reactivos químicos de pureza conocida (Na_2CO_3 , Na_2S y NaOH). Para determinar el contenido de álcali total, activo y efectivo de los licores a emplear se utilizó la norma SCAN-N 30:85. La temperatura máxima varió en el rango de 100 - 160 ° C y el tiempo a temperatura máxima varió de 30 a 150 min. Esto significó una variación del factor H entre 0 y 1000 aproximadamente. El factor H se define por la expresión indicada en la Ecuación 6-1

$$\text{factor } H = \int_0^t e^{[43,19 - (16,113/T)]} dt \quad \text{Ecuación 6-1}$$

Donde t es el tiempo en horas y T es la temperatura en Kelvin (K).



Figura 6-3. Reactor circular de 15 L donde se colocaron 4 cápsulas metálicas para los ensayos experimentales.

La Tabla 6-2 muestra las diferentes condiciones ensayadas. Al finalizar la extracción, el licor fue completamente drenado y los chips lavados con abundante agua desionizada. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado, lavando dos réplicas y dejando dos réplicas sin lavar, las que fueron utilizadas para producir pulpa marrón.

Tabla 6-2. Condiciones de pre-extracción con licor verde realizadas.

Temperatura (°C)	Tiempo a Temp (min)	% Licor Verde	Factor H
100	120	4	2
100	120	6	2
120	60	2	10
120	60	6	10
140	30	2	39
140	30	4	39
140	60	2	69
140	60	7	69
140	90	2	117
140	90	4	117
140	90	6	117
155	60	0	288
155	60	2	288
155	60	6	288
160	30	1	349
160	30	6	349
160	90	2	548
160	90	6	548
155	150	2	613
160	120	0	861
160	120	1	861
160	120	2	861
160	120	4	861
160	150	1	1010
160	150	2	1010

Se determinó el rendimiento de la extracción por la diferencia en peso seco de los chips previo al ensayo y posterior a este, utilizando para ello las dos réplicas que fueron lavadas y drenadas exhaustivamente. Se determinó el pH del licor al finalizar la extracción. Para la cuantificación de carbohidratos y productos de degradación se utilizó el procedimiento NREL/TP-510-42623, utilizándose únicamente la columna Aminex 87H para todas las determinaciones ya que por trabajos previos se conocía que la madera de eucalipto no contiene manosa y galactosa en

cantidades detectables y que pudieren interferir con la determinación de xilosa, ya que esta columna no es capaz de resolver los picos de estos tres carbohidratos. Para conocer el contenido de compuestos fenólicos se midió la absorbancia de la solución a 280 nm, de acuerdo con el procedimiento de Alen & Hartus (Alen and Hartus, 1988).

6.2.3. Pulpeo Kraft de los chips extraídos

Los chips extraídos y sin lavar, fueron pulpeados en los reactores de 1.4 L previamente descritos, a una temperatura máxima de 155 °C, durante 2 h (factor H = 530) y con una relación L/W de 3.5. Se utilizó 16 % de álcali activo (expresado como % Na₂O) y cuyo álcali total, activo y efectivo fue determinado por la norma SCAN-N 30:85. Se trabajó con una sulfidez del 30 %. Utilizando chips sin extraer se preparó una “pulpa control” en las mismas condiciones de pulpeo. Se midió álcali residual de acuerdo con la norma SCAN N 33:94. Sobre las pulpas obtenidas se midió número kappa de acuerdo a la norma TAPPI T 236 om-06 y viscosidad (ISO 5351:2004 (E)).

Se seleccionaron las tres mejores condiciones de extracción para, mediante la variación del álcali activo, pulpear hasta un numero kappa definido ($18,5 \pm 1$) y medir las propiedades papeleras de la pulpa marrón producida. A los efectos de determinar las mejores condiciones de extracción se consideraron aquellas condiciones que produjeron un contenido de xilosacáridos en la solución mayor a 2% b.m.s (base madera seca) y menor degradación de las propiedades de la pulpa, determinadas por la viscosidad, pero teniendo en cuenta el número kappa. Sobre las pulpas producidas a número kappa $18,5 \pm 1$ se determinó el rendimiento de pulpeo, consumo de álcali y viscosidad. Para la evaluación de las propiedades papeleras de las pulpas producidas, se trabajó a tres niveles de intensidad de refinación (0, 1500 y 3000 rpm) (norma ISO 5264-02:2012), se realizaron hojas mediante la norma ISO 5269-1 y se midió la resistencia a la tracción y al rasgado de acuerdo a TAPPI T 220-01. Se determinó la drenabilidad de la pulpa mediante la determinación del “Canadian Standard Freeness”, de acuerdo con la norma ISO 5267-02.

La evaluación estadística de los resultados obtenidos se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion XVI. Se realizaron análisis de la varianza y se obtuvieron modelos de regresión. Todos los análisis se realizaron a un nivel de significación del 95%.

6.3. Resultados y discusión

El licor extraído fue de un color marrón y presentó bastante turbiedad, como se puede apreciar en la Figura 6-4. Los chips extraídos presentaron un oscurecimiento respecto a su color inicial, consecuencia de los productos químicos aplicados y la temperatura de trabajo.



Figura 6-4. Licor y chips luego de la extracción con licor verde.

La Figura 6-5 muestra el pH del licor extraído en función de carga de licor verde (% LV). Para la extracción utilizando sólo agua (0% LV), el pH final disminuyó a valores menores a 3,2 dado por la hidrólisis de los grupos acetilos de las cadenas laterales de las hemicelulosas y factiblemente de los ácidos urónicos, también presentes en las hemicelulosas, aunque estos no fueron cuantificados. Al aumentar la carga de licor verde, como era de esperar por el aumento de la concentración de hidróxido de sodio en la solución, el valor de pH del extracto aumentó. Para la misma carga de licor verde el aumento del factor H redujo el pH final, lo que indica una mayor extensión de las reacciones de escisión de las hemicelulosas y liberación de los grupos acetilos y urónicos. Este comportamiento se produce para un factor H inferior a 500, manteniéndose el pH estable a factores H superiores.

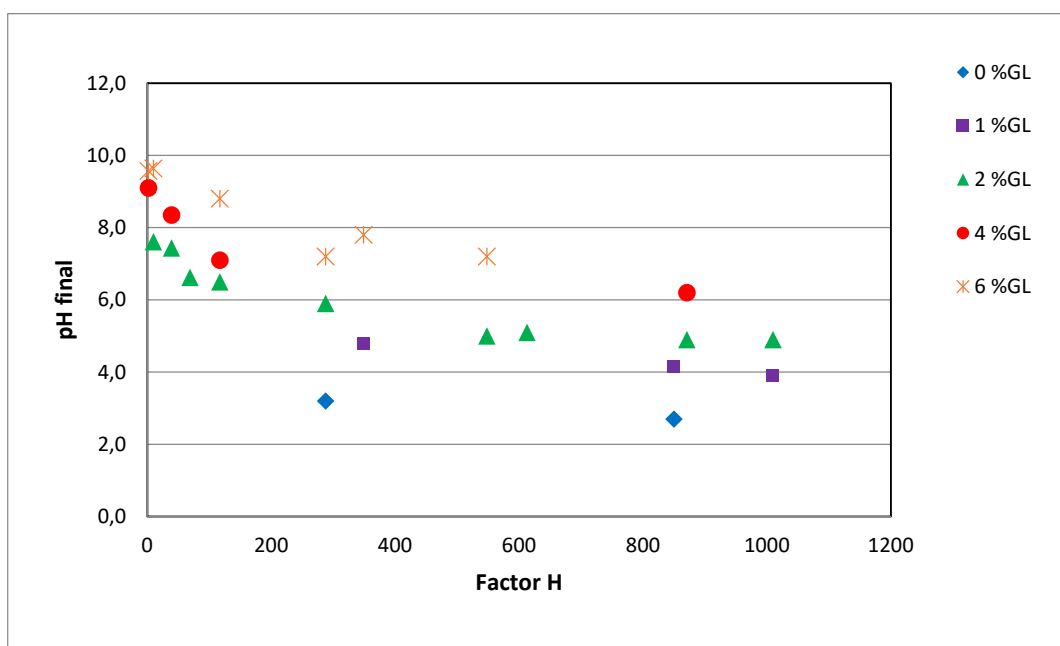


Figura 6-5. pH finales de los licores extraídos en las diferentes condiciones de trabajo.

Realizando la correlación estadística, se obtiene una muy buena correlación del pH con las variables analizadas. Los efectos que tienen incidencia sobre el pH son: %LV, factor H y las interacciones %LV*%LV y factor H*factor H.

La Ecuación 6-2 indica el modelo ajustado, que presentó un $R^2 = 97,1 \%$

$$\text{pH} = 5,10 + 1,36 * \%LV - 6,7 \times 10^{-3} * \text{Factor H} - 0,119 * \%LV^2 + \text{Factor H}^2$$

Ecuación 6-2

La Figura 6-6 muestra el rendimiento de extracción obtenido para las diferentes condiciones ensayadas.

En los ensayos con carga 0 % LV, es decir el tratamiento hidrotérmico se obtuvo el mayor rendimiento de extracción. Esto se debe a que, como se verá en los próximos gráficos en el tratamiento donde sólo se utiliza agua, se logró la mayor extracción de las hemicelulosas de la matriz lignocelulósica (ver Figura 6-7). Al trabajar con licor verde no se observó una correlación del rendimiento con la carga de licor aplicada en la extracción, ya que, a mayor carga, el pH es mayor por lo que la hidrólisis de las hemicelulosas se da en menor extensión, pero a su vez ocurre una extracción parcial de la lignina. Para una misma carga de licor, con el aumento del factor H, aumentó el rendimiento de extracción, dado por una mayor extensión de las reacciones de hidrólisis de las hemicelulosas y de los compuestos fenólicos (extractivos, lignina).

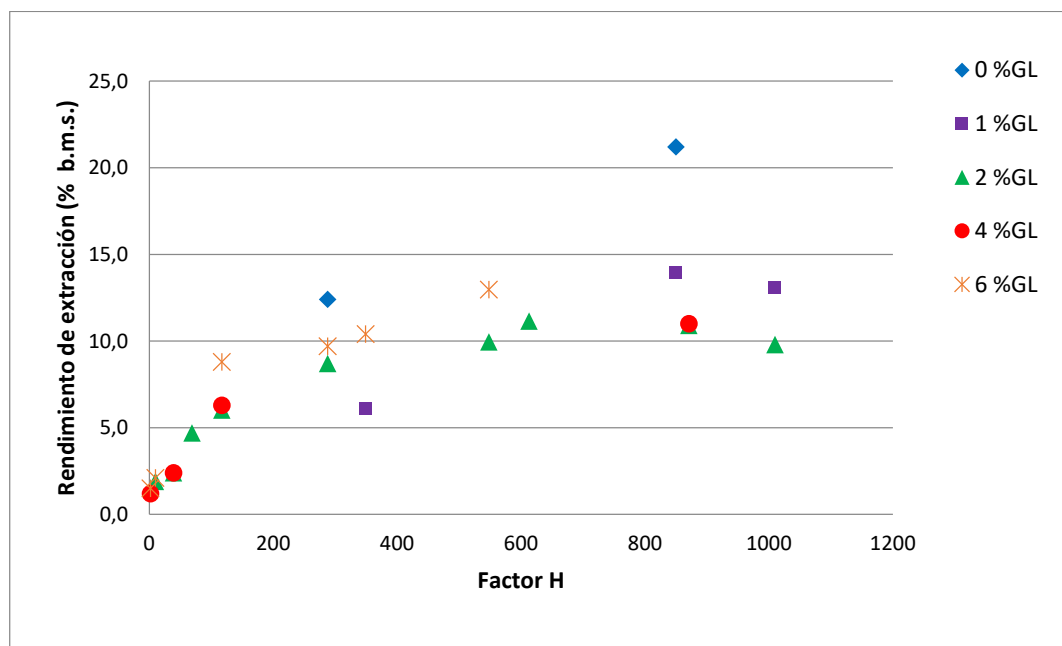


Figura 6-6. Rendimiento de extracción de las diferentes condiciones de tiempo, temperatura y carga de licor verde ensayadas.

La Figura 6-7 muestra el porcentaje de xilosacáridos extraídos en base a la masa de chips seca colocados en los reactores para el ensayo.

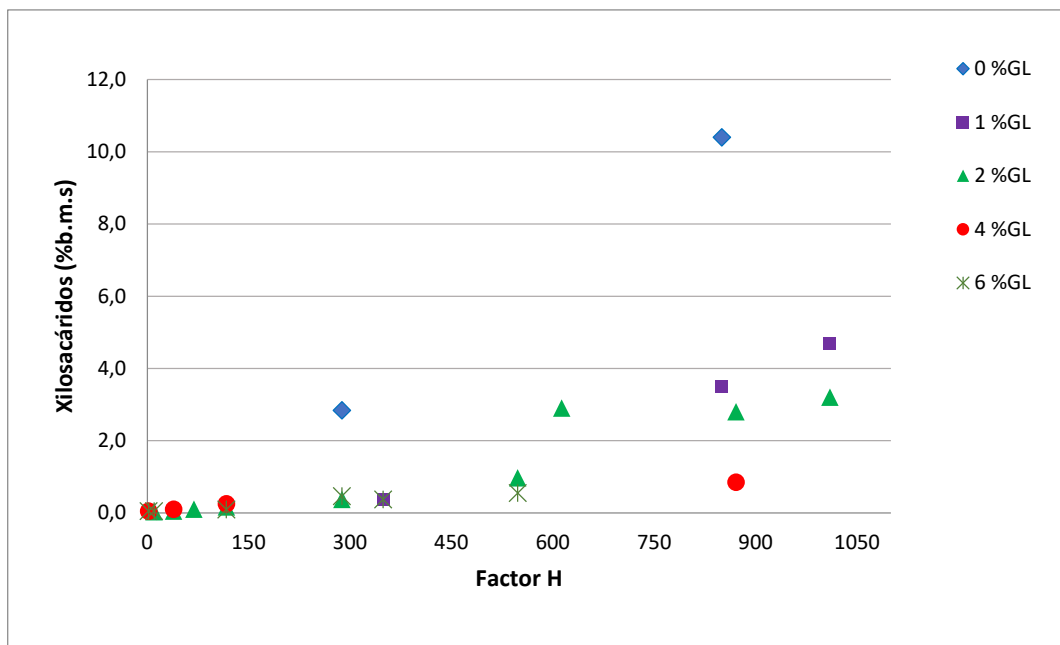


Figura 6-7. Contenido de xilosacáridos en los licores extraídos.

Como era de esperarse, el mayor porcentaje de extracción se obtuvo a factor H alto y utilizando sólo agua como extrayente. Para un mismo nivel de factor H, al bajar la carga de licor verde utilizada (y con ello disminuir el pH final de la extracción), la extracción de xilosacáridos aumentó. A factores H menores a 500, no se logró una remoción significativa a ninguna de las cargas de licor utilizadas (excepto 0 %). A factores H mayores, la extracción comienza a ser interesante, llegando a casi 5 % de xilosacáridos (b.m.s.), lo que equivale a un 32% de los xilosacáridos iniciales.

Del análisis estadístico de los resultados, los efectos % LV, factor H y las interacciones % LV* factor H y % LV *%LV tienen incidencia.

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\% \text{ Xilosacáridos} = 1,64 - 1,35 * \% \text{ LV} + 6 \times 10^{-3} * \text{Factor H} + 0,19 * \% \text{ LV}^2 - 1,2 \times 10^{-3} * \% \text{ LV} * \text{Factor H}$$

Ecuación 6-3

El estadístico R^2 indica que el modelo, así ajustado, explica el 79,7 % de la variabilidad en % xilosacáridos.

Los resultados obtenidos son comparables a otros reportados en la literatura. Por ejemplo, van Heiningen *et al.* (van Heiningen *et al.*, 2010; van Heiningen, Genco, Yoon, Mehmet S Tunc, *et al.*, 2011) trabajaron con una mezcla de chips de maderas de latifoliadas del sur de Estados Unidos (principalmente tupelo, roble rojo y álamo) utilizando una carga de 3% LV entre 140 y 160 °C y reportaron resultados de entre 0,26 y 1,40 % de xilanos en el licor. Por su parte, Luo *et al.* (Luo, Genco and Zou, 2012) utilizaron una mezcla de chips de maderas de latifoliadas del norte de Estados Unidos (no especifican cuales) y ensayaron varias cargas diferentes de licor verde (entre 1 y 6 %) a 160 °C y tiempos para cubrir un rango de factor H entre 410 y 1254. Obtuvieron hasta 6 % xilosacáridos (expresados como xilosa) en b.m.s. en el licor, trabajando a 1 %LV y factor H

1254, pero no se reportó la calidad de la pulpa obtenida con los chips extraídos. Por otra parte, Walton *et al.* (Walton *et al.*, 2010) trabajando con una mezcla de chips de maderas de latifoliadas del sur de Estados Unidos, analizó la recuperación de xilosacáridos y las características de las pulpas producidas extrayendo con licor verde entre 0 y 6 %LV y a tres factores H: 400, 600 y 800. Al igual que en nuestro trabajo, observó que el contenido de xilosacáridos aumentó al bajar la carga de licor, pero no observó una correlación fuerte con el factor H, para una misma carga de licor. El contenido de xilosacáridos máximo reportado para el caso de utilizar licor verde fue de 2 % b.m.s., un poco menor a los obtenidos en nuestro trabajo.

En el trabajo de Johakimu & Andrew (Johakimu and Andrew, 2013) realizan la extracción con licor verde sobre chips de *Eucalyptus grandis* con cargas entre 0 y 3 % a 170 °C y en tiempos entre 15 y 90 minutos. Indicaron una extracción de hemicelulosas entre 3,5 y 6,5 % b.m.s., los valores más altos de la bibliografía analizada. Señalaron que, considerando la calidad de la pulpa posteriormente producida, la mejor condición de trabajo ensayada fue de 3 % LV y 45 minutos a 170 °C, donde obtuvieron un 4 % b.m.s de hemicelulosas en el extracto.

Helmerius *et al.* (Helmerius *et al.*, 2010) quienes realizaron una preextracción con licor blanco sobre chips de abedul, indicaron una extracción de 9,7 % b.m.s de las hemicelulosas trabajando con 0 % de carga (sólo agua) y entre 150-160 °C. Utilizando licor blanco el máximo de extracción de xilosacáridos que reportaron fue de 1,9 % b.m.s cuando realizaron el ensayo a 3% de carga, 160 °C y 60 minutos.

El contenido de grupos acetilos (expresado como ácido acético) se muestra en la Figura 6-8. La extracción de los grupos acetilos se dio en gran extensión. Ya con factor H de 288, se logró remover más del 70 % de los grupos acetilos presentes, y en factores H más elevados y baja carga de licor verde (incluido el 0%) se removieron de la matriz lignocelulósica en su totalidad. Como se mencionó en el capítulo de “Estructura de la biomasa lignocelulósica” las hemicelulosas de las maderas de latifoliadas tienen mayoritariamente sustituidos los grupos OH de las unidades de xilosa por un grupo O-acetilo. De esta forma, el ácido acético es un subproductos importante en los procesos de extracción de hemicelulosas de maderas de latifoliadas y se han reportado varios trabajos donde se analizan diferentes condiciones para su recuperación, normalmente mediante una extracción líquido-líquido (Um *et al.*, 2011; Park, Moon and Um, 2013; Kim *et al.*, 2015).

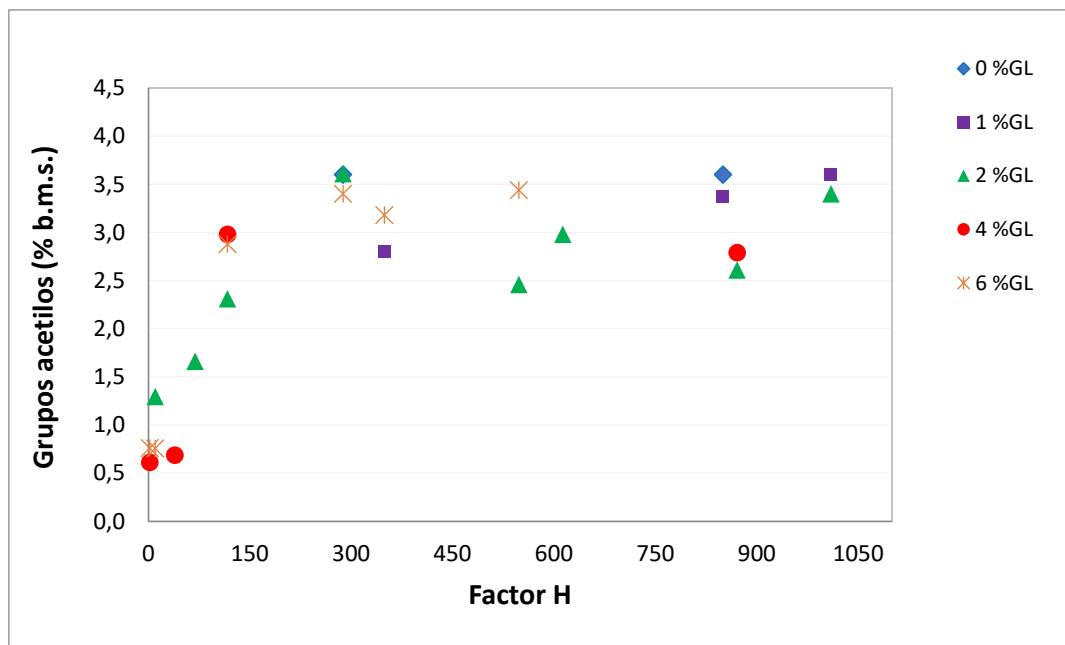


Figura 6-8. Contenido de grupos acetilos (expresados como % ácido acético) en los licores extraídos.

Para un mismo %LV, con el aumento del factor H aumentó el porcentaje de extracción hasta llegar a un factor H de 300, donde se logró remover más del 70 % de los grupos acetilos. A factores H superiores la tendencia no es clara.

Walton *et al.* (Walton *et al.*, 2010) en el trabajo previamente mencionado con chips de maderas del sur de Estados Unidos, reportaron el mismo comportamiento para la concentración de ácido acético en los licores extraídos. Luo *et al.* (Luo, Genco and Zou, 2012) trabajando a un factor H fijo de 800 con chips de maderas de latifoliadas del norte de Estados Unidos (ya mencionado), indicaron un incremento de la concentración de ácido acético a medida que aumentó la carga de licor verde. En el trabajo de van Heiningen *et al.* citado (van Heiningen, Genco, Yoon, Mehmet S. Tunc, *et al.*, 2011) se indicó una extracción entre 50 y 75 % de los grupos acetilos presentes, trabajando con 3 % LV y un factor H entre 106 y 792.

Analizaremos ahora la extracción de compuestos fenólicos medidos como la absorbancia del licor a 280 nm (Figura 6-9). Si bien las correlaciones estadísticas no dan un buen ajuste y por ello no se muestran, se puede observar (como es esperable) que al aumentar la carga de licor verde para un mismo factor H, aumentó el contenido de compuestos fenólicos en el licor. Esto se debe a que además de la liberación de los compuestos fenólicos provenientes de los extractivos y que son fácilmente removibles, al aumentar la carga de hidróxido y sulfuro de sodio comienzan a desarrollarse las reacciones de deslignificación, fundamentalmente a temperaturas altas (Sjöström, 1993). Del mismo modo, para una misma carga de licor, al aumentar el factor H aumentó la remoción de compuestos fenólicos, posiblemente por la incidencia de la temperatura más que del factor tiempo. Walton (Walton *et al.*, 2010) reportaron valores similares en el trabajo mencionado anteriormente. Asimismo, van Heiningen *et al.* (van Heiningen, Genco, Yoon, Mehmet S. Tunc, *et al.*, 2011), en el trabajo con chips de maderas de latifoliadas del sur de Estados Unidos, indicaron una extracción entre 5,2 y 9,2 % de la lignina

presente en los chips, aumentando estos a medida que aumenta la carga de licor para un factor H fijo.

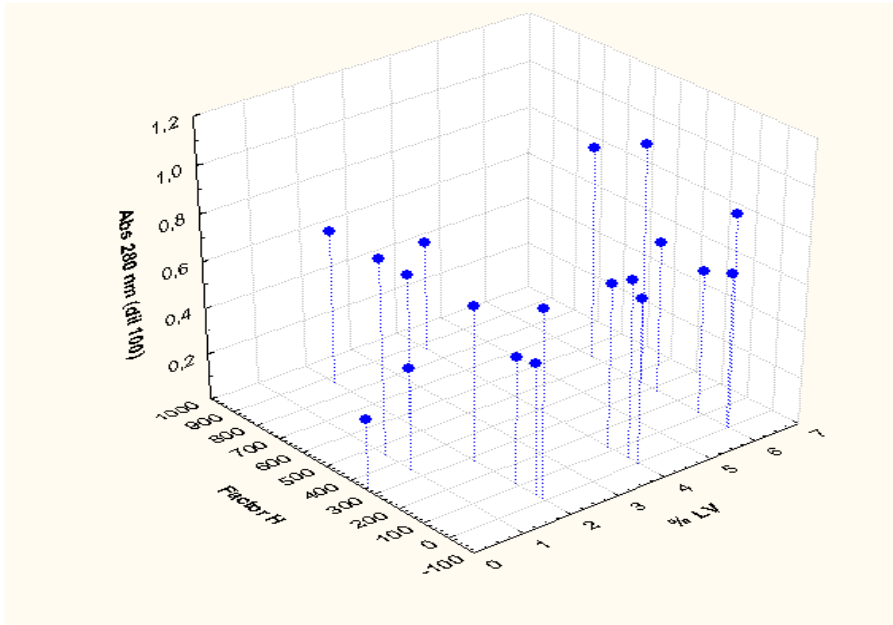


Figura 6-9. Absorbancia a 280 nm de los licores extraídos. Se indican los valores obtenidos para una dilución 1/100.

La Tabla 6-3 muestra los valores de numero kappa y viscosidad de las pulpas obtenidas con los chips luego de extraídos. La que se indica como pulpa control, es una muestra obtenida a partir de pulpear los chips sin previa extracción con licor verde.

Tabla 6-3. Condiciones de pulpeo: 16 % álcali activo (como % Na₂O), sulfidez 30 %, temperatura 155 °C durante 2 h (Factor H pulpeo= 530), y relación licor madera: L/W de 3.5:1.

Condiciones de pre-extracción				Características licor extraído	Características pulpa obtenida	
Temperatura (°C)	tiempo (minutos)	% LV	Factor H	Xilosacáridos en el licor (% b.m.s.)	Número kappa	Viscosidad (mL/g)
100	120	4	2	0,05	14,4	1121
100	120	6	2	0,05	13,3	1044
120	60	2	10	0,03	16,6	1180
120	60	6	10	0,05	15,4	1160
140	30	2	39	0,1	16,0	1121
140	30	4	39	0,1	14,9	1084
140	60	2	69	0,1	15,2	1062
140	60	7	69	0,2	12,0	900
140	90	2	117	0,2	15,8	1163
140	90	4	117	0,3	15,4	1035
140	90	6	117	0,1	11,9	899
155	60	0	288	2,8	--	--
155	60	2	288	0,4	--	--
155	60	6	288	0,5	--	--
160	30	1	349	0,4	12,7	1066
160	30	6	349	0,4	14,2	999
160	90	2	548	1,0	14,8	1169
160	90	6	548	0,6	14,2	1019
155	150	2	613	2,9	13,3	1080
160	120	0	861	10,4	7,8	538

160	120	1	861	3,5	9,7	964
160	120	2	861	1,7	12,4	1100
160	120	4	861	0,9	12,2	931
160	150	1	1010	4,7	11,5	1080
160	150	2	1010	3,2	14,0	1094
Control	--	--	--	--	20,6	1250

La Tabla 6-3 muestra que hay un efecto negativo en la calidad de la pulpa debido a la extracción de hemicelulosas. Las condiciones de pulpeo en estos casos fueron de 16% de álcali activo, temperatura máxima de 155 °C y factor H = 530. Las pulpas obtenidas después de la etapa de preextracción presentaron menores números kappa (deslignificación más alta) y viscosidad que la pulpa de control. En un pulpeo Kraft normal, se consume un poco de licor blanco en las reacciones de degradación de las hemicelulosas y para la escisión del enlace covalente lignina-carbohidratos, que en este caso comienza en la preextracción (van Heiningen, Genco, Yoon, Mehmet S. Tunc, *et al.*, 2011).

Como se esperaba, bajo condiciones de autohidrólisis (0% de carga de GL), la viscosidad de la pulpa disminuye abruptamente. Martin-Sampedro (Martín-Sampedro, 2011) obtuvo resultados similares trabajando con chips de *Eucalyptus globulus* a los que se le realizó un tratamiento con explosión de vapor previo. La disminución en la viscosidad se debe posiblemente a que la preextracción de los chips facilita el pulpeo, ya que la estructura lignocelulósica está más abierta y por ello las reacciones de degradación (reacciones de “peeling”) de las cadenas de celulosa se dan en mayor extensión. En el trabajo de van Heiningen se utilizó antraquinona durante el pulpeo (van Heiningen *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de los beneficios de protección generada por la antraquinona sobre las cadenas de celulosa, no ha logrado imponerse industrialmente dado su costo y efectos ambientales y por ello no fue utilizada en este trabajo.

Visto desde otro punto de vista se puede mencionar que los pulpeos kraft realizados a los chips con extracción previa con licor verde precisaron de menos álcali efectivo para alcanzar el mismo número de kappa que la pulpa control. Estos resultados también fueron observados en los trabajos previamente mencionados (van Heiningen *et al.*, 2010; Walton *et al.*, 2010; van Heiningen, Genco, Yoon, Mehmet S Tunc, *et al.*, 2011). A los efectos de comparar los resultados obtenidos en las pulpas producidas con diferentes condiciones de preextracción, es necesario trabajar con pulpas que tengan un número kappa similar. Por ello se seleccionaron 3 condiciones en las que a priori se obtuvieron los mejores resultados en términos de contenido de xilosacáridos en el licor, pero considerando la calidad de la pulpa producida (viscosidad y número kappa). Estas condiciones son las que están marcadas en negrita en la Tabla 6-3. Sobre los chips extraídos en estas 3 condiciones se realizaron diferentes pulpeos a 155 °C y 120 minutos, variando la carga de álcali activo de forma de obtener una pulpa con un número kappa de $18,5 \pm 1$. Se produjo también una pulpa control con un número kappa de $18,5 \pm 1$, pero utilizando chips sin extracción previa. De esta forma se obtuvieron cuatro pulpas con las características señaladas en la Tabla 6.4

Tabla 6-4. Características de las pulpas obtenidas con número kappa 18.5 ± 1.

Condiciones de extracción	Xilosacáridos en licor extraído (% b.m.s)	Álcali activo (%Na ₂ O)	Rendimiento de pulpeo (% b.m.s)	Número kappa	Viscosidad de la pulpa (mL/g)
155 °C, 150 min, 2% LV	2,9 ± 0,6	11,9 ± 0,2	47,0 ± 0,6	18,1 ± 0,3	1427 ± 28
160 °C, 120 min, 1 %LV	3,5 ± 0,4	12,0 ± 0,2	43,2 ± 0,7	19,5 ± 0,3	1306 ± 11
160 °C, 150 min, 2 %	3,2 ± 0,5	11,2 ± 0,2	48,3 ± 0,5	18,2 ± 0,4	1363 ± 12
Pulpa control	---	16,5 ± 0,2	52,3 ± 0,7	18,1 ± 0,3	1218 ± 11

Como se muestra en la Tabla 6-4, en los ensayos con preextracción se logró una reducción de más del 4% en el álcali activo utilizado en el pulpeo. Por otro lado, el factor H total (preextracción y pulpeo) es mayor y debe considerarse en el balance general del proceso. Los datos también muestran que la viscosidad de las pulpas con extracciones previas es superior a la viscosidad de la pulpa de control, debido al menor contenido de hemicelulosas en la pulpa extraída, que influye en el peso molecular promedio de la pulpa. Esto significa que el procedimiento previo a la extracción fue muy selectivo y no degradó las fibras de celulosa. Sin embargo, en las pulpas obtenidas sobre chips pre-extraídos con un 2% de LV, se observó una disminución del rendimiento de pulpeo entre 4-5 % respecto al obtenido en la pulpa control, lo que implica una disminución en la producción de pulpa, por lo que las ganancias a obtener a partir de los productos producidos con los licores extraídos deberían contrarrestar esta disminución del producto principal. Para el caso de la pulpa producida luego de una extracción con 1 %LV, la disminución del rendimiento de pulpeo es del 9% lo que es muy perjudicial para la economía del proceso y si bien debe analizar en su conjunto con los productos a producir con el licor extraído, es poco factible que pueda ser una opción rentable. Esta disminución en el rendimiento de pulpeo fue previamente reportado por van Heiningen *et al.* (van Heiningen *et al.*, 2010; van Heiningen, Genco, Yoon, Mehmet S Tunc, *et al.*, 2011). En el trabajo de Helmerius *et al.* (Helmerius *et al.*, 2010) utilizando una preextracción con licor blanco, se indicaron también disminuciones del rendimiento de pulpeo entre 1,2 y 5 % respecto a la pulpa control. Por otro lado, Walton *et al.* (Walton *et al.*, 2010), utilizando antraquinona como auxiliar en el pulpeo, reportaron el mismo rendimiento (47 %) para la pulpa producida con chips sin extraer y con una extracción previa con 2 % de LV y factor H 400 sobre una mezcla de chips de maderas del sur de Estados Unidos. Del mismo modo, Johakimu & Andrew (Johakimu and Andrew, 2013), indicaron que obtuvieron el mismo rendimiento de pulpeo (50 %) al trabajar con chips de *Eucalyptus grandis* sin preextracción y con preextracción con licor verde a 170 °C (los autores no indicaron las condiciones de extracción con las que obtuvieron igual rendimiento de pulpeo).

Analizando las propiedades papeleras de las pulpas producidas y comparándolas con la pulpa tomada como control se observó una disminución de la resistencia a la tracción. Disminuir el contenido de hemicelulosas en las fibras hace, como fue previamente mencionado, que disminuyan las posibilidades de enlace entre e intra-fibras, lo que determina una disminución de la resistencia a este esfuerzo. La resistencia al rasgado presenta un leve aumento ya que esta depende del largo de la cadena y del peso molecular (Brännvall, 2009). Al eliminar parcialmente las hemicelulosas, como se observó, la viscosidad de la pulpa aumentó, medida indirecta del peso molecular, lo que justifica este leve incremento en el índice de rasgado obtenido. Van Heiningen (Van Heiningen *et al.*, 2010) reportó resultados similares.

Respecto a la producción de bioetanol con la fracción de hemicelulosas removida con el licor verde se realizaron las pruebas de fermentación en un agitador orbital, en condiciones de: concentración inicial de levadura (*Scheffersomyces stipitis*) de aproximadamente 1×10^8

células/ml, a 30 °C y 100 rpm durante 220 a 300 horas (demás condiciones en (Guigou *et al.*, 2016). La fermentación produjo en el mejor de los casos una concentración de etanol de $5,0 \pm 0,2$ g/L lo que corresponde a una producción de 4,4 L de etanol por tonelada de chips secos, lo cual es una producción extremadamente baja.

6.4. Conclusiones

El pretratamiento con licor verde permitió la remoción de xilosacáridos de los chips de *Eucalyptus grandis* previo a ser pulpeados para la obtención de pulpa de celulosa. En las condiciones ensayadas se logró remover hasta 10,4 % b.m.s de los xilosacáridos extrayendo solamente con agua y 4,7 % b.m.s cuando se trabajó con licor verde con 1 % de carga y un factor H de 1010. Es interesante la extracción de ácido acético en todas las condiciones con un factor H mayor a 500, donde se removi6 al menos un 70 % del contenido inicial de los grupos acetilos. La separación de ácido acético de la solución es un procedimiento establecido industrialmente y fácilmente aplicable, permitió además detoxificar el hidrolizado para su posterior fermentación.

Considerando las características de las pulpas formadas con los chips preextraídos, se seleccionaron 3 condiciones donde el contenido de xilosacáridos en el licor se encontró en el rango de 2,9 a 3,5 % b.m.s., lo que representó entre un 22 y 26 % del contenido de xilanos de la madera utilizada.

El consumo de licor blanco para la producción de pulpas con los chips preextraídos fue un 4 % menor que el necesario para producir pulpa con el mismo número kappa en chips sin extraer. Sin embargo, se debe considerar el consumo de licor verde para la preextracción y el consumo de vapor y energía debido al mayor factor H total utilizado. Por otro lado, el rendimiento de la pulpa producida con los chips preextraídos fue al menos un 4 % menor que el rendimiento con los chips sin extraer. Considerando un precio promedio de la celulosa de fibra corta de USD 700 por tonelada, implica una pérdida de aproximadamente 50 USD por tonelada de pulpa producida con la madera preextraída. La producción de bioetanol obtenida y el precio de venta del bioetanol no son suficientes para revertir estos costos, aunque se incluya el ácido acético como subproducto. De esta forma, en las condiciones actuales, no se considera oportuno la preextracción de los chips de madera de eucalipto previo al pulpeo para la obtención de pulpa de celulosa de mercado. Más aún si se considera el detrimento que se observa en las propiedades papeleras de resistencia a tracción y el aumento de resistencia al refinado.

Por lo expuesto previamente, se descarta la configuración de una biorrefinería integrada a una planta de pulpa de celulosa, donde las operaciones de las biorrefinerías compitan con el producto principal, dado que, al estado del arte actual, no se considera una solución tecnológica ni económicamente viable.

7. PRETRATAMIENTOS: TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO.

En este capítulo, se analizarán las extracciones con agua caliente a presión (autohidrólisis) de residuos forestales industriales de *Eucalyptus Grandis*, provenientes de una planta de transformación mecánica de la madera.

7.1. Objetivos específicos

- Estudiar los productos formados en la extracción con agua (mediante diferentes relaciones tiempo/temperatura) de hemicelulosas de eucalipto.
- Estudiar la formación de mono y oligosacáridos de xilosas, ácidos alifáticos y productos de degradación de los azúcares.
- Evaluar la distribución de pesos moleculares de los oligosacáridos formados en función de las condiciones de extracción utilizada.
- Evaluar la/s expresiones cinéticas de la solubilización y degradación de los xilosacáridos en el tratamiento hidrotérmico.

7.2. Metodología

7.2.1. Preparación y caracterización del aserrín.

Para estos ensayos se trabajó con residuos de aserrín de *Eucalyptus grandis* provenientes de una planta de generación de energía a través de biomasa. El aserrín ensayado es un residuo de una industria de procesamiento mecánico de madera. Se realizó un acopio al comienzo del proyecto de forma de tener un stock suficiente para la realización de todos los ensayos y su correspondiente margen de seguridad. Se seco el aserrín en estufa a 38 °C. Se tamizó el material y se utilizó la fracción comprendida entre 500 μm y 3360 μm (Mallas US35 y US6). La Figura 7-1 muestra una imagen del aserrín de partida, previo a ser tamizado.



Figura 7-1. Aserrín seco, sin tamizar.

El aserrín se caracterizó fisicoquímicamente determinándose para ello el porcentaje de extractivos de acuerdo con la norma TAPPI T-204.om07, utilizando etanol como solvente,

cenizas (T 211 om-02), carbohidratos y lignina según NREL/TP-510-42618 (2012), midiéndose la lignina soluble en ácido a 205nm de acuerdo con TAPPI-UM250. La Tabla 7-1 muestra las características del aserrín de partida.

Tabla 7-1. Composición química del aserrín utilizado (n=5).

Componente	% $\pm \sigma$
Extractivos	3,4 $\pm$ 0,2
Cenizas	0,89 $\pm$ 0,01
Lignina soluble	2,5 $\pm$ 0,1
Lignina insoluble	25,1 $\pm$ 0,2
Lignina total	27,6 $\pm$ 0,3
Xilanos	14,9 $\pm$ 0,2
Glucanos	43,1 $\pm$ 0,2
Grupos acetilo (como HAc)	3,6 $\pm$ 0,2

7.2.2. Ensayos hidrotérmicos

Los ensayos de extracción se realizaron en un reactor que consiste en un baño de aceite de silicona y que cuenta con un eje rotatorio que permite la inserción de 8 cápsulas idénticas de 300 ml de capacidad total, capaz de trabajar hasta una presión de 20MPa (Figura 7-2). Se ensayaron 4 tiempos por corrida, para tener duplicados de cada condición ensayada. Cada corrida se realizó a temperatura y presión constantes, con una relación sólido líquido fija, previamente seleccionada.



Figura 7-2. Baño de aceite de silicona con reactores de 300mL.

7.2.2.1. Análisis realizados

En el sólido remanente de la extracción se determinó el rendimiento de la extracción, de acuerdo con la Ecuación 7-1., siendo *m sólido inic.* y *m sólido post extracción* la masa del sólido antes y después de la extracción respectivamente

$$\% \text{ Rendimiento extracción} = \frac{(m \text{ sólido inic.} - m \text{ sólido post extracción})}{masa \text{ solido inic.}} * 100 \quad \text{Ecuación 7-1}$$

En el líquido extraído, también denominado licor de extracción o extracto, se determinó pH por medición con peachímetro, sólidos totales (secando una masa conocida a 105°C hasta peso constante. Para la determinación de carbohidratos presentes como monómeros en el extracto (glucosa, xilosa y arabinosa), carbohidratos presentes como oligo o polisacáridos, así como productos de degradación (furfural, hidroximetilfurfural) y ácidos acético y fórmico se utilizó el procedimiento NREL/TP-510-42623 corregido, ya que sólo se utilizó la columna Aminex 87 H en la determinación. La expresión “b.m.s” refiere a que los resultados se expresan en porcentaje de la masa de madera de partida en base seca en estufa a 105°C.

Para cuantificar otras especies disueltas en el licor, que habrá que considerar en la instancia de purificación de los xilosacáridos, por ejemplo, los compuestos polifenólicos presentes en el extracto, provenientes de los extractivos de la madera y de derivados de la lignina, se midió la Absorbancia espectrofotométrica del licor a 280 nm. Para realizar las gráficas se estandarizó la dilución de la muestra a 1/100. Cuando hay furfural y HMF, hay que considerar que estos también aportan a la absorbancia a 280nm.

Para el estudio de la distribución de pesos moleculares de los licores obtenidos se realizó la técnica de HPLC-SEC con detector RID, utilizando en primera instancia una columna Bio-Rad Aminex HPX-42A, agua como fase móvil y trabajando a 60 °C de temperatura y un flujo de 0,6 mL/min. Se utilizó en serie el detector UV a 280nm a los efectos de determinar la presencia de compuestos fenólicos en las muestras. Se realizó una curva de calibración utilizando como estándares: xilosa (Sigma Aldrich) y xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa y xilopentosa (Megazymes, Irlanda) disueltos en agua, en una concentración de 1 g/L. Esta columna permite cubrir hasta un peso molecular máximo de aproximadamente 1500 Da.

Para asegurar que la determinación de los pesos moleculares correspondía exclusivamente a los carbohidratos presentes, se trató el licor de forma de eliminar los fragmentos de lignina existentes. Para ello, primero se centrifugó el licor a 4500 rpm por 25 minutos, de forma de eliminar los elementos suspendidos en el mismo, luego se filtró por filtros de HDPV de 0,45µm y posteriormente se filtró por cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) C-18 (Waters Sep-Pak C-18, base sílica con alta hidrofobicidad, código WAT051910). Finalmente se filtró hacia los viales por filtros de HDPV de 0,22 µm.

A los efectos de confirmar rápidamente la presencia de carbohidratos, y la ausencia de compuestos fenólicos, se realizaron cromatografías en capa fina de las muestras previo a inyectarlas en el HPLC. Para ello se utilizan placas de TLC de sílica gel en soporte de aluminio con indicador de fluorescencia. La fase móvil utilizada es metanol, cloroformo, acetona e hidróxido de amonio (42:16:25:16 partes, respectivamente) y se revelan con 0,2% orcinol en etanol

absoluto: ácido sulfúrico (para ver la presencia de carbohidratos) o cloruro férrico 5%, para determinar ausencia de compuestos fenólicos. Los estándares de carbohidratos utilizados son xilosa, glucosa, celobiosa, rafinosa y maltodextrina en concentración de 1g/L. Para la lignina se utilizó una solución alcalina de 0,5g/L preparada por la solubilización en NaOH 0,5M de lignina Kraft precipitada.

7.2.3. Análisis estadístico

La evaluación estadística de los resultados obtenidos se realizó utilizando en software Statgraphics Centurion XVI.

Se realizaron análisis de la varianza y se obtuvieron modelos de regresión.

Se utilizaron diseños factoriales y de superficie de respuesta y se optimizaron mediante la función “deseabilidad”. Ésta permite determinar las configuraciones de los factores experimentales para alcanzar características deseadas para más de una respuesta simultáneamente.

Todos los análisis se realizaron a un nivel de significación del 95%.

7.3. Resultados y discusión

7.3.1. Ensayos preliminares

Se realizó una serie ensayos preliminares a los efectos de determinar la mínima relación Líquido/aserrín (L/W) a utilizar y analizar si era necesario realizar una impregnación previa del material.

Para elegir la relación líquido sólido (L/W) se realizaron 4 ensayos (por duplicado) a $T=160\text{ }^{\circ}\text{C}$ con distintos L/W durante 60 minutos. La mejor L/W se utilizó luego en los ensayos realizados para la optimización de la temperatura y tiempo de extracción. Las relaciones L/W utilizadas fueron: 6, 7, 8, 9. La relación L/W= 6 fue descartada luego del tratamiento hidrotérmico ya que se observó que existen zonas del material que no fueron mojadas por el líquido. Para las otras condiciones los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 7-2.

Luego de la extracción, el sólido se separó del extracto mediante una tela filtrante, se enjuagó con agua desionizada y se centrifugó a 1000 rpm, y por último se secó en estufa a $T=105^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante. De esta forma se determinó el rendimiento de la extracción, por diferencia de peso (Ecuación 7-1).

Tabla 7-2. Ensayos con diferente relación L/W (resultados expresados en base madera seca (%b.m.s.))

Relación L/W	Rend. extracción	Xilosacáridos totales extraídos
7	17,4 ± 0,4	7,1 ± 0,2
8	17,1 ± 0,4	7,4 ± 0,2
9	18,1 ± 0,5	6,9 ± 0,3

El análisis estadístico de comparación de muestras de los datos de la Tabla 7-2 ($P = 0,968 > \alpha 0,05$) indicó que no había diferencias significativas en los resultados obtenidos, por lo que se resolvió trabajar con la relación menor de licor:madera de forma de obtener la mayor concentración en g/L de los xilosacáridos extraídos.

Para determinar si la impregnación del aserrín con agua desionizada favorece la extracción de hemicelulosas, se realizó un ensayo a $T=140\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $t= 90\text{ min}$ con dos muestras impregnadas durante 30 minutos a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ y dos muestras no impregnadas. Al no observarse variación significativa en los resultados se continuó trabajando sin impregnar.

7.3.2. Ensayos definitivos.

A los efectos de estudiar la extracción de xilanos y derivados, así como la formación de otros compuestos se realizaron los ensayos presentados en la Tabla 7-3, manteniendo la relación $L/W=7$.

Tabla 7-3. Condiciones de temperatura máxima y tiempo a temperatura máxima ensayados.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)
80	60, 90, 150
100	120, 240, 360, 480
120	60, 90, 120, 150
140	60, 90, 120, 150
160	60, 90, 120, 150
165	60, 90, 120, 150
170	30, 60, 90, 120

El rendimiento de la extracción en función del Factor P y la parametrización de los datos puede verse en la Figura 7-3.

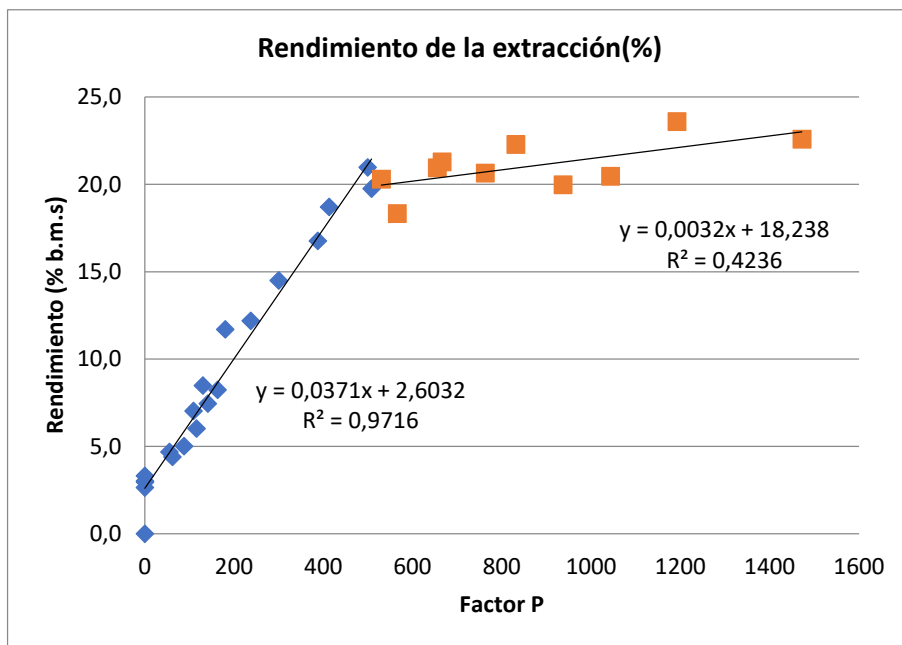


Figura 7-3. Datos obtenidos y parametrización del rendimiento de extracción del tratamiento de tratamiento hidrotérmico, en función del factor P.

El rendimiento de la extracción creció rápidamente con el aumento de factor-P hasta valores de factor P de aproximadamente 500. Al aumentar el factor P por encima de 500, si bien el rendimiento siguió aumentando, lo hizo muy lentamente.

Los rendimientos de extracción reportados, son similares a los obtenidos por Rangel *et al.* (Rangel *et al.*, 2016) quienes trabajaron con aserrín de eucalipto en rangos similares a los de este estudio. Tunc y van Geiningen (Tunc and van Heiningen, 2008) trabajando con chips de maderas del sur de estados Unidos (tupelo, liquidámbar y roble entre otros) reportaron rendimientos similares o un poco menores al obtenido en este trabajo. En nuestro caso, al tratarse de madera con una granulometría mucho menor que los chips, es posible que los procesos de transferencia de calor y masa presenten menores resistencias y por ello se logre una mayor solubilización de los componentes de la madera. Sin embargo, Gutsch *et al.* (Gütsch, Nousiainen and Sixta, 2012), trabajando con chips de *Eucalyptus globulus* reportaron rendimientos de orden similar y a factores P un poco mayores a los obtenidos en este trabajo, alcanzando 35 % de extracción de sólidos a P = 1500 o mayores. El origen de estas diferencias puede radicar en el procedimiento de separación y lavado de las fracciones sólidas y líquidas obtenidas.

La Figura 7-4 muestra como varía la concentración de xilosacáridos en el licor al aumentar el factor P.

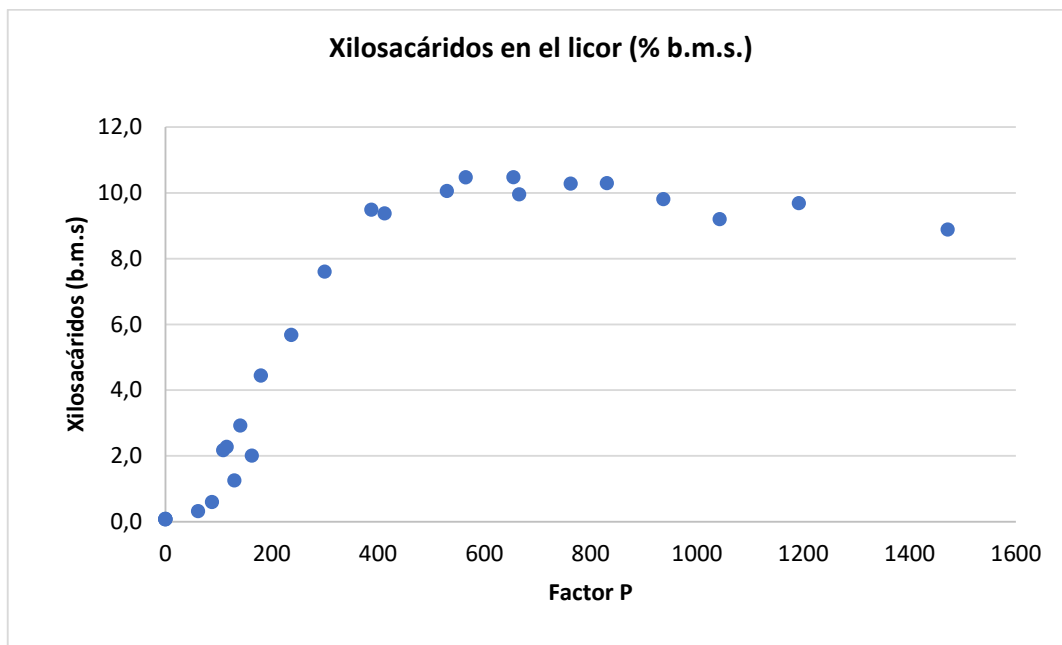


Figura 7-4. Variación del contenido xilosacáridos en función del factor P aplicado.

La expresión xilosacáridos en el licor, refiere al contenido de compuestos conteniendo xilosa (monómero, oligo o polímeros). Se observa una leve disminución del contenido de éstos a altos factores P debido a la formación de furfural a partir de xilosa. A los factores P analizados, se puede establecer una relación lineal entre el rendimiento de la extracción y el contenido de xilosacáridos en el extracto, de acuerdo con la Ecuación 7-2 y como se muestra en la Figura 7-5.

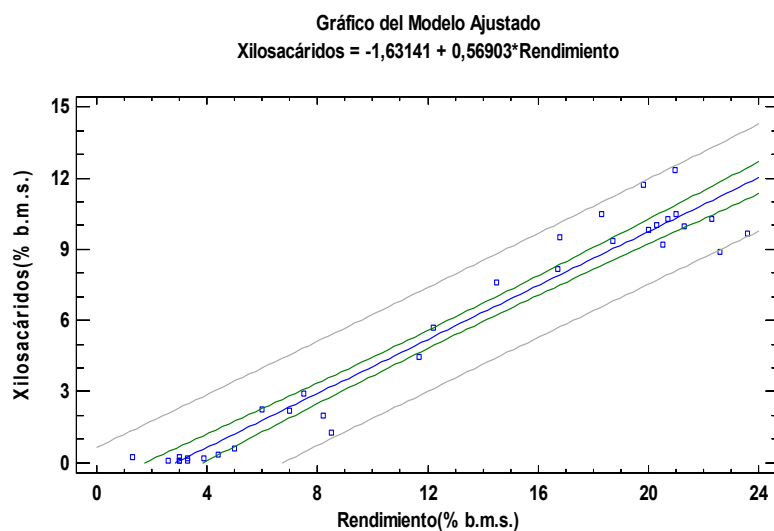


Figura 7-5. Ajuste lineal del modelo del contenido de xilosacáridos en el licor en función del rendimiento másico de la extracción.

$$\text{Xilosacáridos} = -1,63 + 0,57 \cdot \text{Rendimiento}$$

Ecuación 7-2

El estadístico R^2 indica que el modelo ajustado explica el 95 % de la variabilidad en xilosacáridos con un nivel de confianza del 95,0.

Analizando la remoción de xilanos en función de la temperatura y el tiempo (Figura 7-6) vemos que se logró un máximo de 11,7 % b.m.s de extracción, aproximadamente 80 % de los xilanos iniciales presentes. Se observa asimismo que con condiciones de temperaturas de 140 °C o superiores se logran extracciones aceptables, descartándose entonces para futuros trabajos el uso de temperaturas menores. Particularmente, los valores del contenido de carbohidratos para una temperatura de 120 °C no son confiables. Dado que el rendimiento de la extracción obtenido para esta temperatura ha sido muy bajo, se prevé que el contenido de compuestos de xilosa en el extracto también lo sea por lo que no se repitieron los pretratamientos a esta temperatura, descartándose la misma para los siguientes análisis.

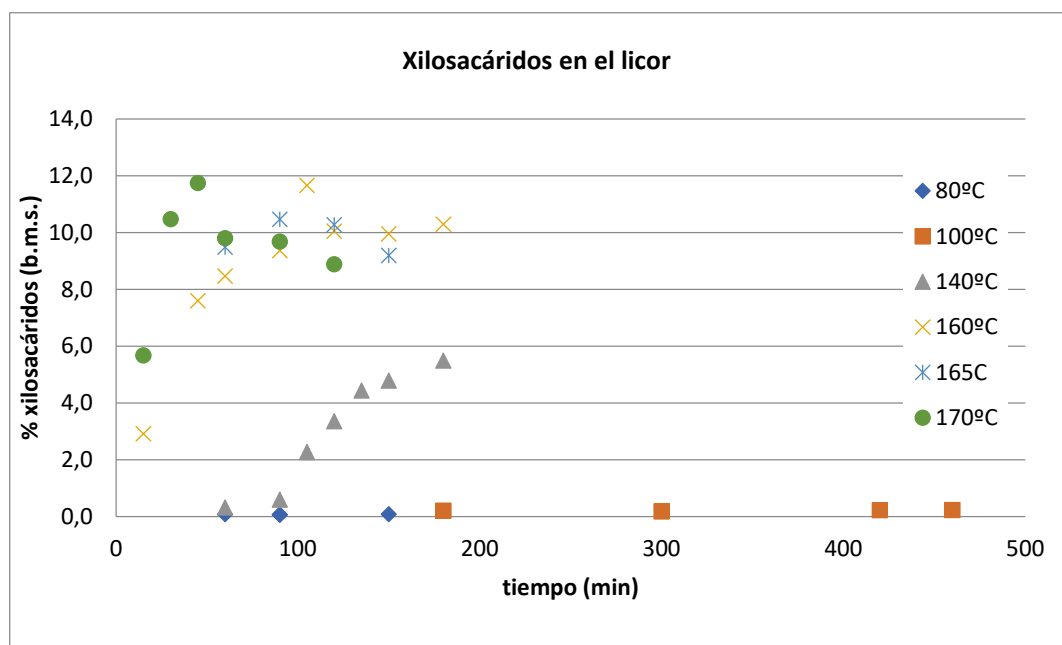


Figura 7-6. Contenido de xilosacáridos en el extracto para diferentes combinaciones de tiempo-temperatura de reacción.

La disminución en el valor de xilosacáridos que se observó a temperatura de 170 °C y tiempos mayores a 45 minutos se deben a la formación de furfural y descomposición de éste en otros productos que no son determinados con el procedimiento de análisis utilizado.

Respecto al contenido de xilosacáridos extraídos en los 3 trabajos previamente mencionados (Tunc and van Heiningen, 2008; Gütsch, Nousiainen and Sixta, 2012; Rangel *et al.*, 2016), se obtienen rendimientos de extracción similares a los obtenidos a los de este estudio. Por su parte, (Inalbon, Solier and Zanuttini, 2017) trabajando con chips de *Eucalyptus Grandis* provenientes de Uruguay, indicaron extracciones similares de los xilosacáridos en condiciones similares de extracción (trabajaron entre 140 y 160 °C durante 20 a 60 minutos). Para el caso del trabajo de

Tunc y Van Heiningen (Tunc and van Heiningen, 2008), la cantidad de xilosacáridos (en b.m.s) en el licor es mayor, ya que trabajan con maderas con mayor contenido de xilanos. Sin embargo, comparando el porcentaje de extracción tomando como base las hemicelulosas presentes, a condiciones similares, los rendimientos son similares. Garrote *et al.* (Garrote and Parajo, 2002; Garrote *et al.*, 2007) lograron solubilizar un porcentaje mayor de los xilanos presentes trabajando a temperaturas superiores a 190 °C, pero como se verá más adelante, los mismos se encuentran en solución como xilosa o se han descompuesto a furfural, siendo muy pequeña la proporción que se encuentra como oligómeros.

Las Figuras 7-7, 7-8, 7-9 y 7-10 muestran la distribución de los derivados de xilanos, expresados como xilosacáridos (determinados luego de la hidrólisis ácida), xilosa, xilooligosacáridos (por diferencia entre los dos primeros) y furfural en función del tiempo para 140, 160, 165 y 170 °C.

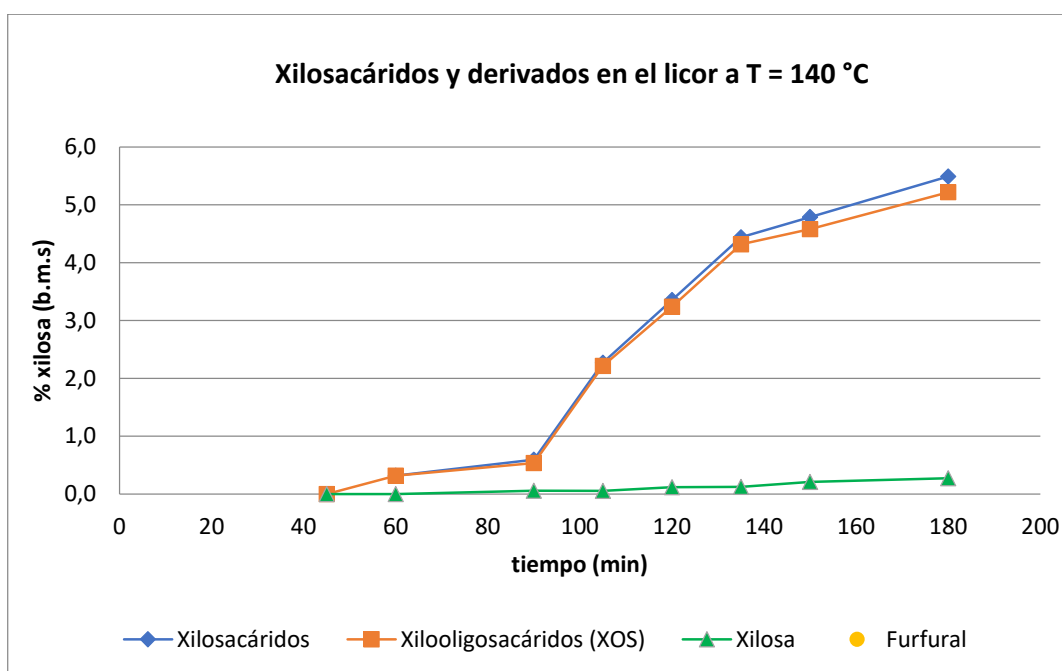


Figura 7-7. Distribución de los xilosacáridos y derivados en función del tiempo, para una temperatura máxima de 140 °C en el tratamiento hidrotérmico. La formación de furfural no llega a producirse en estas condiciones.

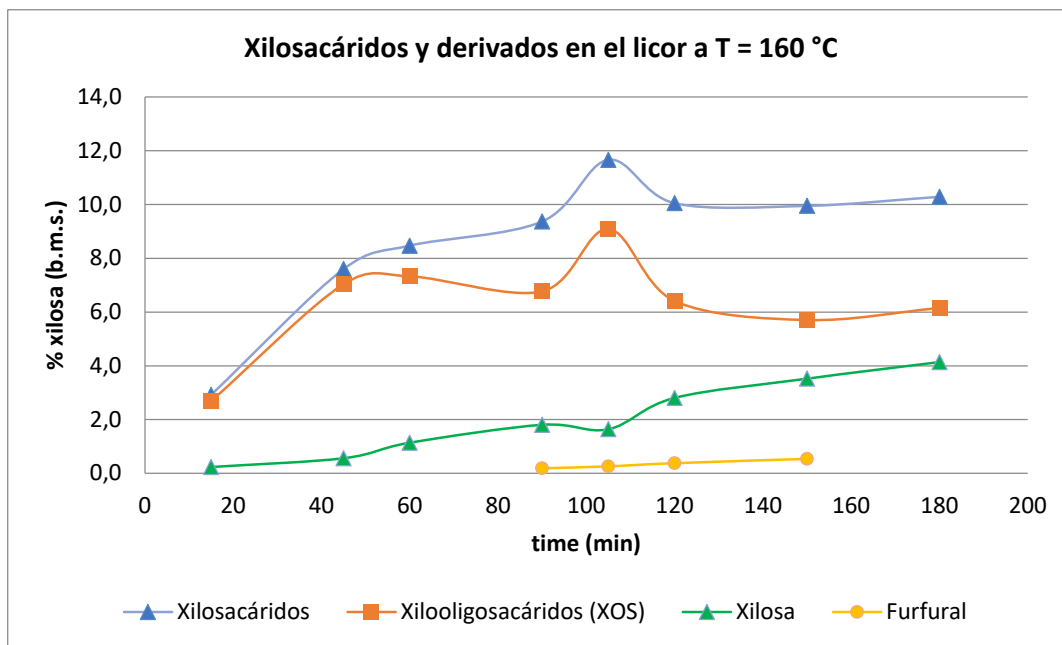


Figura 7-8. Distribución de los xilosacáridos y derivados en función del tiempo, para una temperatura máxima de 160 °C en el tratamiento hidrotérmico.

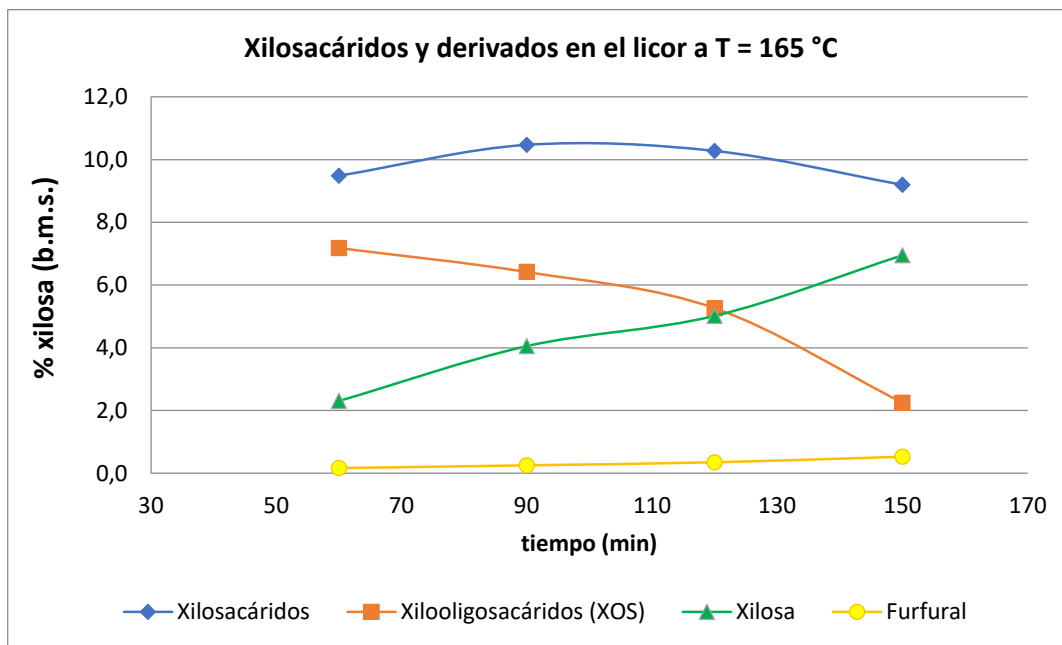


Figura 7-9. Distribución de los xilosacáridos y derivados en función del tiempo, para una temperatura máxima de 170 °C en el tratamiento hidrotérmico.

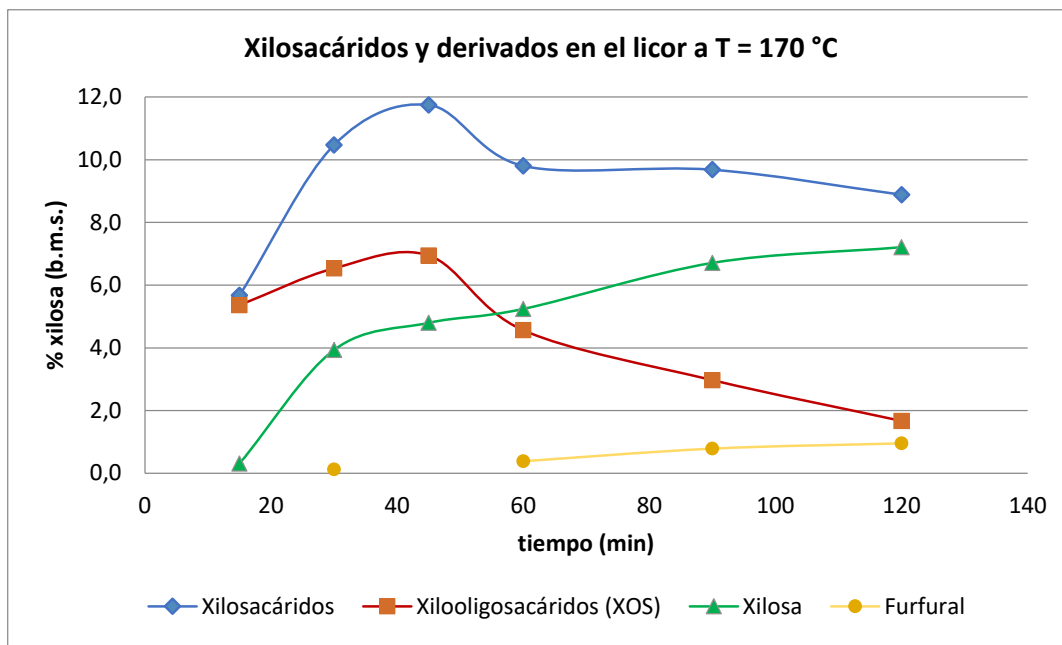


Figura 7-10. Distribución de los xilanos y derivados en función del tiempo, para una temperatura máxima de 170 °C en el tratamiento hidrotérmico.

Puede observarse que a 140 °C la mayor extracción de xilosacáridos alcanzó a 5,5% b.m.s y los mismos se encontraron en forma polimérica en los tiempos ensayados. A 160 °C se lograron extracciones mayores, de alrededor de 10 – 12 % b.m.s.; encontrándose fundamentalmente como oligosacáridos o polímeros para tiempos menores a 105 minutos, mientras que a tiempos superiores comenzó a aumentar sensiblemente la concentración del monómero. En los ensayos a 170 °C, ya a los 30 minutos la concentración de xilosacáridos fue superior al 10 % b.m.s encontrándose una fracción importante en forma monomérica (40% respecto a la xilosa total). Al aumentar el tiempo de tratamiento (a 170°C), la concentración de xilosacáridos presentes como xilosa aumentó, superando esta última a la fracción de oligosacáridos presentes a tiempos de 60 minutos o superiores. La disminución en la concentración de xilosacáridos que se observó para tiempos superiores a 60 minutos se debe a que comienzan a ser importantes las reacciones de descomposición de la xilosa, lo que se evidencia con el aumento de la concentración de furfural.

Como se desarrolló en la revisión de literatura, este comportamiento es esperable debido a la separación de las hemicelulosas de la matriz y posterior hidrólisis en el licor. En éste, a medida que transcurre el tiempo, las reacciones de hidrólisis ocurren con mayor intensidad, acortándose las cadenas de hemicelulosas, produciéndose entonces polímeros de menor peso molecular y formándose el monómero (en este caso, fundamentalmente xilosa). A su vez si las condiciones de hidrólisis son intensas o el tiempo transcurrido es lo suficiente largo, se dan las reacciones de deshidratación del monómero para la producción de furfural. Este comportamiento está ampliamente reportado en literatura. La distribución de las cantidades relativas de oligosacáridos, monómero y furfural que se obtuvieron en este trabajo, son similares a las reportadas en los trabajos de Rangel *et al.* (Rangel *et al.*, 2016), Chirat *et al.* (Chirat, Lachenal and Sanglard, 2012), Garrote *et al.* (Garrote *et al.*, 2007) y Tunc y van Heiningen (Tunc and van

Heiningen, 2008), trabajando los primeros con eucalipto y el último con una mezcla de chips de maderas del sur de Estados Unidos.

La extracción de glucosacáridos no siguió un patrón determinado, encontrándose los datos distribuidos al azar y siendo siempre menores a 2.5 % glucosa (en base madera seca), por lo que no se analizaron en mayor profundidad. Esta glucosa se atribuye a parte de los glucuronoxilanos que forman parte de las hemicelulosas, más que a sean originados por degradación de las cadenas de celulosa.

La Figura 7-11 muestra la absorbancia de los extractos obtenidos a 280 nm para una dilución de 1/100.

Como es de esperarse se obtuvieron bajas absorbancias a temperaturas hasta 140 °C, las que se debieron posiblemente a los polifenoles presentes en los extractivos de la madera de eucalipto. A temperaturas mayores, la absorbancia aumentó, indicando que comienza la solubilización de la lignina presente.

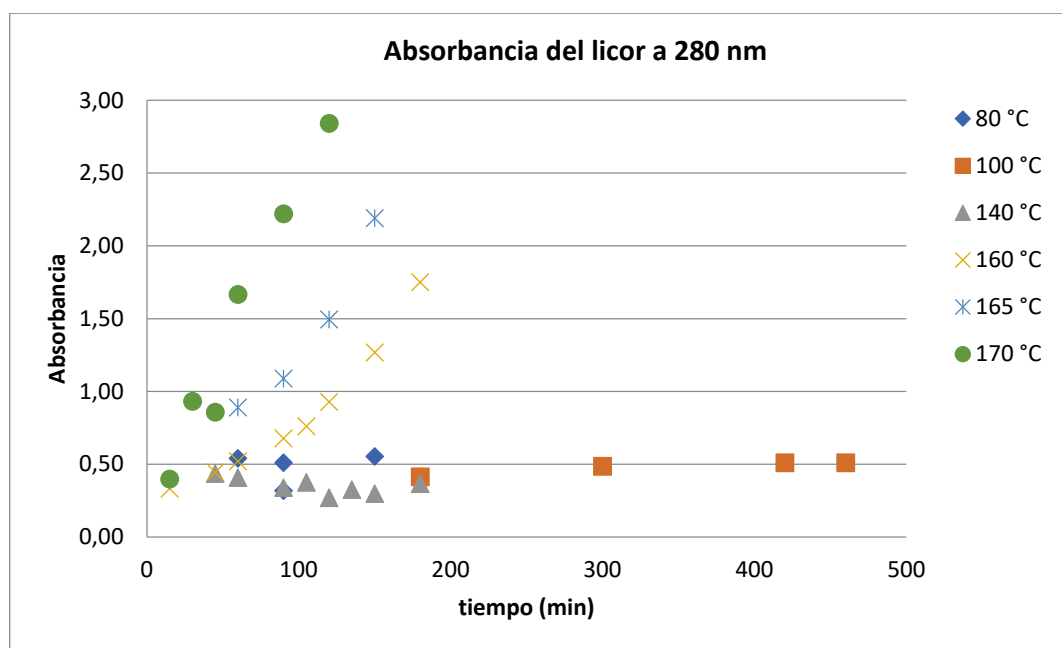


Figura 7-11. Absorbancia de los extractos obtenidos a 280 nm para una dilución de 1/100.

Tunc y van Heiningen (Tunc and van Heiningen, 2008) reportaron un comportamiento similar para los compuestos fenólicos en el licor. En este caso los autores también midieron la absorbancia a 280 nm pero calcularon la concentración de lignina utilizando un coeficiente de extinción reportado en la bibliografía (Alen and Hartus, 1988). Dado que no se encontró un coeficiente de extinción confiable para eucalipto y que además está indicado que a 280 nm hay interferencia en la medición por la formación de furfural y HMF (que en este trabajo fue siempre despreciable o en muy baja concentración), se prefiere dejar los gráficos en unidades de absorbancia y usar los valores a modo comparativo. Dada la dilución efectuada, se compararon las medidas de absorbancia al pH del agua destilada (pH = 5,5), de forma de no alterar la absorbancia medida por estar trabajando a distintos pH.

La Figura 7-12 muestra la variación del pH final en el extracto con el factor P. Claramente se aprecia que para factores P bajos hay un marcado descenso del pH al aumentar el Factor P, mientras que se estabilizó en un pH alrededor de 3 a factores P de 200 o superiores. La formación de ácidos acético, fórmico y ácidos urónicos (estos últimos no medidos en este trabajo) explican este comportamiento. Este fenómeno, conocido como autohidrólisis, es típico de la biomasa que contiene hemicelulosas con ácidos orgánicos sustituidos.

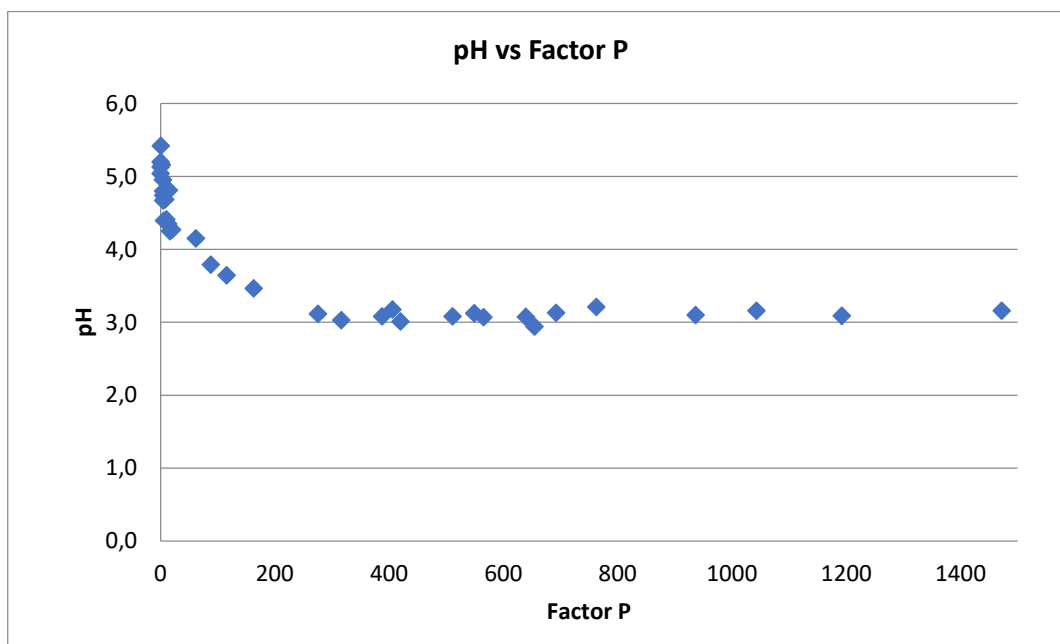


Figura 7-12. Variación del pH del extracto en función del factor P aplicado en el tratamiento.

Este comportamiento ha sido reportado por varios autores (Garrote *et al.*, 2007; Tunc, 2008; Borrega, Nieminen and Sixta, 2011). Particularmente en el caso de las maderas de fibra corta, que contienen mayor proporción de grupos acetilos unidos a las hemicelulosas que las maderas de fibra larga u otros tipos de biomasa, si se monitorea el pH durante el tratamiento hidrotérmico se encuentra un comportamiento similar al reportado en esta Figura. La liberación temprana de los grupos acetilos de las cadenas de hemicelulosas, explicarían la disminución de pH durante la primera etapa de la extracción con agua caliente, para luego mantenerse relativamente constante.

La Figura 7-13 muestra la presencia de grupos acetilos (expresados como ácido acético) en el licor extraído en función de la temperatura y tiempo de extracción. En esta figura no se hace una distinción entre los grupos acetilos que están en solución como parte de ácido acético, de aquellos que están unidos a los XOS.

Puede observarse que a temperaturas menores o igual a 140 °C, la extracción de grupos acetilos siguió la misma tendencia que la extracción de los carbohidratos, no obteniéndose una remoción apreciable. Sin embargo, para los ensayos de 160 y 165 °C y a tiempos superiores a 60 minutos se logró extraer un contenido de grupos acetilos del orden del 80 - 95 % de los inicialmente

presentes en la madera. No se reportan los datos a 170°C ya que los mismos no son concordantes.

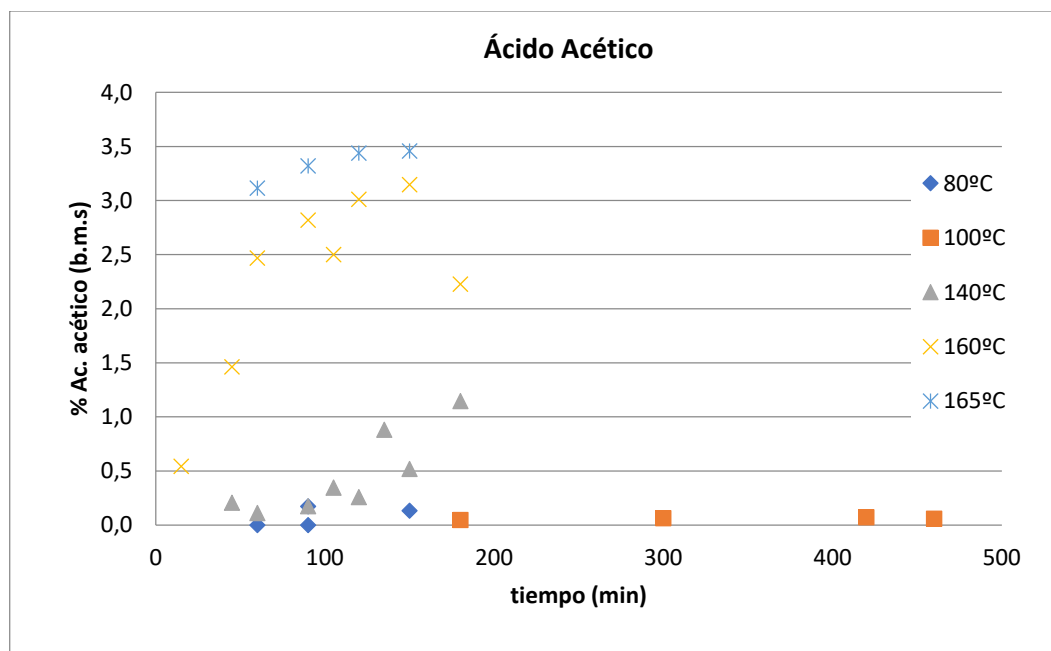


Figura 7-13. Contenido de grupos acetilos (medido como ácido acético) en el extracto para diferentes combinaciones de tiempo-temperatura de reacción.

Rangel *et al.* (Rangel *et al.*, 2016) reportaron un comportamiento similar en su trabajo con *Eucalyptus grandis*, extrayendo hasta casi el 100 % de los grupos acetilos en las condiciones más severas. En el caso de estos autores, la cantidad inicial de grupos acetilos en madera fue 1,53 % b.m.s, posiblemente porque utilizaron aserrín industrial de maderas entre 12 y 50 años.

Garrote *et al.* (Garrote *et al.*, 2007), trabajando con *Eucalyptus globulus*, reportaron una extracción máxima de grupos acetilos totales de 72 % a 160 °C y 30 minutos, disminuyendo su contenido en solución a tiempos mayores, este comportamiento, no fue observado en nuestro trabajo. Por su parte, Leschinsky *et al.* (Leschinsky, Sixta and Patt, 2009), utilizando también chips de *Eucalyptus globulus* indicaron una remoción de grupos acetilos entre 64 % (a factor P =300) y 77 % (a factor P=1500). Tunc (Tunc, 2008), trabajando con chips del sur de estados Unidos, indicó una remoción de 71 % de los grupos acetilos iniciales luego de una extracción a 150 °C durante 500 minutos.

A los efectos de analizar la liberación de grupos acetilos en función de la extracción de los xilanos se grafica el porcentaje de grupos acetilos vs el contenido de xilosacáridos en el licor (Figura 7-14).

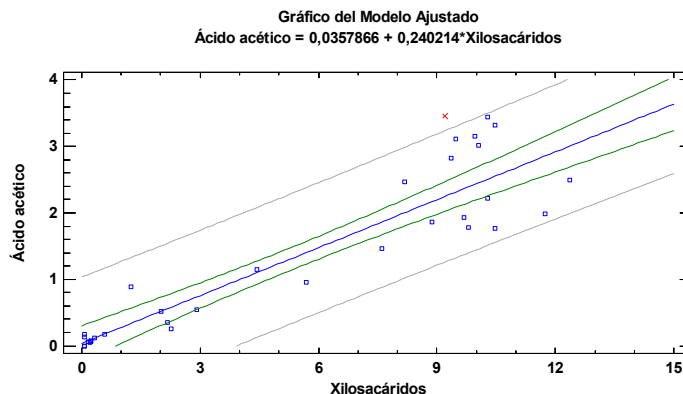


Figura 7-14. Ajuste del modelo de la relación entre el contenido de xilosacáridos y ácido acético en el licor extraído.

La ecuación obtenida al ajustar un modelo lineal del es:

$$\% \text{ Ácido acético (b.m.s.)} = 0,036 + 0,24*\% \text{ Xilosacáridos (b.m.s.)} \quad \text{Ecuación 7-3}$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre Ácido acético y el contenido de xilosacáridos con un nivel de confianza del 95,0%. El estadístico R^2 indica que el modelo ajustado explica 85 % de la variabilidad en Ácido acético.

De esta forma, se verifica una relación de 2,4 grupos acetilos (expresados como HAC) por cada 10 moléculas de xilosa, manteniéndose entonces la relación inicial en la madera (2.4).

Garrote *et al.* (Garrote *et al.*, 2007), indicó una relación de 4,5 a 4,9 grupos acetilos cada 10 moléculas de xilosa, trabajando a 160 °C y entre 30 a 66 minutos. La relación inicial indicada por estos autores fue de 4,7. Por su parte, Leschinsky *et al.* (Leschinsky, Sixta and Patt, 2009), utilizando también *Eucalyptus gloubulus*, señalaron que la relación de grupos acetilos se mantiene relativamente constante durante el transcurso de la reacción (entre P = 300 y 1500), variando esta entre 5,3 y 5,7 y a un nivel un poco inferior al de la madera de partida (6,7).

7.3.3. Ajuste de los datos experimentales a modelos estadísticos.

A los efectos de encontrar las mejores condiciones de tratamiento y ante la imposibilidad a posteriori de hacer un diseño de experiencias con todos los datos disponibles, se trabajó con dos diseños experimentales, uno a “temperaturas moderadas” (Diseño 1) y otro a “temperaturas bajas” (Diseño 2).

Diseño 1:

El Diseño 1 es un diseño factorial 3^2 , donde se toma tiempo y temperatura como variables y se estudia la respuesta en términos del contenido de xilosa y xilosacáridos del líquido extraído, así como su absorbancia a 280 nm (Tabla 7-4). Para optimizar el sistema (función “deseabilidad”), se busca maximizar el contenido de xilosacáridos y minimizar el contenido de xilosa y la absorbancia a 280 nm.

Tabla 7-4. Variables utilizadas en los ensayos del Diseño 1.

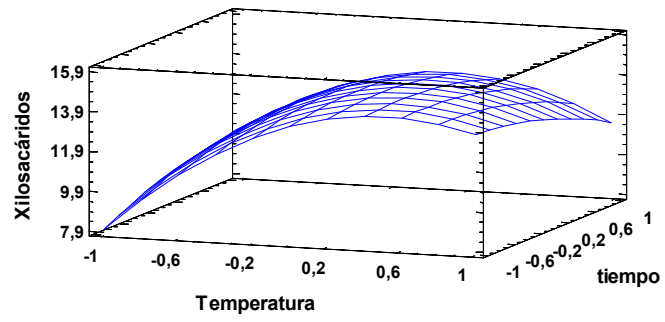
Ensayo #	Variables (valores reales)		Variables (valores codificados)	
	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Temperatura	Tiempo
1	160	120	-1	1
2	165	120	0	1
3	170	120	1	1
4	160	90	-1	0
5	165	90	0	0
6	170	90	1	0
7	160	60	-1	-1
8	165	60	0	-1
9	170	60	1	-1

Las ecuaciones ajustadas del modelo son las siguientes, con los coeficientes expresados en las unidades originales de las variables:

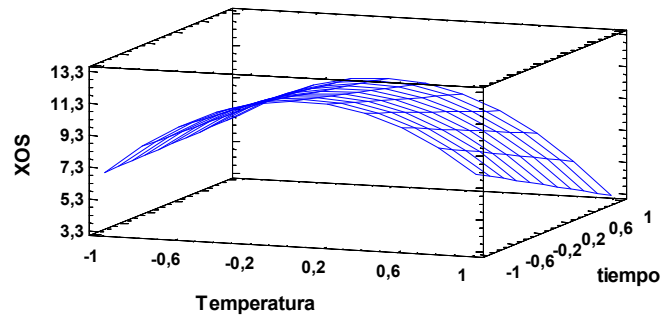
Parámetro	Ecuación	R ²
Rendimiento de la extracción	$\text{Rendimiento} = 18,58 + 1,75 \cdot \text{Temperatura} + 1,67 \cdot \text{tiempo} + 1,74 \cdot \text{Temperatura}^2$	0,91
Xilosacáridos presentes en el licor	$\text{Xilosacáridos} = 14,04 + 1,79 \cdot \text{Temperatura} - 2,75 \cdot \text{Temperatura}^2 - 1,06 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{tiempo} - 0,44 \cdot \text{tiempo}^2$	0,99
Xilo-oligosacáridos presentes en el licor	$\text{XOS} = 10,84 - 0,66 \cdot \text{Temperatura} - 1,15 \cdot \text{tiempo} - 4,49 \cdot \text{Temperatura}^2 - 1,22 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{tiempo}$	0,99
Xilosa presente en el licor	$\text{Xilosa} = 2,65 + 2,23 \cdot \text{Temperatura} + 0,92 \cdot \text{tiempo} + 1,50 \cdot \text{Temperatura}^2$	0,99
Compuestos fenólicos	$\text{Abs } 280\text{nm} = 1,16 + 0,77 \cdot \text{Temperatura} + 0,36 \cdot \text{tiempo} + 0,32 \cdot \text{Temperatura}^2 + 0,19 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{tiempo}$	0,99

La Figura 7-15 muestra la superficie de respuesta de diversos compuestos presentes en el licor: xilosacáridos, xilooligosacáridos, xilosa y absorbancia a 280nm.

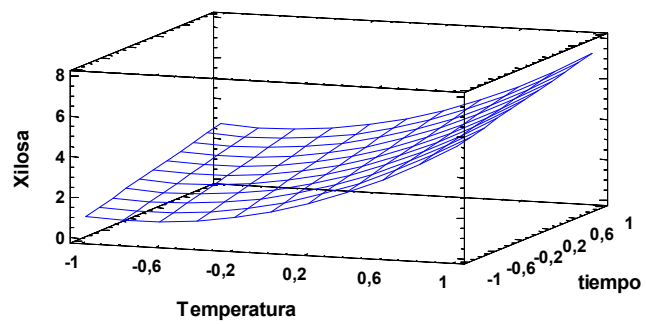
Xilosacáridos (% b.m.s.)



Xilo-oligosacáridos (% b.m.s.)



Xilosa (% b.m.s.)



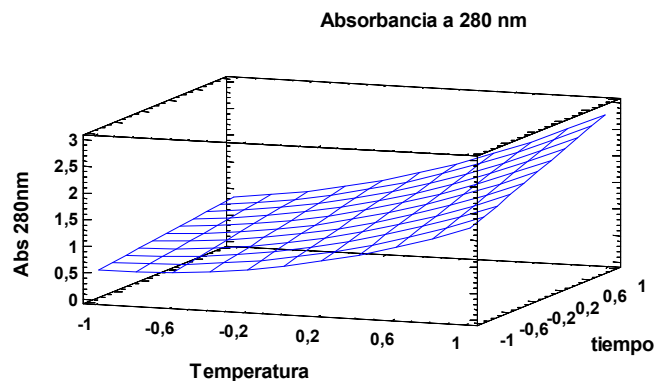


Figura 7-15. Superficie de respuesta de los distintos compuestos de interés presentes en el licor.

Optimizando el diseño en términos de mayor concentración de xilosacáridos en el licor y menor absorbancia obtenemos el gráfico mostrado en la

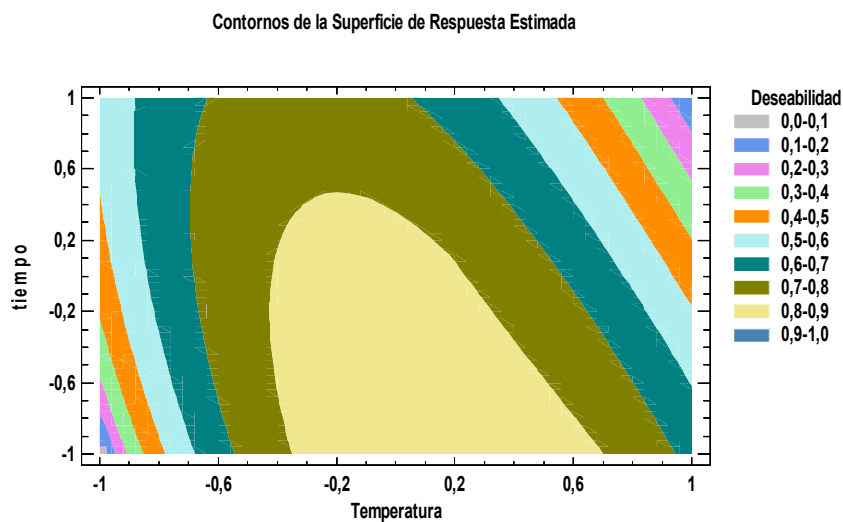


Figura 7-16, donde la máxima deseabilidad está dada en torno a 165 °C de temperatura y a tiempos entre 60 y 100 minutos a esa temperatura (factores P entre 385 y 580). Si se optimiza el diseño considerando la mayor concentración de xilosacáridos de forma no monomérica (XOS y xilanos) y menor absorbancia, esta región se acota un poco, estando el máximo en la región de 163 ° y 60 minutos (-0,2; -1, en variables transformadas).

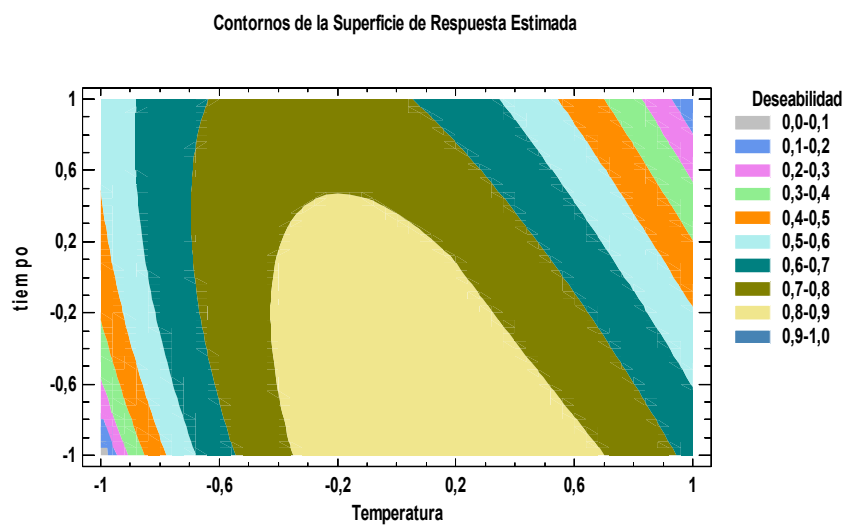


Figura 7-16. Superficie de respuesta obtenida al evaluar múltiples respuestas: maximización de xilosacáridos presentes y minimización absorbancia a 280nm.

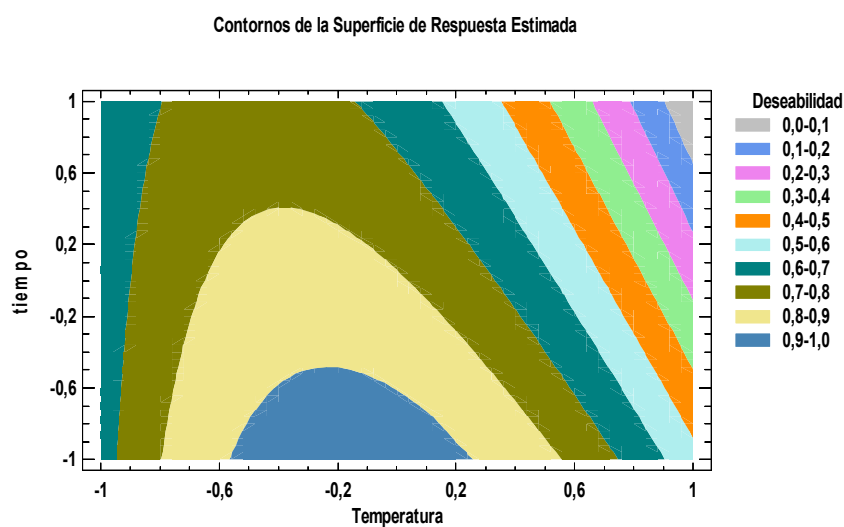


Figura 7-17. Superficie de respuesta obtenida al evaluar múltiples respuestas: maximización de xilooligosacáridos presentes y minimización de absorbancia a 280nm.

En el trabajo de Chirat *et al.* (Chirat, Lachenal and Sanglard, 2012) utilizando chips de *Eucalyptus globulus*, encontraron que la concentración de oligómeros (XOS) pasó por un óptimo entre 60 y 90 min de tiempo de reacción a 160 °C, disminuyendo al aumentar el tiempo de reacción. Por su parte, en el trabajo de Rangel *et al.* (Rangel *et al.*, 2016) , el máximo de formación de XOS se encuentra a factor P = 394, valor que está muy próximo al óptimo encontrado en nuestro trabajo.

Diseño 2:

El Diseño 2 es un diseño factorial 2^2 , donde las variables son nuevamente tiempo y temperatura (en niveles más bajos) y se estudió la respuesta en términos del contenido de xilosacáridos del líquido extraído, así como la absorbancia de éste a 280 nm (la producción de xilosa y furfural en estas condiciones son despreciables). A los efectos de evitar errores estadísticos por posibles interacciones de las variables y de esta forma calcular las ecuaciones de regresión del modelo, se agregaron más niveles al diseño para no usar solo 4 corridas experimentales en un modelo con dos factores. Los valores -0,33 en la variable ajustada tiempo, se deben a un error en el cálculo del valor 0 al realizar el diseño. Para optimizar el sistema (función “deseabilidad”), se busca maximizar el contenido de xilosacáridos y minimizar la absorbancia a 280nm. Por las condiciones utilizadas, no existe formación de xilosa.

Ensayo #	Variables (valores reales)		Variables (valores codificados)	
	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Temperatura	Tiempo
10	80	60	-1	-1
11	80	90	-1	-0,33
12	80	90	-1	-0,33
13	80	150	-1	1
14	140	60	1	-1
15	140	90	1	-0,33
16	140	150	1	1

Las ecuaciones ajustadas del modelo son las siguientes, con los coeficientes expresados en las unidades originales:

Parámetro	Ecuación	R ²
Rendimiento de la extracción	Rendimiento (%b.m.s.) = $4,55 + 1,54 \cdot \text{Temp} + 1,09 \cdot \text{tiempo} + 0,89 \cdot \text{Temp} \cdot \text{tiempo}$	0,98

Xilosacáridos presentes en el licor	$\text{Xilosacáridos (\%b.m.s.)} = 1,12 + 1,04 \cdot \text{Temp} + 1,18 \cdot \text{tiempo} + 1,18 \cdot \text{Temp} \cdot \text{tiempo}$	0,95
Absorbancia	$\text{Absorbancia 280nm} = 0,44 - 0,09 \cdot \text{Temp}$	0,88

La Figura 7-18 muestra la superficie de respuesta de diversos compuestos presentes en el licor: xilosacáridos y absorbancia a 280nm.

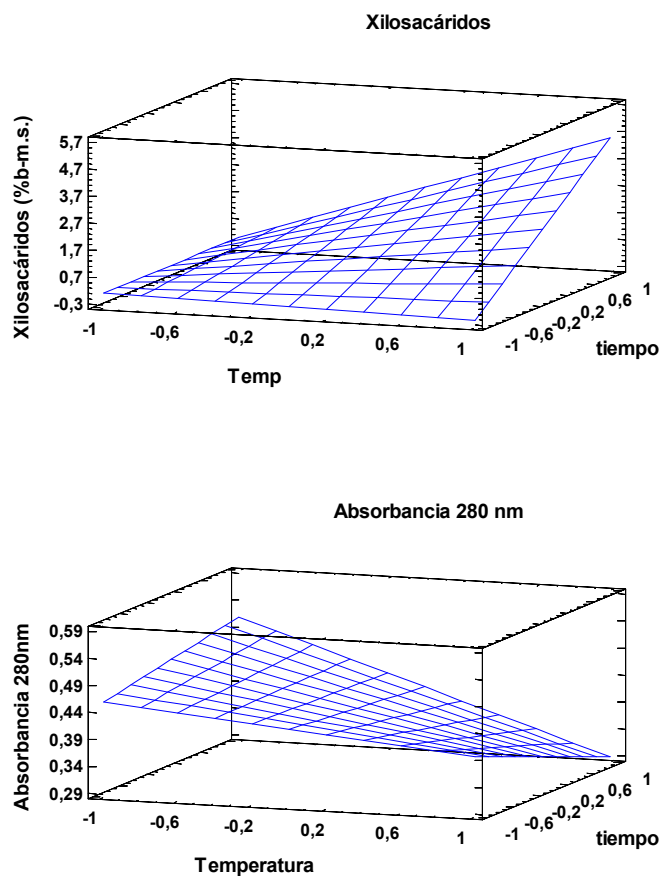


Figura 7-18. Superficie de respuesta de los distintos compuestos de interés presentes en el licor.

La Figura 7-19 muestra la función de 'deseabilidad' evaluada en cada punto del diseño. Entre los puntos de diseño, la 'deseabilidad' máxima se alcanza en el punto de máxima temperatura y tiempo, que corresponde a 140°C y 150 minutos, sin embargo, estos valores reportan un contenido de xilosacáridos muy bajo, respecto a los valores obtenidos en el Diseño 1, por lo que no se continúa trabajando en esta región.

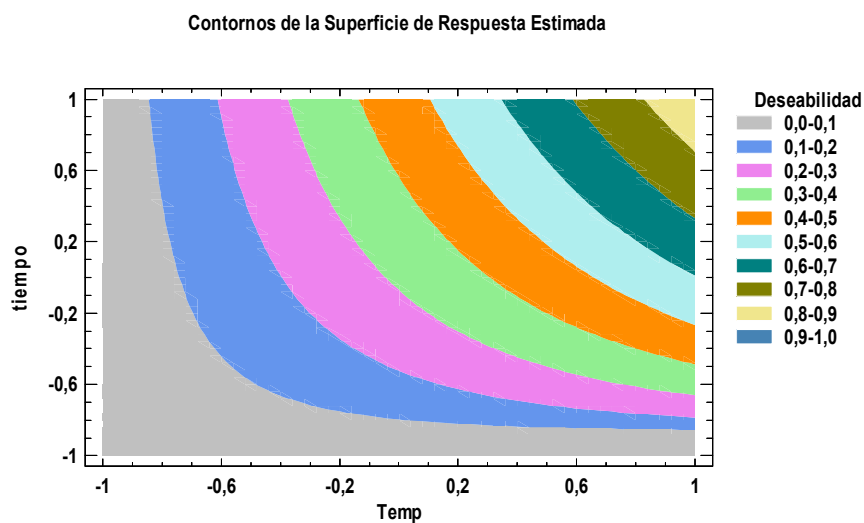


Figura 7-19. Superficie de respuesta obtenida al evaluar múltiples respuestas: maximización de xilosacáridos presentes y minimización de absorbancia a 280nm.

7.3.4. Análisis de la distribución de pesos moleculares en los extractos obtenidos.

La Figura 7-20 muestra el cambio en el aspecto de líquido obtenido como resultante de las etapas de purificación del licor realizada previo a la determinación de pesos moleculares.



Figura 7-20. Procedimiento realizado al licor del tratamiento hidrotérmico para la determinación de distribución de pesos moleculares de los carbohidratos disueltos en el mismo.

La Figura 7-21 se muestra el resultado de la cromatografía en capa fina realizada para una de las muestras a analizar. En la misma se puede observar una distribución de compuestos de pesos moleculares diferentes y que reaccionan al orcinol, es decir que contienen carbohidratos.

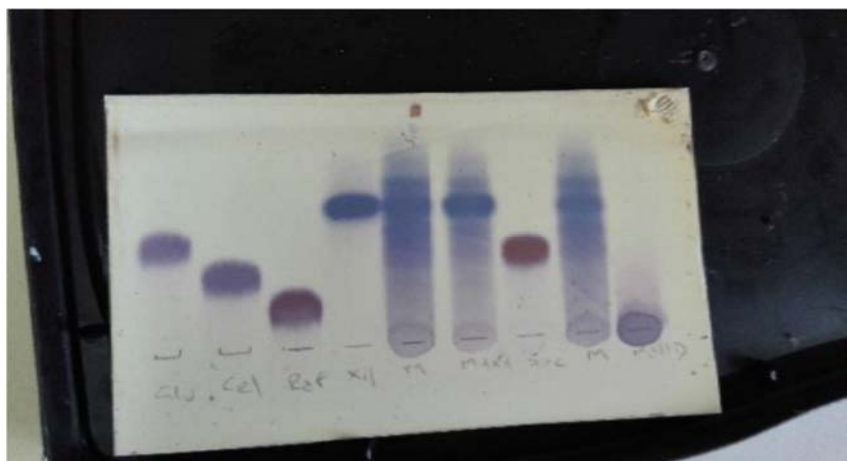
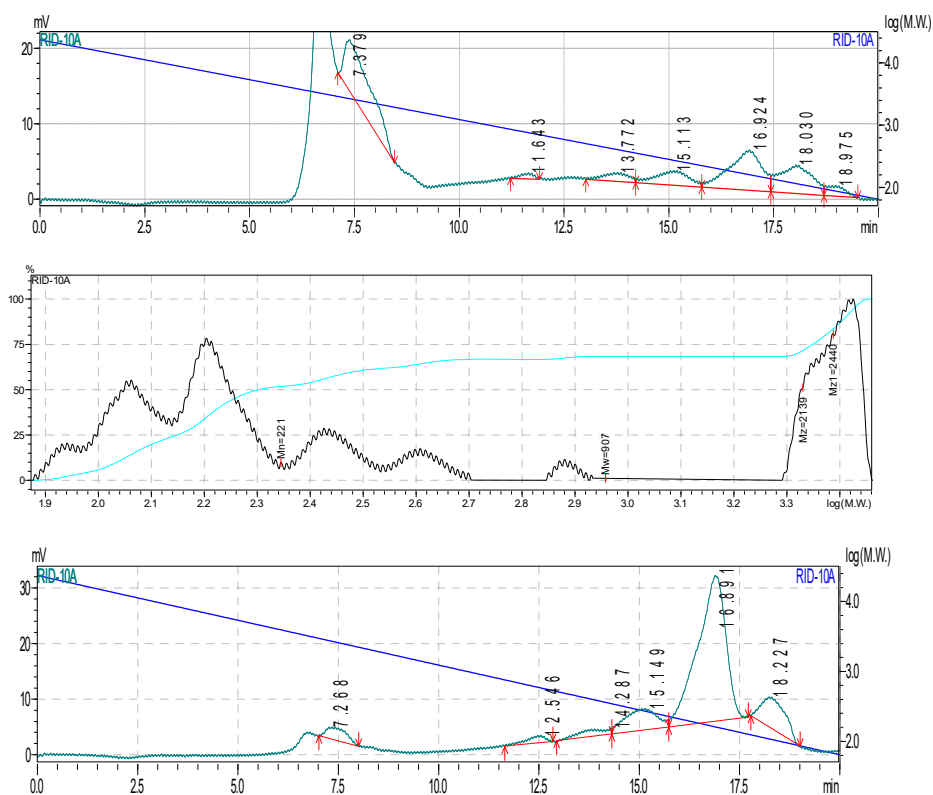


Figura 7-21. TLC de muestra de autohidrólisis (160°C, 110minutos) y estándares a los efectos de confirmar la presencia de carbohidratos posterior a la “limpieza” de los licores para su inyección en HPLC-SEC.

En la Figura 7-22 se muestran los cromatogramas y distribución de pesos moleculares de dos muestras a 160 °C y distintos tiempos de extracción.



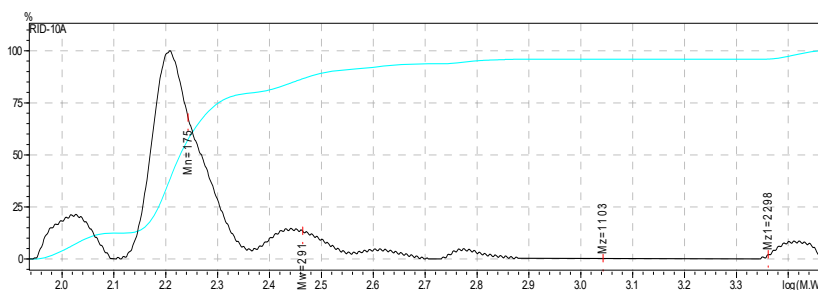


Figura 7-22. Cromatogramas y distribución de pesos moleculares de dos muestras de autohidrólisis realizadas a 160 °C. La primera corresponde a 60 minutos y la segunda a 120 minutos a temperatura máxima de 160 °C. Determinación con columna Biorad Aminex 42A.

Si a modo de ejemplo se tabulan los valores de los parámetros característicos de la distribución de pesos moleculares obtenidos por las muestras de autohidrólisis a 160 °C, se obtienen los valores presentados en la Tabla 7-5. En la misma Mn indica el peso molecular promedio, Mw el peso molecular promedio ponderado y Mz y Mz+1 son los pesos moleculares promedios más altos obtenidos.

Tabla 7-5. Distribución molecular de los licores de autohidrólisis a 160 °C de temperatura máxima. Determinación con columna Biorad Aminex 42 A.

tiempo a T max.	Mn (Da)	Mw (Da)	Mz (Da)	Mz+1 (Da)	Mw/Mn
15	129	326	930	1220	2,5
45	187	435	1509	2304	2,3
60	221	907	2139	2440	4,1
90	237	789	1975	2386	3,3
90	231	709	1854	2332	3,1
105	182	646	2010	2493	3,5
120	215	717	1963	2379	3,3
150	183	330	1123	2162	1,8
180	206	784	2033	2385	3,8

Estos valores no tienen una tendencia clara y como se observa en los cromatogramas, existen incertidumbres por la forma de los picos en el tiempo muerto del cromatograma. Esta forma se puede explicar por un desdoblamiento producido del pico de tiempo muerto o por la presencia de compuestos de carbohidratos de mayor peso molecular al que puede separar esta columna.

Para despejar estos interrogantes, se decidió trabajar con 3 columnas PSS (MCX 1000Å) en serie, utilizando agua como fase móvil a un flujo de 0,6 mL/min y 35 °C de temperatura. La detección se realiza de igual forma que en el caso de la columna anterior. Según el fabricante, conectando estas tres columnas en serie se consigue determinar los pesos moleculares de hasta 10000 Da.

En este caso, la curva de calibración se realiza por 10 puntos, agregando, además de los estándares mencionados de xilosa a xilopentosa, los estándares de la sal sódica de sulfato de poliestireno de la marca PSS que corresponden a los pesos moleculares: 1830 Da, 3610 Da, 6520 Da, 7930 Da y 10600 Da. A pesar de usar estándares de dos tipos químicamente distintos se obtiene una buena linealidad en la curva de calibración ($R^2 = 0,98$). En la Figura 7-23 se muestran los cromatogramas y la distribución de pesos moleculares de dos muestras obtenidas realizando el tratamiento hidrotérmico a 160 °C.

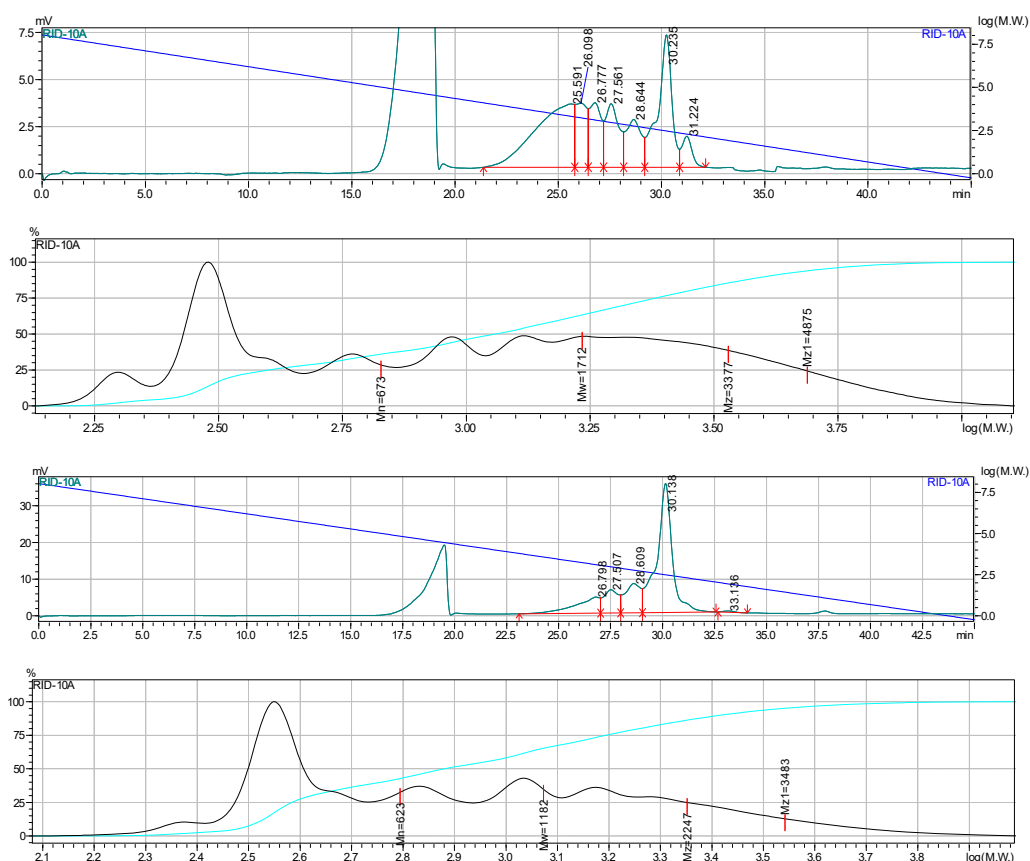


Figura 7-23. Cromatogramas y distribución de pesos moleculares de dos muestras de autohidrólisis realizadas a 160 °C. La primera corresponde a 60 minutos y la segunda a 120 minutos a temperatura máxima de 160 °C. Determinación realizada en columnas PSS.

Como puede observarse ahora, los cromatogramas tienen mejor calidad analítica (no se aprecia el ruido de los cromatogramas anteriormente obtenidos) y no existen mayores incertidumbres acerca del pico correspondiente al tiempo muerto. En los cromatogramas de todas las muestras analizadas se observaron distribuciones multimodales. Este comportamiento es típico de este tipo de muestras y ha sido reportado previamente (Li, Converse and Wyman, 2003; Leschinsky, Sixta and Patt, 2009).

Al graficar los valores de los parámetros característicos de la distribución de pesos moleculares, se observan tendencias claras, como se indican en la Figura 7-24.

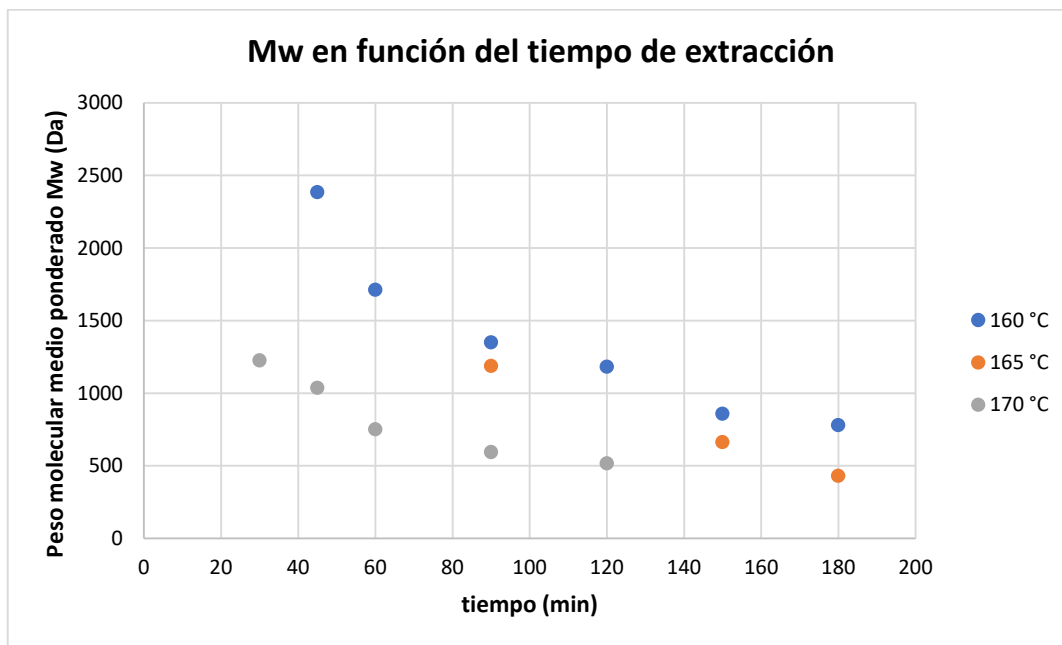


Figura 7-24. Distribución de pesos moleculares medios ponderados de los licores de autohidrólisis en función del tiempo de extracción, a distintas temperaturas. Determinación realizada en columnas PSS.

No se muestran los valores a temperatura de 140 °C ya que dan cromatogramas con muy baja relación señal/ruido y los parámetros obtenidos no son coherentes, factiblemente por la baja concentración de azúcares en el licor.

Se observa que, para cada temperatura, al aumentar el tiempo de hidrólisis bajó el peso molecular ponderado (Mw), lo cual es de esperar ya que las cadenas de xilanos se acortan. La misma conclusión se puede observar si se comparan los valores obtenidos a las 3 temperaturas reportadas a un tiempo determinado, el Mw bajó al aumentar la temperatura. Chen *et al.* (Chen, Lawoko and van Heiningen, 2010) encontraron una tendencia similar trabajando con chips de maderas del sur de Estados Unidos a 160 °C. Leschnisky *et al.* (Leschinsky, Sixta and Patt, 2009) reportaron Mw de 1400, 900 y 400 Da, trabajando con factores P de 300, 600 y 1500, respectivamente. Estos valores están muy alineados con los encontrados en nuestro trabajo.

En la Figura 7-25 se muestra como varió la distribución de los pesos moleculares de los xilosacáridos en el licor en 4 muestras (a 160 °C a 60 y 120 minutos, 165 °C, 60 minutos y una muestra con un mayor contenido de xilosa, el licor extraído a 170 °C, 60 minutos).

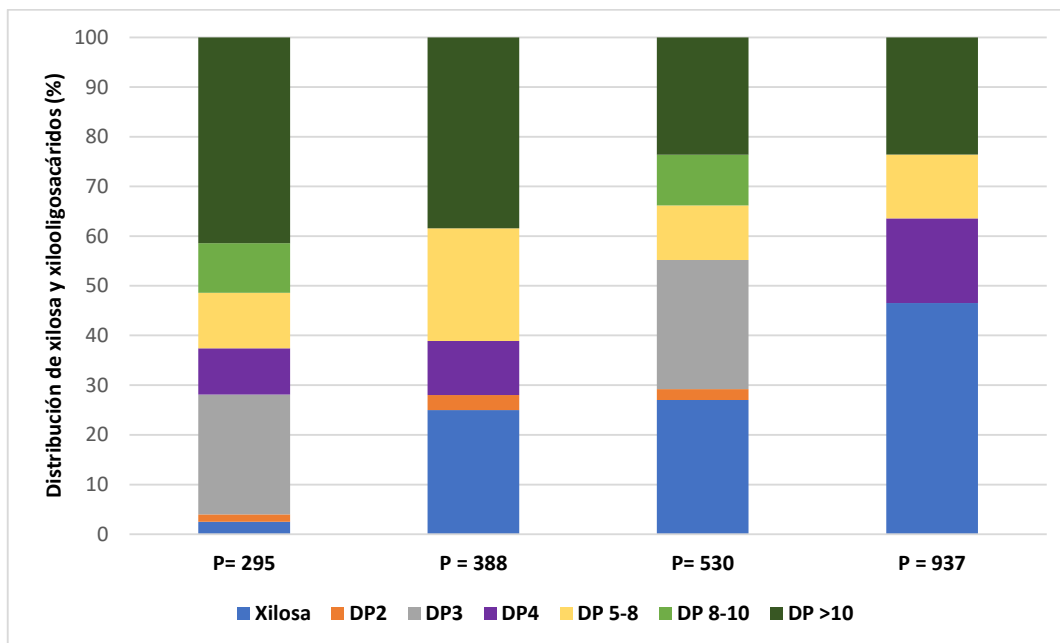


Figura 7-25. Distribución de pesos moleculares en licores del tratamiento hidrotérmico. (Factor P = 295: licor extraído a 160 °C, 60 minutos; Factor P= 388: 165 °C, 60 minutos; Factor P= 530: 160 °C, 60 minutos y Factor P= 937: 170°C, 60 minutos). El grado de polimerización se calculó tomando la anhidroxilosa como unidad de polimerización.

De la distribución de los pesos moleculares de la Figura 7-25 se puede mencionar que a $P \approx 300$, el 40 % de los xilosacáridos se encontraba con un grado de polimerización superior a 10, mientras que para el factor P de 530 o mayores, aproximadamente el 25 % de los xilosacáridos presentes estaba con un DP > 10. Por otra parte, es visible claramente, que el contenido de xilosa se incrementó con la intensidad del tratamiento como fue comentado previamente. La distribución de los oligosacáridos con DP entre 2 y 10, no sigue un patrón determinado, aunque se puede mencionar que entre un 30 y 55 % de los xilosacáridos se encontraron en esta fracción en las muestras indicadas en la Figura.

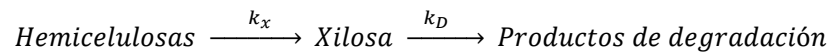
Hay poca bibliografía disponible que discuta los pesos moleculares obtenidos en tratamientos hidrotérmicos con madera. Testova *et al.* (Testova *et al.*, 2011) realizaron el tratamiento hidrotérmico sobre chips de abedul y encontraron que a $P = 200$, más del 70 % de los xilosacáridos presentes tenían un grado de polimerización mayor a 4, mientras que a $P = 1000$, más del 50 % se encontró como xilosa, la fracción con DP > 4 era menor al 5 % y el resto se encontraba distribuido como xilobiosa y xilotriosa. Por su parte, Chen *et al.* ((Chen, Lawoko and van Heiningen, 2010), trabajando con la mezcla de chips de madera del sur de Estados Unidos ya mencionado, encontraron que los licores extraídos a 160 °C y 40 minutos contenían fundamentalmente xilosacáridos con un DP > 22, mientras que los licor extraído a 160 °C y entre 80 y 90 minutos estaban compuestos principalmente por xilosacáridos con un DP < 7.

7.3.5. Estudio de las cinéticas de hidrólisis de los compuestos de xilanos.

A fin de utilizar la biomasa como materia prima para la producción de productos químicos y energía, es importante entender la cinética de fraccionamiento de la madera. Se han propuesto varios distintos modelos cinéticos para la extracción de las hemicelulosa (particularmente xilanos) y celulosa (glucosa) de materiales lignocelulósicos que son válidos tanto para un tratamiento de autohidrólisis como para la hidrólisis ácida, ya que la química de estos dos tratamientos es la misma (Abatzoglou *et al.*, 1992; Garrote, Dominguez and Parajo, 1999; Tunc, 2008; Vallejos *et al.*, 2015; Zanuso *et al.*, 2017). Las hemicelulosas son más vulnerables a la hidrólisis que la celulosa durante el tratamiento con ácido diluido. Por lo tanto, el tiempo para la hidrólisis de las hemicelulosas es mucho más corto, lo que permite el aislamiento selectivo de las hemicelulosas de la madera mediante prehidrólisis de los materiales lignocelulósicos, mientras tanto la celulosa y la lignina permanecen principalmente en la fase sólida.

Modelo 1:

Con el fin de correlacionar los datos experimentales, se han propuesto varios modelos cinéticos para la separación de xilanos de los LCM. Un modelo simple es el modelo de Conner (Conner, 1984). Este modelo propone dos reacciones de primer orden en serie para describir la hidrólisis de hemicelulosas.



Siendo la velocidad de formación de xilosa en la primera ecuación:

$$R_x = -\frac{\partial X_n}{\partial t} = k_x * X_n \quad \text{Ecuación 7-4}$$

con X_n el contenido de xilanos del sólido.

Y la velocidad de descomposición de xilosa en productos de degradación (furfural, etc.) es:

$$R_D = -\frac{\partial X_{xilosa}}{\partial t} = k_D * X_{xilosa} \quad \text{Ecuación 7-5}$$

El ajuste de los valores experimentales y los valores dados por el modelo se muestra en las Figura 7-26 y 7-27.

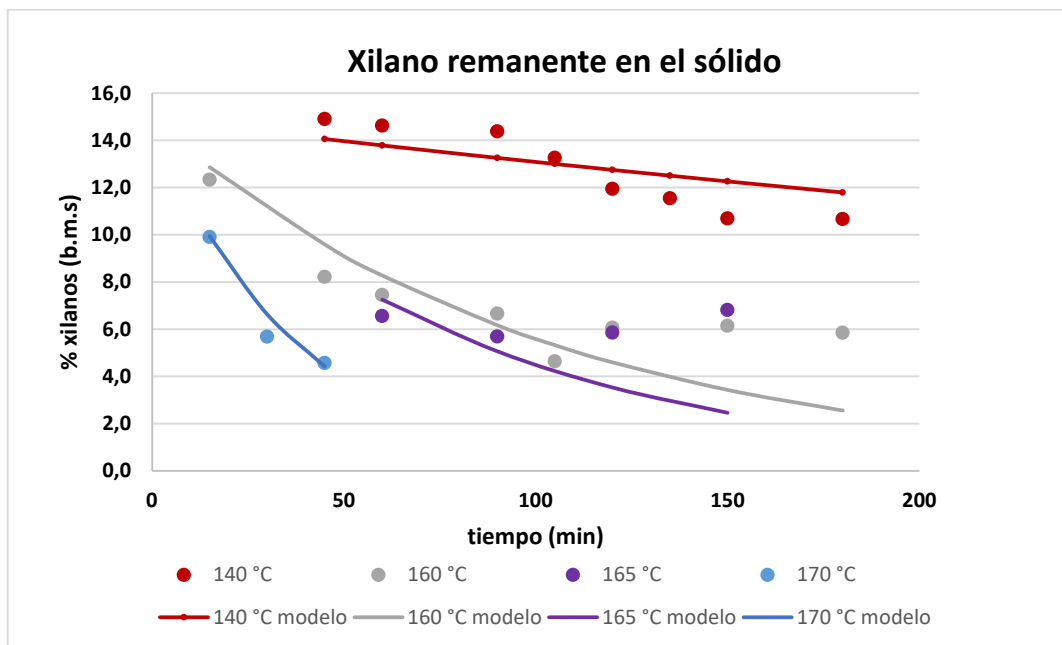


Figura 7-26. Xilanos remanentes en el sólido luego del tratamiento hidrotérmico. Puntos indican valores experimentales, líneas indican el modelo ajustado.

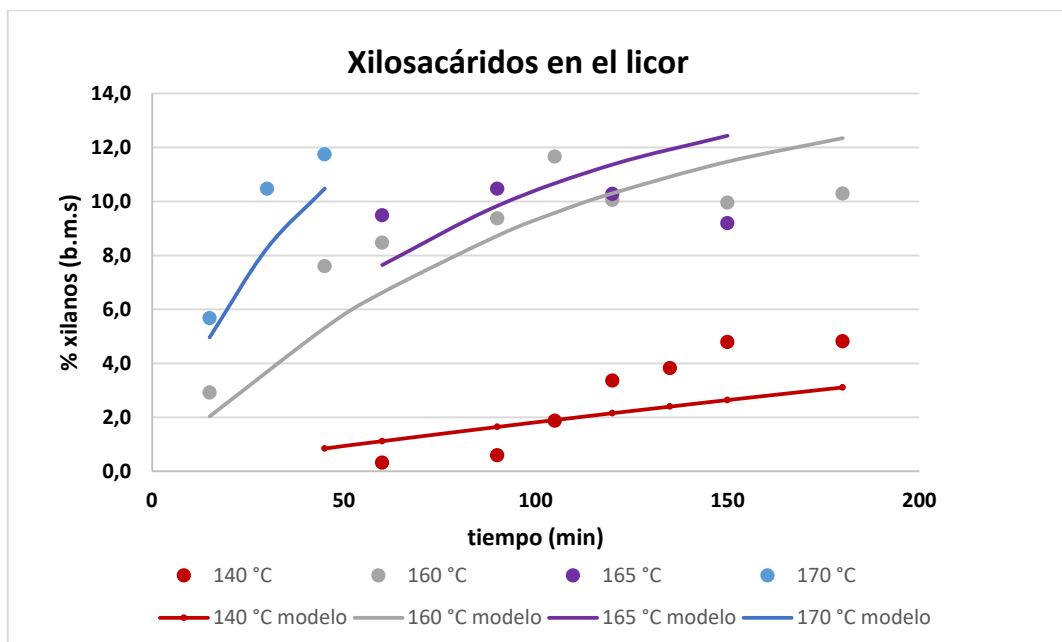


Figura 7-27. Xilosacáridos presentes en el licor extraído luego del tratamiento hidrotérmico. Puntos indican valores experimentales, líneas indican el modelo ajustado.

Los ajustes obtenidos no son malos para lo simple del modelo, pero como se puede apreciar, tienen desviaciones fundamentalmente a tiempos de extracción altos, que es donde comienza a darse la formación de furfural y productos de descomposición. No se presenta el ajuste de la Ecuación 7-5 ya que el modelo no ajusta bien debido a la calidad de los datos.

Resolviendo la Ecuación 7-4 para los diversos tiempos obtenidos a cada una de las temperaturas de trabajo analizadas se obtiene una k promedio para cada temperatura. Graficando el logaritmo de éstas en función del inverso de la temperatura, asumiendo una variación de las constantes cinéticas con la temperatura del tipo Arrhenius, se obtiene el grafico de la Figura 7-28 . El coeficiente de correlación ($R^2= 0,99$) indica que se verifica una cinética de primer orden para este modelo y se confirma el comportamiento del tipo Arrhenius de la constante cinética.

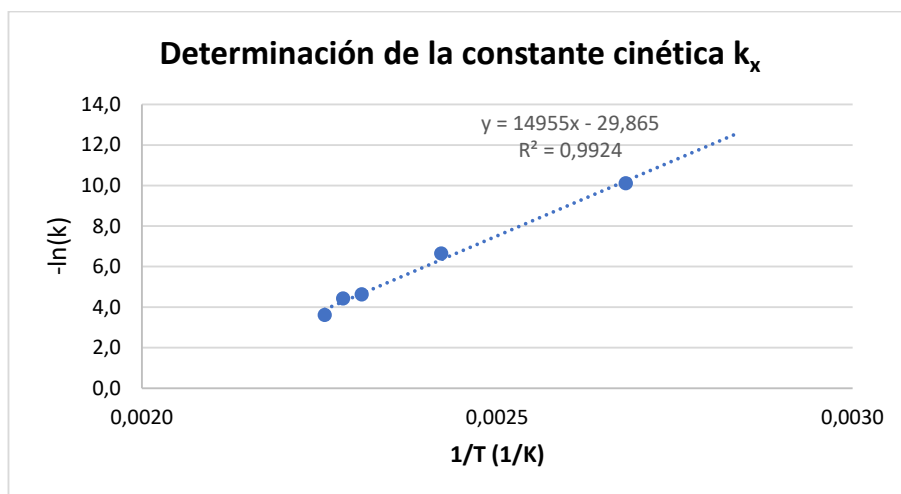


Figura 7-28. Gráfico de variación de las constantes cinéticas para la degradación de xilanos de la madera en función de la temperatura. La variación lineal del logaritmo de las constantes cinéticas con el inverso de temperatura confirma una reacción de orden 1.

Para la determinación de k_D se cuantifican los productos de descomposición como furfural exclusivamente y se utilizan solo las temperaturas de 160, 165 y 170 °C, que es donde se aprecia su formación. Se realiza el mismo procedimiento que para la determinación de k_x , utilizando ahora la Ecuación 7-5, obteniéndose el gráfico de la Figura 7-29. El ajuste a la linealidad en este caso es peor, pero hay que tener en cuenta de que se está considerando que los productos de descomposición corresponden solo a furfural y que este a su vez no se degrada a otros productos.

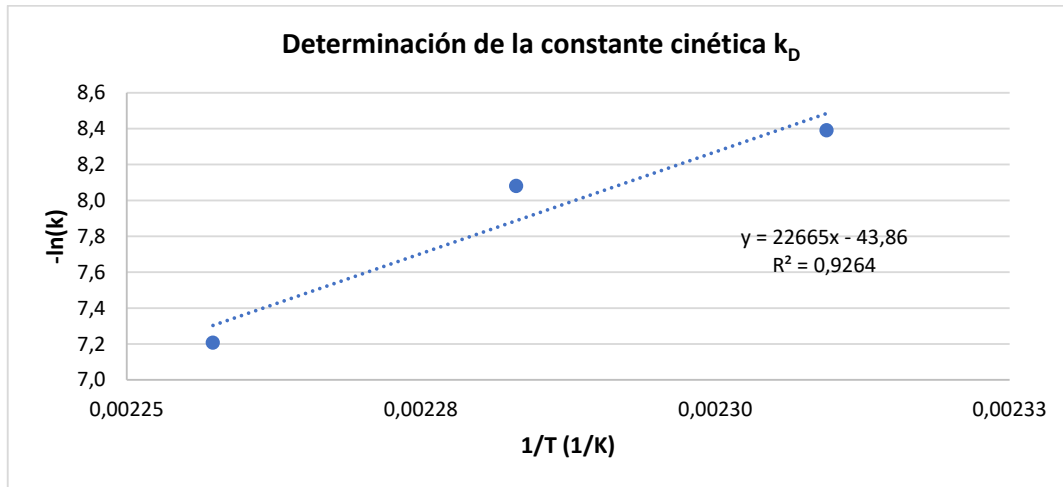


Figura 7-29. Gráfico de variación de las constantes cinéticas para la degradación de la xilosa a productos de descomposición (calculado como furfural en este caso) en función de la temperatura. La variación lineal del logaritmo de las constantes cinéticas con el inverso de temperatura confirma una reacción de orden 1.

Modelo 2

Se considerará el modelo sugerido por Mittal *et al.* ((Mittal *et al.*, 2009) para la autohidrólisis de chips de madera de arce. En el mismo se supone que la xilosa se forma por dos vías: por un lado, directamente a partir de los xilanos que componen la madera y en la segunda se da primero la formación de los oligosacáridos y posteriormente se hidrolizan para producir la xilosa. La xilosa se degrada parcialmente en furfural. Este mecanismo está representado en la Figura 7-30.

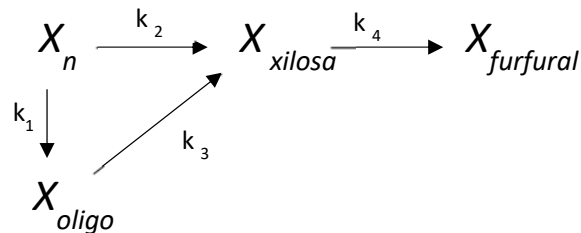


Figura 7-30. Reacciones propuestas en el modelo 2 para la solubilización de xilanos del aserrín de eucalipto.

Se consideran en este caso las cinéticas de reacción de orden 1. Planteando entonces las ecuaciones de velocidad correspondientes obtenemos las ecuaciones 7-6 a 7-9.

$$\frac{\partial X_n}{\partial t} = -(k_1 + k_2) * [X_n - (1 - \alpha)X_{n,euca}] \quad \text{Ecuación 7-6}$$

$$\frac{\partial X_{oligo}}{\partial t} = k_1 [X_n - (1 - \alpha)X_{n,euca}] - k_3 X_{oligo} \quad \text{Ecuación 7-7}$$

$$\frac{\partial X_{xilosa}}{\partial t} = k_2 [X_n - (1 - \alpha)X_{n,euca}] + k_3 X_{oligo} - k_4 X_{xilosa} \quad \text{Ecuación 7-8}$$

$$\frac{\partial X_{furfural}}{\partial t} = -k_4 X_{xilosa}$$

Ecuación 7-9

siendo α la fracción de xilanos de la madera susceptible de solubilizarse (Mittal *et al.*, 2009; Vallejos *et al.*, 2015), $X_{n, euca}$: el contenido de xilanos en la biomasa inicial, X_n : el contenido de xilanos remanentes en el sólido tratado, X_{oligo} , X_{xilosa} y $X_{furfural}$: el contenido de xilooligosacáridos, xilosa y furfural en el licor extraído respectivamente.

Resolviendo las ecuaciones diferenciales, utilizando para ello la calculadora de ecuaciones diferenciales de Wolfram Alpha Widgets® y la herramienta Solver de Microsoft Excel®, se llegan a las constantes que se muestran en la Tabla 7-6.

Tabla 7-6. Constantes obtenidas al resolver las ecuaciones cinéticas en el rango entre 140 -170 °C.

	140 °C	160 °C	165 °C	170 °C
k_1	2,14E-03	3,24E-02	4,29E-02	2,89E-01
k_2	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-10	0,00E+00
k_3	2,06E-06	3,49E-03	7,52E-03	1,63E-02
k_4	1,00E-10	8,62E-05	1,62E-04	5,56E-04
α	1,00	0,62	0,64	0,60

El ajuste de los valores experimentales y los valores dados por el modelo se muestra en las Figura 7-31 a 7-34.

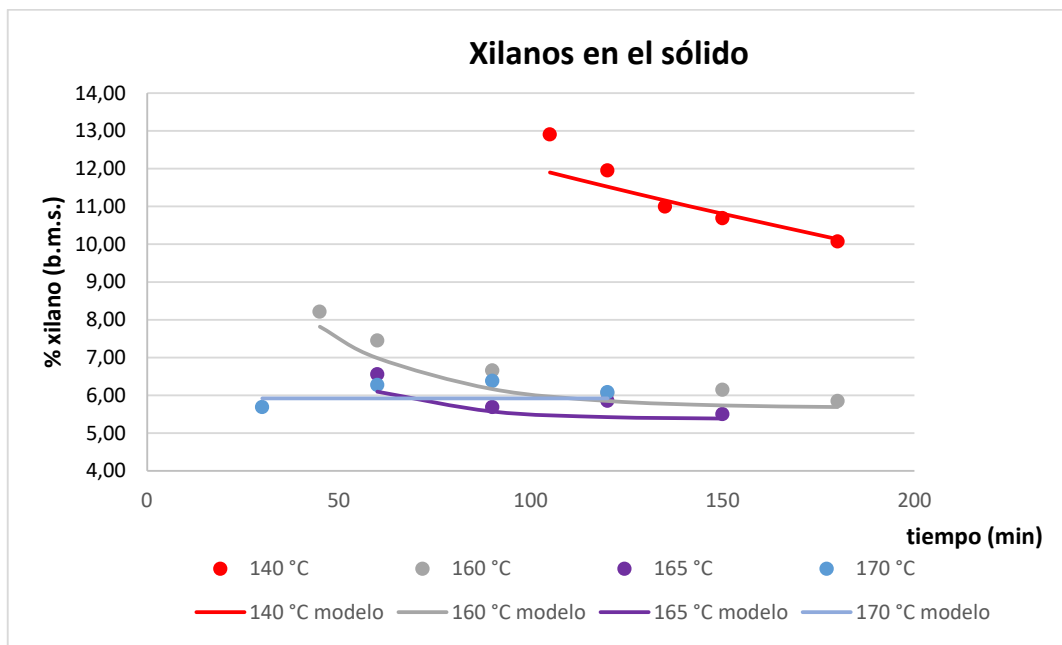


Figura 7-31. Xilanos remanentes en el sólido luego del tratamiento hidrotérmico. Puntos indican valores experimentales, líneas indican el modelo ajustado.

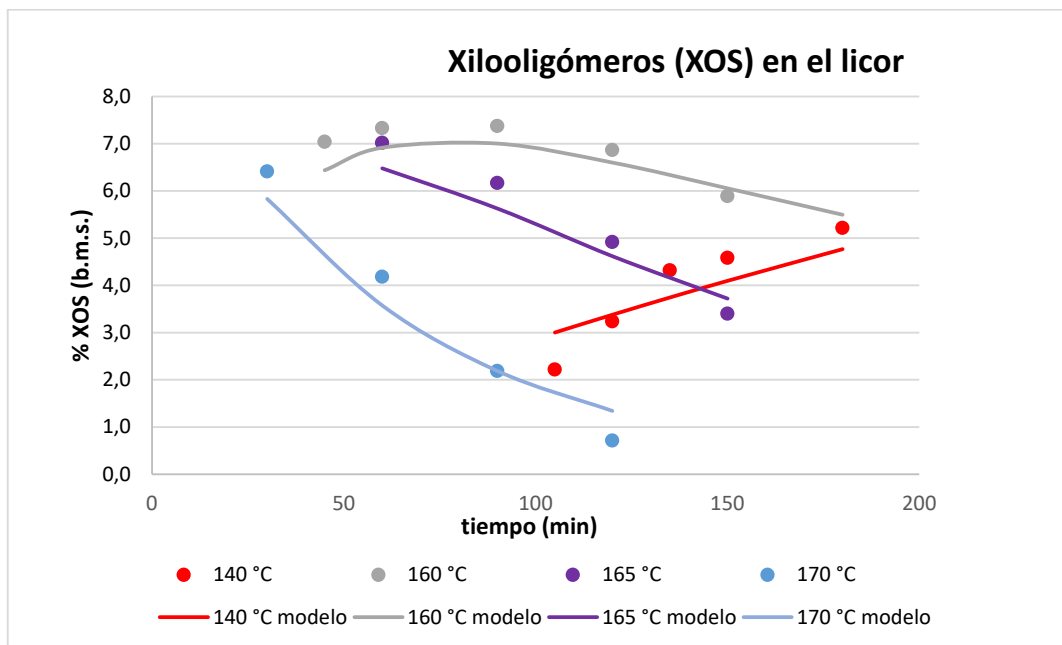


Figura 7-32. Xilooligómeros presentes en el licor extraído luego del tratamiento hidrotérmico. Puntos indican valores experimentales, líneas indican el modelo ajustado.

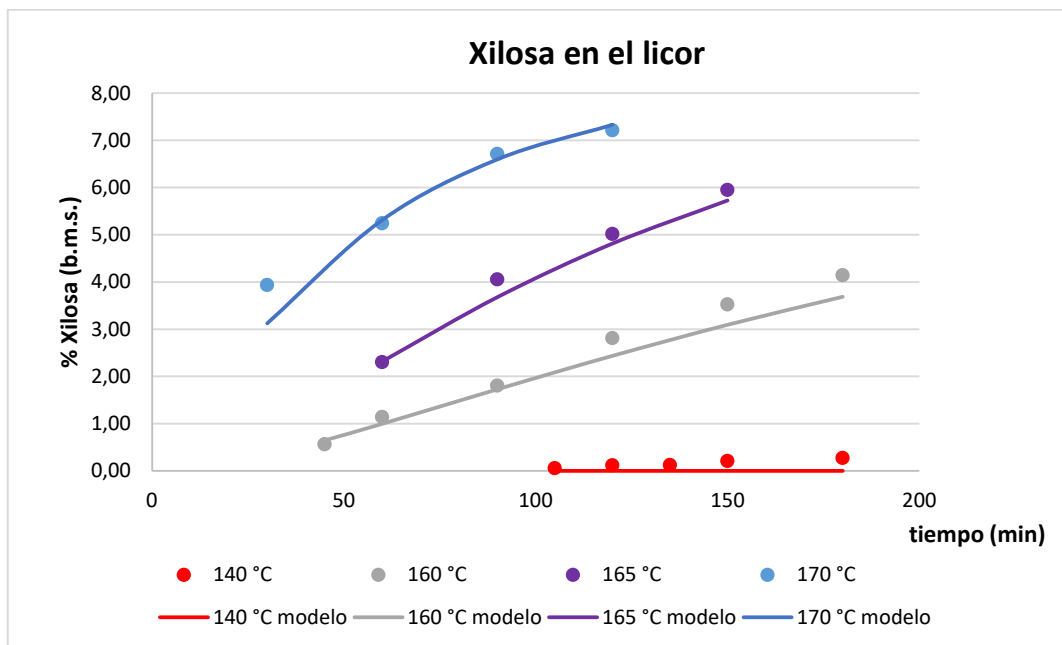


Figura 7-33. Xilosa presente en el licor extraído luego del tratamiento hidrotérmico. Puntos indican valores experimentales, líneas indican el modelo ajustado.

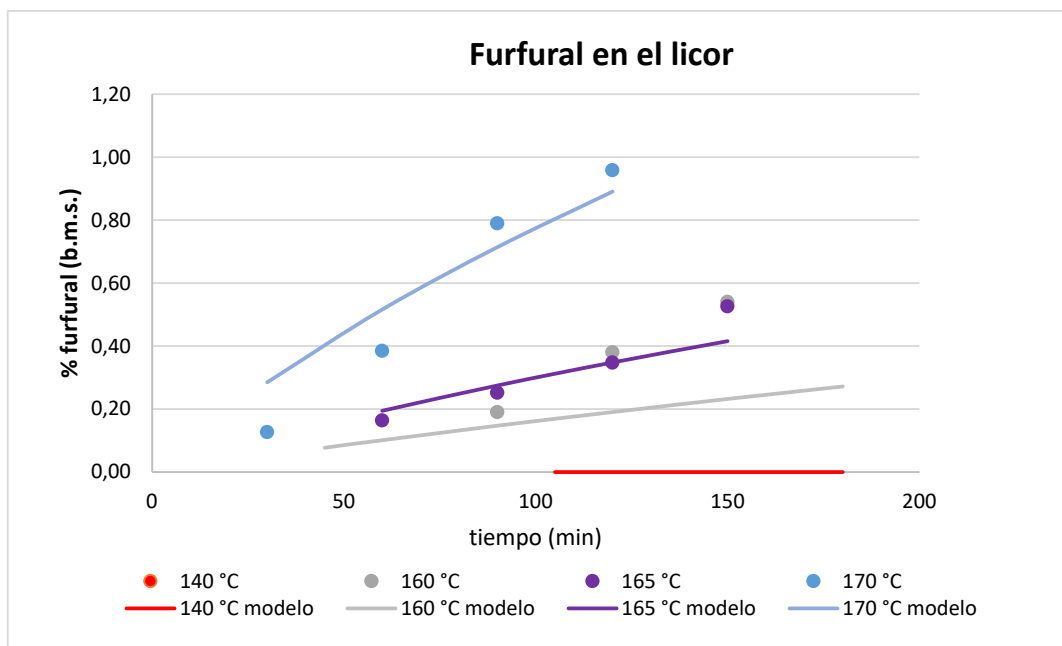


Figura 7-34. Furfural presente en el licor extraído luego del tratamiento hidrotérmico. Puntos indican valores experimentales, líneas indican el modelo ajustado.

Del ajuste del modelo establecido, se puede concluir que la reacción de solubilización de los xilanos para dar directamente xilosa como producto de reacción, con constante cinética k_2 , no ocurre de forma apreciable, ya que la constante k_2 es varios ordenes de magnitud inferior a la constante k_1 de la reacción paralela; por lo que puede descartarse esta reacción.

Al graficar las constantes cinéticas k_1 , k_3 y k_4 en función de la temperatura (se descarta k_2 por lo mencionado previamente), se constata un comportamiento lineal, lo que confirma que las constantes cinéticas cumplen el comportamiento de la ecuación de Arrhenius (Figura 7-35). Los parámetros correspondientes pueden ser obtenidos a partir de la expresión analítica de la ecuación lineal para cada temperatura.

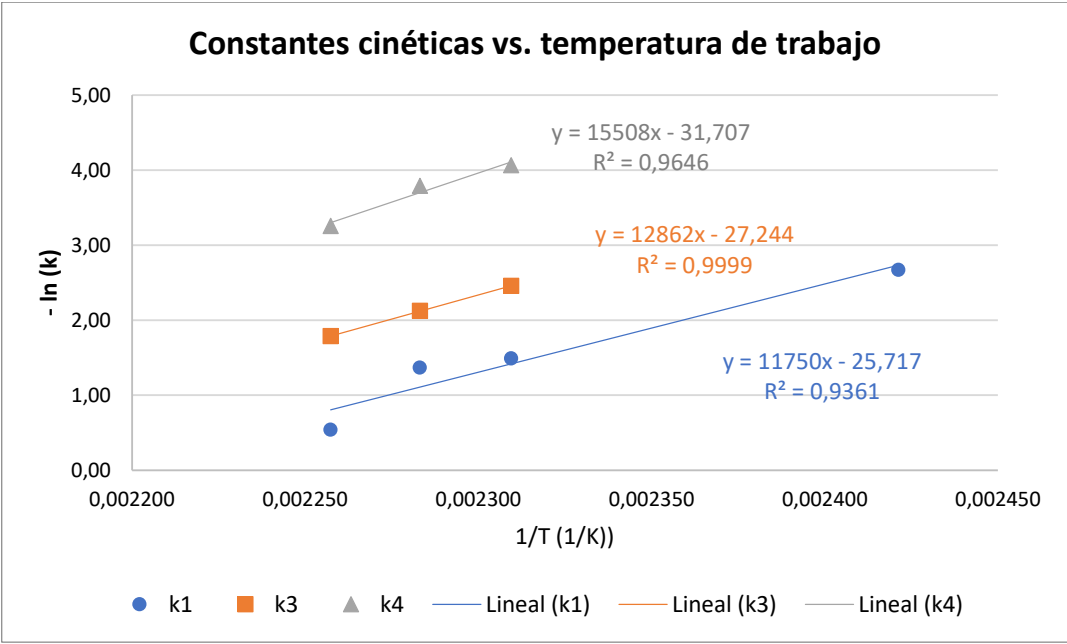


Figura 7-35. Comportamiento tipo Arrhenius de las constantes cinéticas en función de la temperatura.

7.4. Conclusiones sobre los tratamientos hidrotérmicos realizados.

Se ensayaron diversas condiciones de hidrólisis de aserrín de eucalipto con agua. A partir de los resultados obtenidos se concluye que se obtiene una remoción considerable de xilanos a partir de 140 °C de temperatura, encontrándose a esta temperatura fundamentalmente en forma de oligómeros. A 160 °C se lograron concentraciones mayores de compuestos de xilosa en el extracto obtenido, de alrededor de 8 – 12 % (b.m.s.), encontrándose los mismos en forma de oligosacáridos o polímeros para tiempos menores a 90 minutos, mientras que a tiempos superiores comienzan a aumentar sensiblemente la concentración del monómero. A temperatura alta y tiempos de reacción elevados comienza la formación de compuestos de degradación, furfural y en menor extensión HMF, aunque siendo la misma siempre menor a 1% (b.m.s.). Existió también una remoción significativa de grupos acetilos que alcanza el 95% del contenido total de la madera.

De acuerdo con el diseño estadístico realizado (Diseño 1), la mejor condición a los efectos de maximizar el contenido de xilosacáridos en el licor, mientras se minimiza el contenido de xilosa y a absorbancia a 280 nm (indicativo de presencia de compuestos fenólicos) es la condición de 165 °C de temperatura y 60 minutos. En esta condición el licor extraído contiene 9,5 % de xilosacáridos (b.m.s), de los cuales 7,2 % se encuentran en la forma de oligosacáridos.

Referente a los pesos moleculares, en las condiciones de autohidrólisis analizadas, las muestras presentaron un máximo de M_w de aproximadamente 2400 Da ($DP = 18$) y a medida que aumenta la intensidad de la reacción, ya sea por aumento de tiempo a una misma temperatura o de temperatura a un mismo tiempo, las muestras se hidrolizan hasta llegar a pesos moleculares ponderados en la muestra de alrededor de 500 Da (lo que indicaría un grado de polimerización de 3-4). De la distribución de pesos moleculares se observó un alto porcentaje de xilosacáridos con grado de polimerización de 10 o más en las condiciones más suaves analizadas (factor $P = 295$ y menores), mientras que predominó la xilosa o los xilooligosacáridos de $DP > 5$ en las condiciones de *trabajo* realizadas a mayor temperatura y tiempo de extracción (factor $P = 935$ y mayores).

El estudio cinético confirmó las cinéticas de degradación de xilanos de orden 1. Se ensayaron dos modelos de la bibliografía y se logró un buen ajuste de estos. Del modelo 1 que es el modelo más sencillo por considerar, se logró comprobar que las ecuaciones siguen una cinética de orden 1 y que las constantes de velocidad tienen una dependencia con la temperatura del tipo de Arrhenius. El modelo 2 permite un mejor ajuste de los datos experimentales. De los mismos se pudo determinar que la ruta de formación de xilosa a partir de xilanos sin pasar por la formación de xilooligosacáridos se da en muy poca o nula extensión. Se confirmó también que el modelo se puede representar con reacciones de orden 1 y que las constantes involucradas siguen un comportamiento del tipo Arrhenius con la temperatura.

8. PRETRATAMIENTOS: EXPLOSIÓN DE VAPOR

*Este trabajo fue parte del Proyecto de Investigación ANII-FSE_1_2016_1_131996- “Producción y recuperación in situ de biobutanol combustible a partir de eucalipto”. En este documento se analizará el efecto del pretratamiento de explosión de vapor sobre pequeñas fracciones de *Eucalyptus Grandis* fundamentalmente desde el punto de vista de recuperación de hemicelulosas. Cabe señalar que el enfoque del proyecto es en una óptica de biorrefinería, donde se busca la valoración simultánea de todos los componentes principales de la biomasa.*

Del trabajo realizado en este proyecto surgió una publicación en revista referada:

CEBREIROS F.; RISSO F.; CAGNO M.; CABRERA M.N.; ROCHON E.; JAUREGUI G.; BOIX E.; BÖTHIG S.; FERRARI M.D.; LAREO C.; (2020); “Enhanced production of butanol and xylosaccharides from *Eucalyptus grandis* wood using steam explosion in a semi-continuous pre-pilot reactor”; *Fuel*; doi: 10.1016/j.fuel.2020.119818.

8.1. Objetivos específicos

- Analizar el pretratamiento por explosión de vapor de biomasa de *Eucalyptus grandis* para la separación y recuperación de las distintas fracciones de la biomasa lignocelulósica, particularmente las hemicelulosas.
- Estudiar los productos formados en las fases líquidas y sólidas obtenidas en los ensayos de explosión de vapor realizando el pretratamiento a distintas temperaturas.
- Estudiar la formación de mono y oligosacáridos de xilosas, ácidos alifáticos y productos de degradación de los azúcares.
- Evaluar la distribución de pesos moleculares en los licores obtenidos.

8.2. Metodología

8.2.1. Preparación y caracterización de la biomasa utilizada.

Se utilizaron trozas de madera de eucalipto (*Eucalyptus grandis*) con edad de corte de 10 años, de plantaciones con fines pulpables, proporcionadas por el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU). Las mismas fueron chipeadas y molidas. La molienda del material fue establecida por el personal del LATU, a los efectos de que el mismo fuera capaz de poder utilizarse en el equipo de explosión de vapor. El material molido obtenido fue secado en un secador de bandejas, a 38°C hasta 8% de humedad (humedad de equilibrio). Una vez seco se almacenó en recipiente cerrado a temperatura ambiente hasta su utilización. Se determinó la distribución del tamaño de partícula mediante una zaranda automática; la misma se presenta en la Figura 8-1.

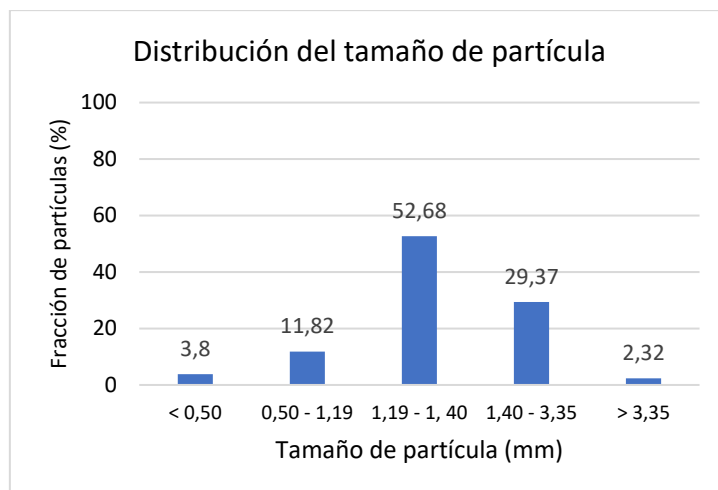


Figura 8-1. Distribución del tamaño de partícula de la biomasa de eucalipto utilizada.

Comparando con la distribución de tamaños de los pinchips industriales, provenientes de plantas de pulpa de celulosa industriales, que se utilizaron en los tratamientos alcalinos, se concluye que la distribución de tamaños es similar.

El material se caracterizó químicamente determinándose para ello el porcentaje de extractivos de acuerdo con la norma TAPPI T-204.0m07, utilizando etanol y agua como solventes, cenizas (T 211 0m-02), carbohidratos y lignina según NREL/TP-510-42618 (2012), midiéndose la lignina soluble en ácido a 205nm de acuerdo con TAPPI-UM250. La Tabla 8-1 muestra las características de la biomasa utilizada.

Tabla 8-1. Composición química de la biomasa utilizada (n=3).

Componente	% $\pm \sigma$
Extractivos (etanol/agua)	3,8 $\pm$ 0,3
Cenizas	0,5 $\pm$ 0,1
Lignina soluble	3,0 $\pm$ 0,1
Lignina insoluble	24,2 $\pm$ 0,9
Lignina total	27,2 $\pm$ 0,9
Xilanos	14,8 $\pm$ 0,5
Glucanos	41,5 $\pm$ 0,3
Arabinanos	0,6 $\pm$ 0,1
Grupos acetilo (como HAc)	3,6 $\pm$ 0,6

8.2.2. Descripción del reactor de explosión de vapor utilizado.

El equipamiento utilizado es un reactor de explosión de vapor semicontinuo, Advance Bio Systems LLC, modelo S1401-D2011, instalado en la Planta Piloto del LATU (Montevideo). Tiene una capacidad aproximada de 10 kg / h, una presión de trabajo máxima de 15 bar, y un tornillo de velocidad variable para regular el tiempo de residencia. La presión de trabajo es regulada con vapor. El control del sistema es por PLC. Posterior al tratamiento, el sólido explotado se colocó en un tejido de 65% poliéster y 35% algodón, 180 g / m² y fue prensado a 200 kg/cm² de presión, de manera de separar la mayor parte del líquido posible. Este procedimiento se repitió 5 veces. La fracción sólida se lavó tres veces con agua a 60 °C en una proporción de 5: 1 (agua: biomasa seca en kg), usando una hormigonera portátil durante 5 minutos. Posterior a cada lavado se prensó a 200 kg/cm² para remover el agua de lavado, la cual fue recogida y analizada.



Figura 8-2. Reactor de explosión de vapor utilizado.

Sobre el sólido remanente se determinó el rendimiento de la extracción y se caracterizó químicamente de acuerdo con la misma metodología que al material de partida. En la fracción líquida (licor), condensado y en las aguas de lavado se determinó pH, sólidos totales (a 105°C), carbohidratos presentes en el extracto como monómeros, carbohidratos totales y productos de degradación. Para la determinación de carbohidratos monoméricos y totales y productos de degradación se utilizó el procedimiento NREL/TP-510-42623, con la salvedad que se utilizó únicamente la columna Aminex 87H para todas las determinaciones.

Para la determinación de los compuestos fenólicos en los licores y aguas de lavado se utilizó el procedimiento de Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965), que permite determinar los mili equivalentes de ácido gálico presentes en los licores. No se utilizó la técnica de Alen-Hartus, utilizada en los otros pretratamientos, ya que en esta sólo es posible determinar el nivel de absorbancia de la solución a 280 nm y como en los ensayos de explosión a vapor hay que considerar no sólo el licor extraído sino también las aguas de lavado, ya que una fracción muy

importante de los compuestos se encuentra presente en estas, no era factible de obtener datos comparables utilizando esta última técnica.

Se determinó la distribución de pesos moleculares de los licores obtenidos mediante la técnica de HPLC-SEC con detector RID, utilizando una columna Bio-Rad Aminex HPX-42A, agua como fase móvil y trabajando a 60 °C de temperatura y un flujo de 0,6 mL/min. Se utilizó en serie el detector UV a 280 nm a los efectos de determinar la presencia de compuestos fenólicos en las muestras. Se realizó una curva de calibración utilizando como estándares: xilosa (Sigma Aldrich) y xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa y xilopentosa (Megazymes, Irlanda) disueltos en agua, en una concentración de 1 g/L. La muestra es tratada de igual forma que en el apartado de "Tratamiento Hidrotérmico".

8.2.3. Tratamientos realizados

Para evaluar este pretratamiento se trabajó tomando como variable la temperatura en el reactor, trabajándose a 180, 190 y 200°C, con un tiempo de reacción fijo de 10 minutos. En este caso es muy difícil aplicar el concepto de factor P, ya que no es posible medir en línea la temperatura del material previo a su entrada al reactor, por ello se trabajó utilizando el concepto de factores de severidad S_0 que se define como el logaritmo del factor de severidad R_0 y cuya definición se indica en la revisión bibliográfica. Los factores de severidad utilizados fueron 3,36; 3,65 y 3,94 respectivamente. El material contenía inicialmente 21% de humedad, lo que implica una relación licor/madera (L/W) inicial de 3,7, aunque este aumenta con el tiempo por la aplicación de vapor. Este valor está condicionado por la forma de funcionamiento del reactor.

Cada tratamiento y los análisis correspondientes se realizaron por duplicado.

8.3. Resultados y discusión

La Figura 8-3 muestra una imagen del material explotado y de los líquidos obtenidos luego de la explosión y lavados y una muestra del condensado recogido durante el tratamiento.

El material a la salida del reactor de explosión se presentó como un sólido mojado (lodo), el cual es necesario prensar para remover el líquido. El sólido disminuye notoriamente su tamaño como consecuencia del tratamiento de explosión. El licor extraído por prensado fue más brillante que el que se obtiene por el tratamiento hidrotérmico sin explosión. Como se observa en la figura, las aguas de lavado son coloreadas.



Figura 8-3. Izquierda: Sólido resultante de la explosión a 180 °C de aserrín de *Eucalyptus Grandis*. Derecha: condensado recogido de salida del condensador, licor extraído de la primera prensada, agua de lavado de los 3 lavados realizados, correspondientes a explosión de vapor a 180 °C.

Por las características de operación del reactor, es muy inexacto calcular el rendimiento de recuperación como se ha hecho en los tratamientos precedentes, considerando el rendimiento del ensayo en función de la masa de entrada al reactor y la masa luego del tratamiento. Por un lado, la masa de entrada al reactor se cuantifica por una celda de carga, que tiene cierta oscilación por las vibraciones propias del sistema de explosión. La masa de salida se determina considerando la masa que se recoge a la salida del reactor. Sin embargo, queda masa adherida en las paredes del reactor que no es factible de recuperar. Como el sistema de operación es semicontinuo, esta masa adherida no es constante en la operación. Para el cálculo de rendimiento se operó el reactor en las mismas condiciones que en las experiencias de trabajo en cuanto a temperaturas utilizadas y tiempo de residencia, pero dejando un tiempo total de corrida mucho mayor, alrededor de 60 minutos en condiciones estacionarias. Luego se limpió el reactor con vapor y se colectan todas las fracciones. Por otro lado, se cuantificó la masa que se cargó a la tolva de ingreso al reactor y la que queda remanente luego de este ensayo en una balanza separada del reactor. Los resultados de los cálculos de rendimiento de explosión en cada temperatura de trabajo, expresados como la recuperación de sólidos luego del tratamiento se indican en la Tabla 8-2.

Tabla 8-2. Recuperación de sólidos luego del tratamiento de explosión por vapor.

Condición de explosión	Recuperación de sólidos (% $\pm \sigma$) (b.m.s.)
180 °C, 10 minutos	79,9 $\pm$ 4,3
190 °C, 10 minutos	72,0 $\pm$ 1,0
200 °C, 10 minutos	73,4 $\pm$ 7,6

La recuperación de sólidos se encuentra en el rango esperado a lo reportado en la bibliografía para madera de latifoliadas (Emmel *et al.*, 2003; Romaní *et al.*, 2013; Chiarello *et al.*, 2016). A modo de ejemplo, Chiarello *et al.* (Chiarello *et al.*, 2016) trabajando con chips de *Eucalyptus urograndis* y con un factor de severidad un poco mayor, de 3,94 (210°C, 5 minutos), reportaron

un rendimiento de recuperación de sólidos del 61,5%. Romaní *et al.* (Romaní *et al.*, 2013) reportaron una recuperación de sólidos entre 57,5 y 76,3%, trabajando con pequeñas astillas (menores a 8mm) de *Eucalyptus globulus* y con severidades S_0 entre 3,52 y 4,83.

Como era de esperar, la recuperación de sólidos a 180 °C fue la más elevada. Sin embargo, contrario a lo esperado, fueron iguales en las corridas a 190 y 200 °C, considerando los errores experimentales. Normalmente, al aumentar la intensidad del tratamiento, la recuperación de sólidos es menor dado que una mayor fracción se solubiliza pasando a la fase líquida. Se entiende que estas desviaciones fueron producto del tipo de reactor utilizado, por lo expuesto acerca de fracciones de biomasa que quedan adheridas en las partes internas del reactor y son difíciles de remover. Esta deposición en las paredes depende de la intensidad del tratamiento, ya que se pudo apreciar visualmente que, a mayor intensidad, el tamaño de partícula del sólido luego de la explosión fue bastante menor. Por otro lado, puede verse que la desviación estándar de las medidas de rendimientos fue importante. La adhesión de fibras a las paredes del ciclón o del reactor de explosión y variaciones en el rendimiento o rendimientos menores a los esperados, ha sido reportado por otros autores (Emmel *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2008; Horn and Eijssink, 2010; Stoffel, 2016).

La caracterización química de los sólidos obtenidos luego de las experiencias se muestra en la Figura 8-4.

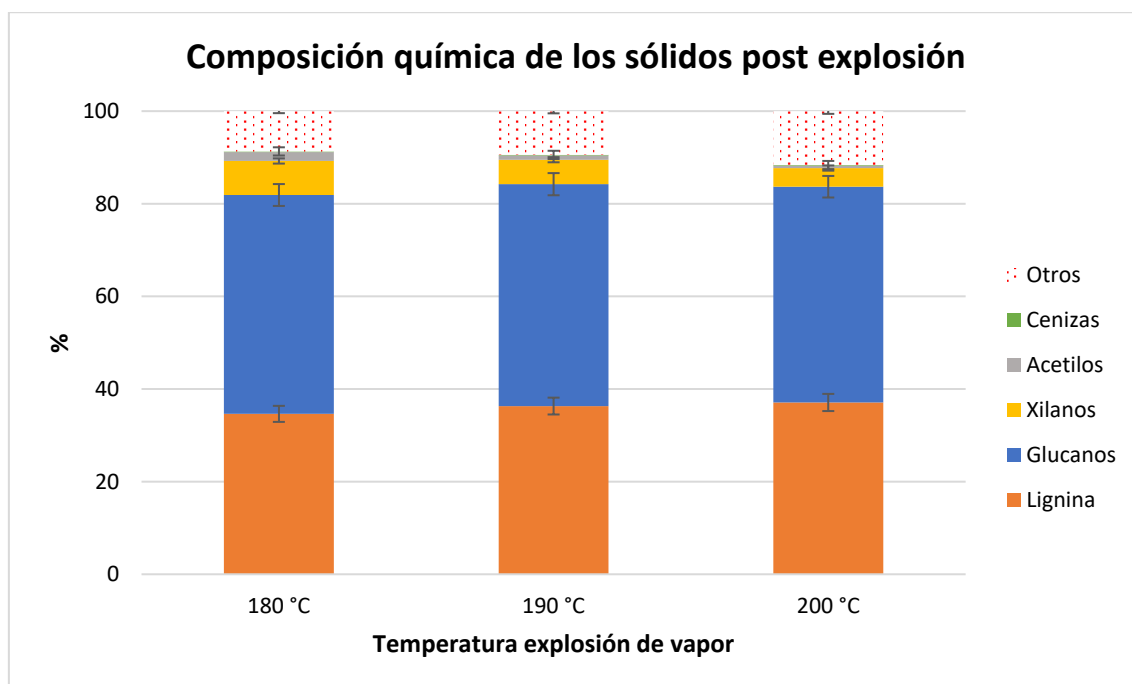


Figura 8-4. Composición de los sólidos obtenidos luego de la explosión por vapor. Los resultados están en base masa seca del material original y llevados a un total de 100 % en cada caso.

El contenido remanente de xilosacáridos en los sólidos luego de la explosión, expresados como xilanos, fue de 5,9, 3,8 y 3,0% b.m.s. para las temperaturas de 180 a 200°C respectivamente, mientras que el de los grupos acetilos fue de 1,5, 0,7 y 0,4%. De esta forma, se logró una

solubilización de las hemicelulosas del 60 a 80 % y de 60 a 90 % de los grupos acetilos, ambos respecto a su contenido original en la madera. En las temperaturas utilizadas, su solubilización aumentó al aumentar la severidad del tratamiento. Estos resultados son similares a los reportados en la bibliografía. En el trabajo de Romaní (Romaní *et al.*, 2013) recientemente citado, se solubiliza entre el 60 y 95 % de los xilanos presentes originalmente en la madera, trabajando hasta un factor de severidad mayor, mientras que Chiarello *et al.* (Chiarello *et al.*, 2016) reportaron una solubilización de xilanos mayor al 98 % y una completa solubilización de los grupos acetilos, trabajando a 210 °C durante 5 minutos. Por otro lado, los resultados obtenidos son un poco mayores a los indicados por Martín-Sampedro (Martín-Sampedro *et al.*, 2012) quienes trabajando con chips de *Eucalyptus globulus* y con factores de severidad entre 3,14 y 3,56 remueven entre 18 y 50 % de los xilanos iniciales de la madera.

La remoción de glucanos del material sólido se encontró entre el 10 y el 18% del contenido original y como era de esperar, aumentó con la temperatura. Esta remoción es no deseada ya que implica una pérdida de glucanos en el material sólido remanente, el que, en el concepto de una biorrefinería integrada, es utilizado para productos de mayor valor agregado: nanocelulosa, bioetanol, biobutanol, etc. Sin embargo, la intensidad del tratamiento permite una mayor apertura de la estructura del material lignocelulósico y por ende una mayor accesibilidad de las enzimas u otros químicos en el proceso subsiguiente.

Referente al contenido de lignina, la solubilización de lignina fue casi nula, entre 0 y 5 %. De acuerdo con la bibliografía, Pereira Ramos (Pereira Ramos, 2003) señaló que en severidades de pretratamiento medias la lignina puede sufrir una hidrólisis parcial; mientras que a temperaturas de pretratamiento extremadamente altas (220 - 240 °C) y tiempos de residencia largos, comienzan a producirse reacciones de condensación que involucran lignina, subproductos derivados de las hemicelulosas y lignina soluble en ácido, lo que lleva a la acumulación de materiales poliméricos insolubles en ácido, con estructuras apenas similares a la lignina original, pero que ocasionan un aumento en la determinación del contenido de lignina insoluble en ácidos. En este caso entendemos que se llegó solamente a una baja hidrólisis parcial de la lignina. Comparando los valores obtenidos con los de la bibliografía, los resultados son similares o un poco más bajo a los reportados. Romaní *et al.* (Romaní *et al.*, 2013) mencionan una solubilización de entre 11 y 29 % de la lignina de *Eucalyptus globulus*, trabajando con factores de severidad entre 3,52 y 4,83. Por su parte, Martín-Sampedro *et al.* (Martín-Sampedro *et al.*, 2012) reportaron una extracción nula de lignina, siendo el contenido de lignina en los materiales explotados, estadísticamente igual que en el material sin explotar.

Referente a la fracción líquida extraída (licor), aguas de lavado y condensado, los valores de pH de los licores obtenidos se encontraron en el rango de 3,19 – 3,31, entre 3,00 y 3,20 para los condensados y entre 3,30 y 4,13 para las aguas de lavado, aumentando en estas últimas de un lavado al siguiente, como es de esperar ya que se consiguen remover los grupos ácidos presentes en el licor. Estos valores de pH son producto de la liberación de grupos acetilos de las cadenas de hemicelulosas, así como de la liberación de ácidos urónicos (no medido) y de la formación de ácidos por degradación de los azúcares, como ocurre con el ácido fórmico.

La Figura 8-5 muestra la proporción de compuestos que se remueve en los licores y en las aguas de lavado, para resaltar la importancia de conservar y analizar las aguas de lavado en este sistema. Dado que la estructura que se obtiene luego de la explosión es un sólido mojado, tipo

lodo, es muy difícil separar totalmente el licor solo por prensado del material. En los lavados con agitación se logra separar los componentes ya disueltos de la matriz lignocelulósica pero que se encuentran ocluidos en el entramado sólido.

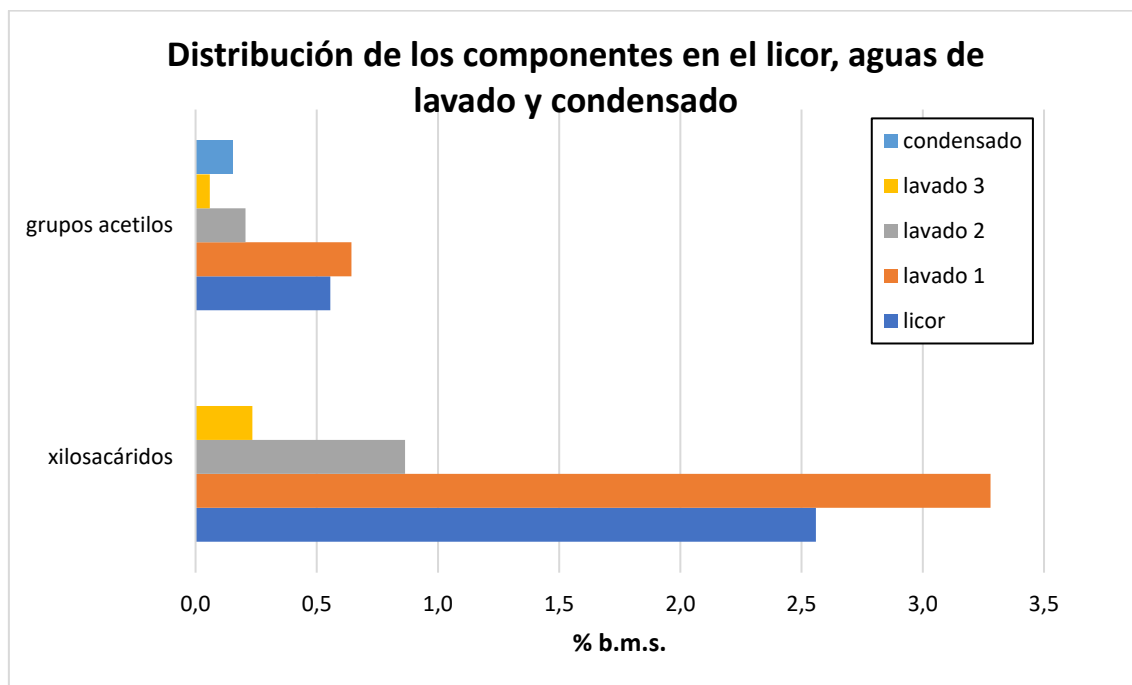


Figura 8-5. Distribución de los xilosacáridos y grupos acetilos en el licor extraído, aguas de lavado y condensado recolectado. El ejemplo corresponde a la condición de tratamiento a 190 °C y 10 minutos.

Dado que el contenido de materiales a recuperar en las aguas de lavado es alto, pero se encuentran en baja concentración por su mayor volumen, es importante tener en cuenta que en una configuración industrial, las aguas de lavado deberían reutilizarse de forma de ir enriqueciéndolas en los compuestos de interés, evitando su mezcla con el licor ya que este se encuentra en concentraciones aptas (entre 30 y 80 g/L) para sus posteriores tratamientos de purificación o de utilización en sistemas biotecnológicos (fermentaciones, etc.).

La Figura 8-6 muestra la recuperación obtenida de los carbohidratos y ácidos alifáticos presentes en los líquidos recolectados (sumando licor extraído, aguas de lavado y condensados) para cada temperatura de trabajo, expresadas proporcionalmente respecto al contenido total de carbohidratos y ácidos alifáticos analizados.

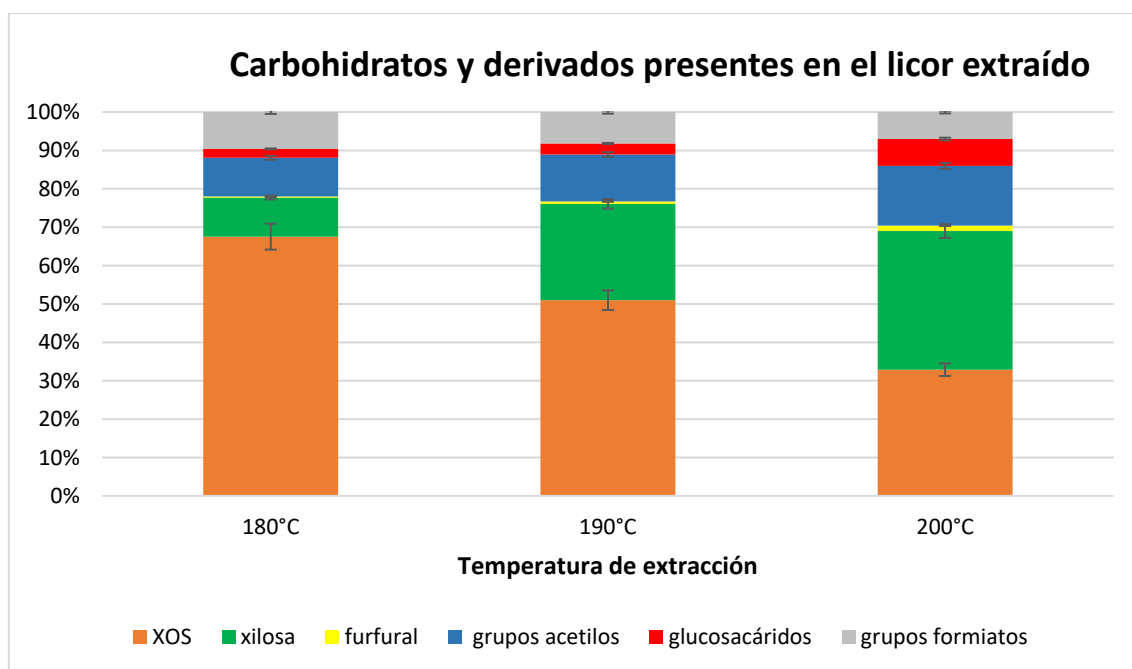


Figura 8-6. Recuperación de polisacáridos y derivados en el licor extraído, aguas de lavado y condensados.

La recuperación de xilosacáridos (considerados en la figura como xilosa y xilooligosacáridos) en el licor y aguas de lavado fue entre y 5,1 % en b.m.s. y 7,5 % b.m.s, presentando un máximo en la temperatura intermedia. A 180 °C, los xilooligosacáridos (XOS) fueron los componentes mayoritarios presentes, aunque ya se constató la presencia de xilosa producto de la hidrólisis de los primeros. A medida que aumentó la temperatura y como es de esperar, se incrementa el contenido de xilosa y furfural en detrimento del contenido de los XOS. También se observaron cantidades menores de glucooligómeros, factiblemente componentes de las hemicelulosas de la biomasa inicial. El contenido de xilosacáridos y grupos acetilos en los líquidos extraídos fueron un poco menores a los obtenidos por Romaní *et al.* (Romaní *et al.*, 2013), quienes reportaron un 11 % de xilosacáridos en el licor trabajando a 180 °C y 10 minutos. Muchos autores reportan únicamente el contenido de los compuestos en el sólido explotado (Horn and Eijsink, 2010; Chiarello *et al.*, 2016) debido a que su interés se centró en la utilización de este material, mientras que otros y factiblemente dada la dificultad mencionada en el cálculo de rendimiento en los reactores de explosión de vapor, reportan los resultados obtenidos en gramos/litro de licor obtenidos (Nunes and Pourquie, 1996; Martín-Sampedro *et al.*, 2012; Bonfiglio *et al.*, 2019), lo cual no permite comparar los valores con los obtenidos en este trabajo.

La distribución de los grupos acetilos libres y unidos a los fragmentos de xilosacáridos se muestra en la Figura 8-7.

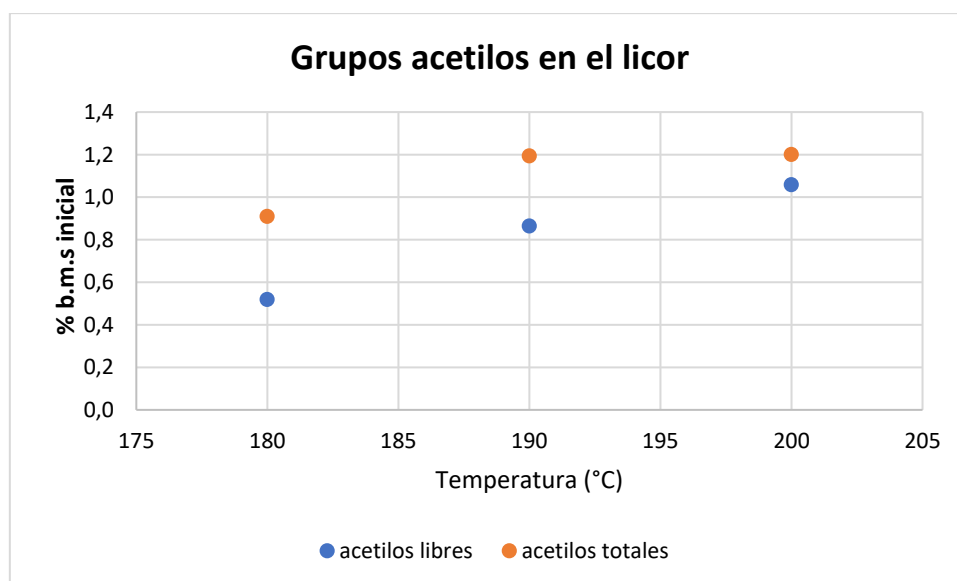


Figura 8-7. Grupos acetilos libres y unidos (totales – libres) a las cadenas de xilosacáridos en solución.

Al igual que en el tratamiento hidrotérmico sin explosión, a medida que aumenta la temperatura, aumenta la remoción de grupos acetilos hasta que se liberan completamente de la matriz lignocelulósica. Una vez en solución, a medida que transcurren las reacciones de hidrólisis de los xilosacáridos y aumenta la cantidad de monómero, se liberan grupos acetilos de las cadenas de los carbohidratos, aumentando la cantidad de grupos acetilos libres en solución.

El contenido de compuestos fenólicos en solución se presenta en la Tabla 8-3. Como fue mencionado, la determinación de fenoles totales mediante la técnica de Folin- Ciocalteu permite cuantificarlos y reportarlos como equivalentes de ácido gálico. En la Tabla se indica la suma de los resultados obtenidos en el licor extraído y las aguas de lavado.

Tabla 8-3. Contenido de fenoles totales en las fracciones líquidas extraídas a las distintas temperaturas.

Temperatura (°C)	Fenoles totales (mg eq. ác. gálico/g biomasa seca inicial)
180	3,9 ± 0,7
190	5,5 ± 1,6
200	4,9 ± 0,3

Al igual que para los xilosacáridos y derivados, así como los grupos acetilos, se observa que la mayor recuperación de fenoles totales se logra a la temperatura intermedia de trabajo (190 °C). Factiblemente, los fenoles removidos provienen de los extractivos de la biomasa (polifenoles) y de lignina fácilmente removible, posiblemente unida a las cadenas de hemicelulosas, ya que, como se vio previamente, el contenido de lignina en la biomasa se mantuvo prácticamente inalterado.

Se analizó la distribución de peso molecular de los licores y del agua del primer lavado de cada tratamiento. La Tabla 8-4 muestra los resultados obtenidos para los licores a las distintas temperaturas de trabajo y muestra también la relación entre xilosa y xilosacáridos, medidos para cada temperatura de trabajo.

Tabla 8-4. Distribución de pesos moleculares en los licores obtenidos a las diferentes temperaturas de explosión.

Temperatura (°C)	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn	Xilosa/xilosacáridos (%)
180	235 ± 7	606 ± 48	2,6 ± 0,1	13 ± 4
190	205 ± 2	387 ± 10	1,9 ± 0,1	33 ± 2
200	162 ± 4	248 ± 16	1,5 ± 0,1	52 ± 4

No se incluyó en la tabla la información de las aguas de lavado, ya que se consideró redundante, porque los valores obtenidos son iguales a los licores correspondientes. De esta forma se entiende que las fracciones que quedan ocluidas en el sólido y se recuperan con los lavados, tienen una distribución de componentes similar al licor obtenida por prensada del lodo resultante de la explosión.

Previo a la discusión de los valores de la tabla, se muestran en la Figura 8-8 los tiempos de retención asignados a los xilooligosacáridos de los que se disponía de estándares. En la Figura 8-9 se muestran los cromatogramas obtenidos y la Distribución de Pesos Moleculares de los compuestos en los licores extraídos a diferentes temperaturas. Los valores de las figuras pueden diferir un poco de los presentados en la tabla, ya que en la figura se muestra una sola réplica mientras que la tabla es promedio de las dos réplicas de explosión realizadas a las temperaturas de trabajo.

Mezcla de estándares de xilooligosacáridos y xilosa

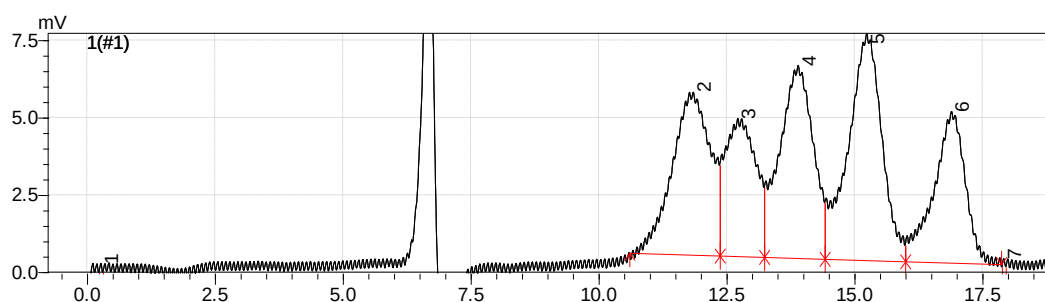
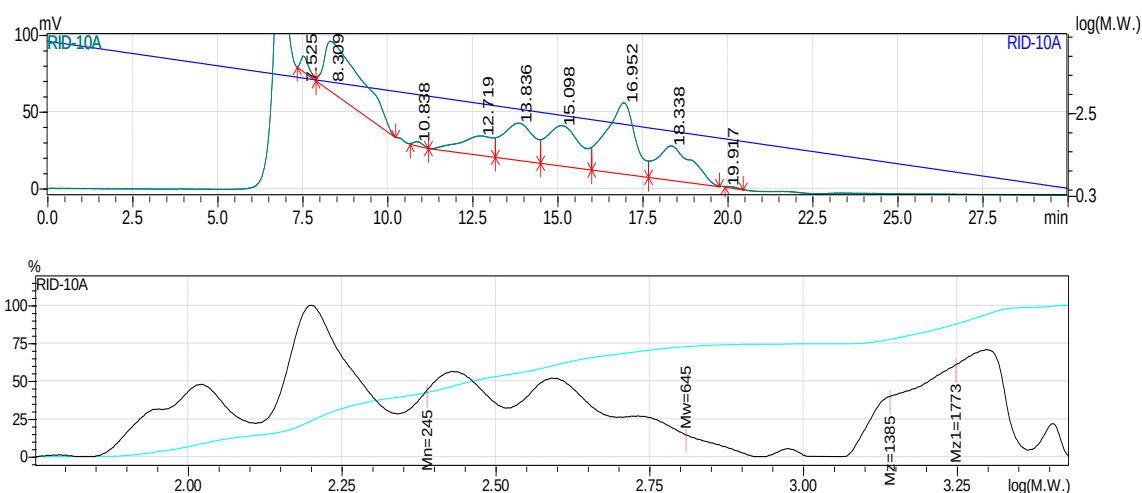
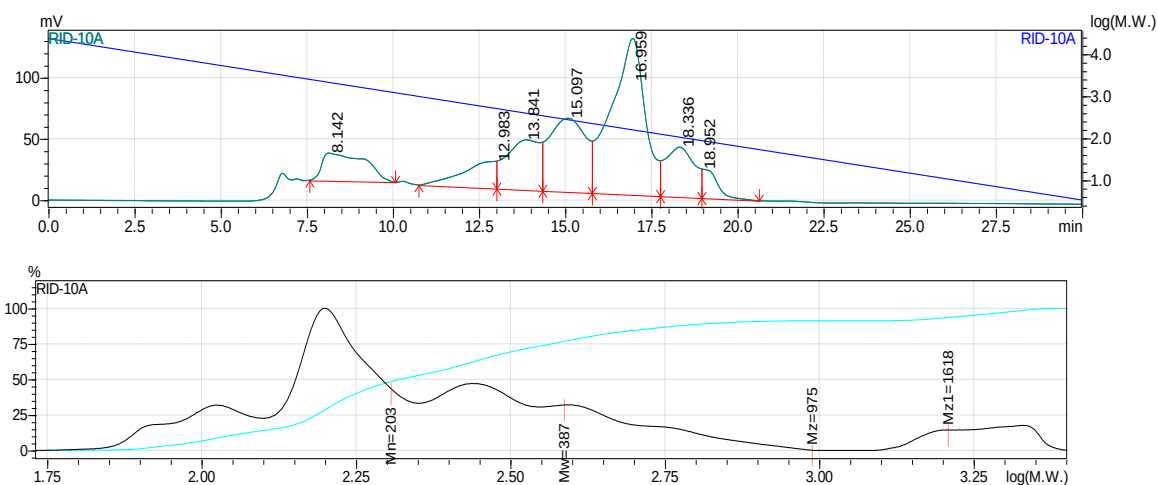


Figura 8-8. Cromatograma de los estándares de xilosa y xilooligosacáridos (concentración 1 g/L) utilizados para realizar la curva de calibración. Picos asignados: 1: tiempo de retención del instrumento, 2: xilopentosa, 3: xilotetraosa, 4: xilotriosa, 5: xilobiosa, 6: xilosa

180 °C



190 °C



200 °C

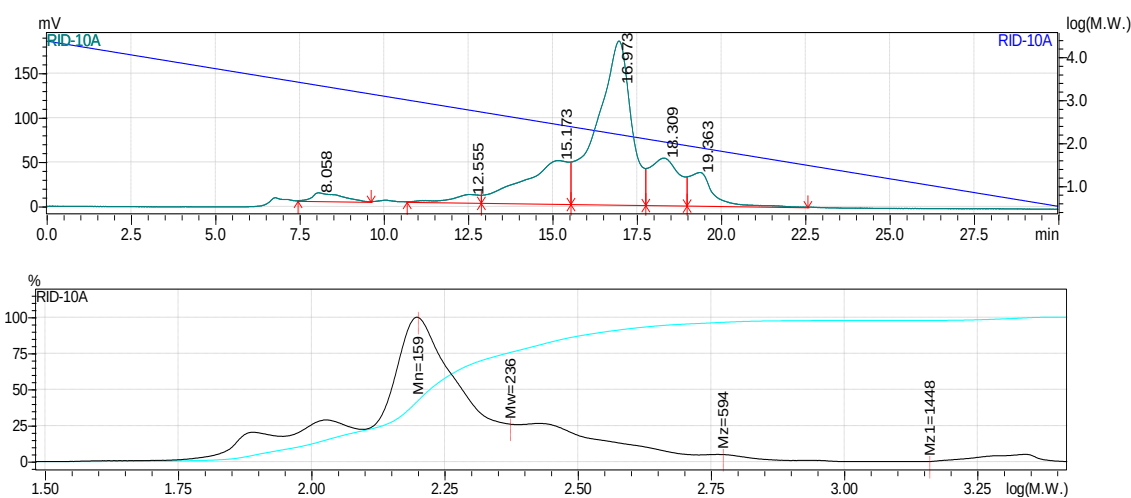


Figura 8-9. Cromatogramas y gráfico de distribución de pesos moleculares para los licores obtenidos a 180, 190 y 200 °C. Como referencia, el tiempo de retención de 16,9 corresponde a la xilosa. Hacia la derecha compuestos de menor peso molecular y hacia la izquierda de mayor peso molecular. El primer pico que se observa en los cromatogramas no se integra ya que corresponde a la señal de tiempo muerto del equipo.

La distribución de pesos moleculares de hemicelulosas obtenidas mostró que el líquido del pretratamiento llevado a cabo a 180°C presentó un peso molecular ponderado de 606 Da y se pudieron ver las señales de varios oligosacáridos a la izquierda de la xilosa, e incluso en la zona cercana al tiempo de retención del instrumento se observaron las señales de compuestos de mayor peso molecular que los determinados con la curva de calibración. A la izquierda del pico de xilosa aparecen dos picos que corresponden a un peso molecular menor, factiblemente ácidos acético y fórmico. Al aumentar la temperatura de pretratamiento, el peso molecular ponderado disminuyó, lo cual era esperable ya que se favorece la cinética de hidrólisis de los oligosacáridos presentes en el líquido y los compuestos se encuentran mayoritariamente como monómeros. Este hecho se comprobó dado que comenzó a prevalecer el pico correspondiente a xilosa. Se encontró que, llevando a cabo el pretratamiento a 200°C, se obtiene en el líquido un peso molecular ponderado de hemicelulosas de 248 Da, donde predominó el pico correspondiente a la xilosa. La polidispersión en este caso resultó ser de 1,53, lo que indicó una distribución de pesos moleculares estrecha. De acuerdo con el análisis de carbohidratos por HPLC hidrolizando y sin hidrolizar de la muestra, se encontró que el 52 % de los xilosacáridos a 200 °C (Tabla 8-4) correspondieron a xilosa. Unificando este resultado con los obtenidos de la distribución de pesos moleculares, se puede indicar que un alto porcentaje del 48% restante corresponde a xilooligosacáridos con un grado de polimerización menor o igual a 4 (considerando la xilosa como unidad de polimerización). En la Figura 8-10 se muestra la distribución relativa de la xilosa y los xilooligosacáridos obtenida a las diferentes temperaturas de trabajo.

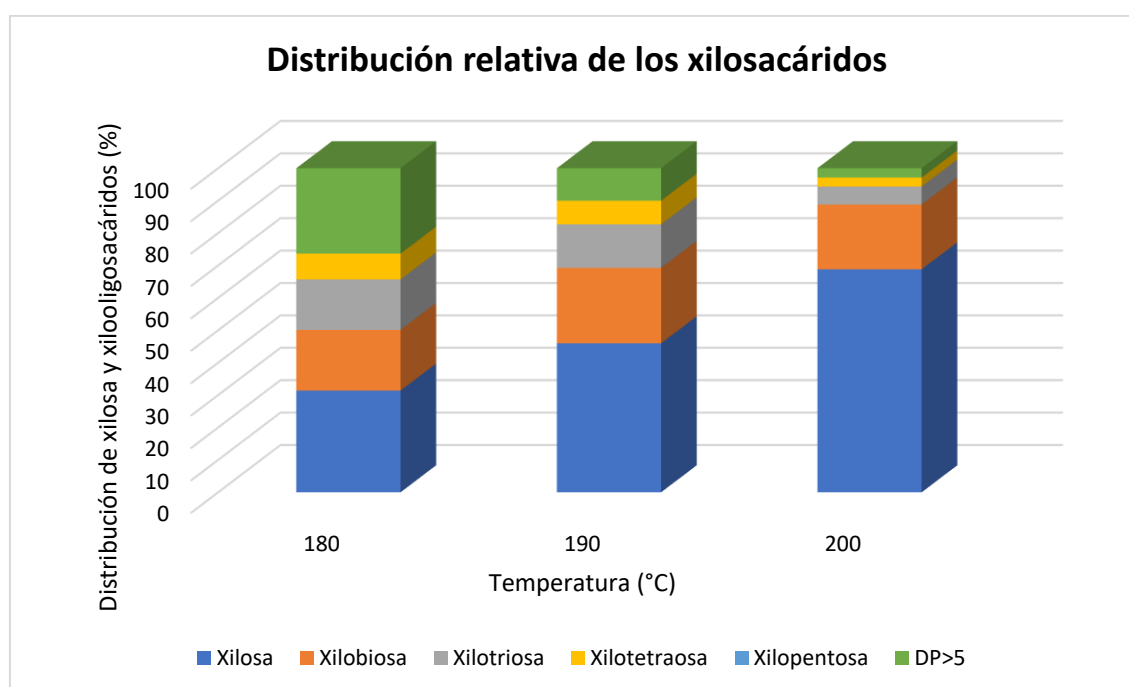


Figura 8-10. Distribución del nivel de polimerización (DP) de los xilosacáridos presentes en los licores obtenidos a las diferentes temperaturas de explosión de vapor.

Por otro lado, haciendo un balance de masa en cada condición de explosión se observó que el mismo no cierra satisfactoriamente, dado que la suma de las fracciones tanto de xilosacáridos y

sus productos de degradación (furfural) como de grupos acetilos en la fracción líquida y la fracción sólida, no reflejan el contenido inicial de estos compuestos en la biomasa original. Este desajuste es más desfavorable a medida que las condiciones de pretratamiento son más exhaustivas. Por un lado, el desajuste en el balance de masa se puede explicar por lo ya mencionado referente a la incertidumbre acerca de la biomasa que efectivamente ingresó al reactor de explosión. Por otro lado, se entiende que hubo una acumulación muy baja de furfural como resultado de los pretratamientos, lo que indicaría que las reacciones hidrolíticas (como la deshidratación) predominaron sobre las reacciones de degradación. Es conocido que la oxidación promueve la degradación de la materia orgánica en dióxido de carbono y agua y también contribuye a la conversión parcial de pentosas en ácidos carboxílicos y otros subproductos (Pereira Ramos, 2003). Asimismo, los compuestos volátiles no pudieron recuperarse cuantitativamente en el condensado, perdiéndose parcialmente (como el furfural y acetilos) o totalmente (en el caso de que se hubiere formado dióxido de carbono) en la atmósfera después de la descompresión. Cabe mencionar que era notorio el olor a furfural en la sala de trabajo mientras se realizaban los tratamientos de explosión de vapor. El hecho de no poder recuperar todos los componentes iniciales en los tratamientos de explosión de vapor ha sido ampliamente reportado en la literatura (Jeoh and Agblevor, 2001; Emmel *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2008; Horn and Eijssink, 2010; Stoffel *et al.*, 2017).

8.4. Conclusiones

El tratamiento por explosión de vapor permitió la separación de hemicelulosas y grupos acetilos de la biomasa, quedando casi la totalidad de la lignina y celulosa en el material sólido resultante.

En el rango de trabajo utilizado, entre 180 y 200 °C y considerando las deficiencias en recolección de todas las fracciones debido a la escala y características del reactor de explosión utilizado, se logra una remoción de entre 60 y 80 % de los xilanos presentes en la biomasa original y entre el 60 y 90 % de los grupos acetilos. Respecto los líquidos colectados (licor, aguas de lavado y condensado) se puede decir que a 190 °C se obtuvo la mayor fracción de xilosacáridos en los líquidos colectados. A 180 °C, la mayor parte de los xilosacáridos se encuentran como oligómeros, aumentando el contenido de xilosa y disminuyendo el de oligómeros a medida que se aumenta la temperatura de trabajo.

El análisis de la distribución de pesos moleculares de los licores resulta clave al momento de elegir el licor a utilizar de acuerdo con el objetivo de producción. En caso de querer producir jarabe de xilosa, posiblemente sea deseable trabajar con el licor obtenido a 200 °C, mientras que, si el objetivo es producir xilooligosacáridos, será más interesante utilizar el licor obtenido a 180 °C. Por otro lado, si se quiere producir compuestos por fermentación, por ejemplo, xilitol, puede ser interesante utilizar el licor obtenido a 200 °C, ya que contiene una amplia cantidad de xilosa o de xilooligómeros de bajo peso molecular que pueden ser rápidamente hidrolizados en el proceso de producción de xilitol, o tal vez convendría trabajar con el licor de 190 °C donde el contenido de xilosa es menor pero el contenido total de xilosacáridos es mayor. Para la producción de furfural (en dos etapas, ya que sino directamente se realizaría un pretratamiento ácido) hay que mejorar fuertemente el sistema de recolección de compuestos volátiles previo a sacar conclusiones de forma de tener certezas si el poco contenido de furfural a las mayores temperaturas de trabajo se debe a reacciones de degradación de éste o a que simplemente no se pudo colectar cuantitativamente.

9. PRETRATAMIENTOS: TRATAMIENTO CON HIDRÓXIDO DE SODIO.

En este apartado se analiza el pretratamiento con hidróxido de sodio (soda) para la extracción de hemicelulosas a partir de residuos industriales de eucalipto.

Este trabajo consiste en establecer las condiciones (temperatura, tiempo y carga de álcali) para la extracción de las hemicelulosas con hidróxido de sodio en el marco de una biorrefinería integrada, donde se conserva la fracción sólida luego de la extracción para la producción de compuestos de valor agregado a partir de los glucanos y lignina, mientras que el licor extraído es utilizado para valorizar las hemicelulosas.

9.1. Objetivos específicos

- Analizar cómo afectan las variables temperatura de extracción, carga de álcali y tiempo al rendimiento de la extracción.
- Analizar los productos formados en los licores extraídos en las diferentes condiciones.
- Evaluar la distribución de pesos moleculares de las hemicelulosas obtenidas.

9.2. Metodología

9.2.1. Materia prima utilizada

Se utilizó biomasa proveniente de una planta de celulosa que procesa eucalipto. La planta procesa fundamentalmente *Eucalyptus grandis*, y fracciones menores de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus Dunnii*, entre otros, por ello el residuo es una mezcla de estas especies, con un contenido importante de *Eucalyptus grandis*. En las plantas de celulosa, durante el astillado de los rolos de madera se generan astillas (chips). Para ser utilizadas en la producción de celulosa, estos chips deben tener un tamaño determinado, lo suficientemente pequeños para que permita que ocurran las reacciones de deslignificación en todo su volumen y lo suficientemente grandes como para que no generen problemas mecánicos de taponamientos ni demasiado corte de las cadenas de celulosa. De esta forma, luego de que la madera es chipeada, pasa por un tamiz donde se separan distintas fracciones. A la fracción que atraviesa el tamiz por su tamaño menor a la fracción de chips aceptados, se le denomina pinchips. A los efectos de este trabajo, los pinchips se secaron a 38°C en un secador piloto de bandejas hasta aproximadamente 8% de humedad (humedad de equilibrio). El residuo se tamizó de forma de trabajar con la fracción de pinchips comprendidas entre 0,5 y 3,36 mm y se almacenó en un lugar seco. En la Figura 9-1 se muestra una imagen del material utilizado y la distribución del tamaño de partículas de la muestra.

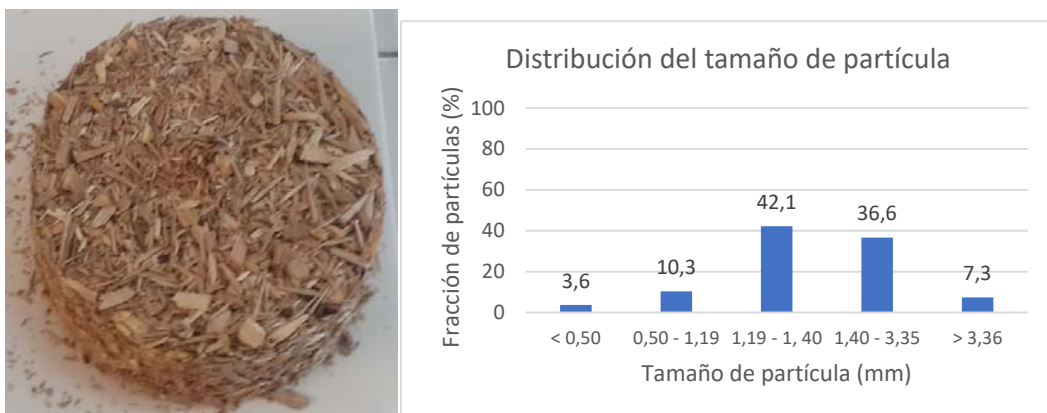


Figura 9-1. Pinchips de eucalipto, utilizados como material de partida.

Los pinchips se caracterizaron fisicoquímicamente de acuerdo con la metodología indicada en el capítulo de “Tratamiento hidrotérmico”, presentando los resultados que se indican en la Tabla 9-1.

Tabla 9-1. Composición de los pinchips de eucalipto utilizados, n = 4

Componente	Prom $\pm \sigma$
Extractivos^a	3,4 $\pm$ 0,2
Cenizas	0,7 $\pm$ 0,1
Lignina soluble	2,8 $\pm$ 0,1
Lignina insoluble	21,9 $\pm$ 0,9
Lignina Total	24,7 $\pm$ 0,9
Xilanos	14,5 $\pm$ 0,4
Glucanos	41,9 $\pm$ 0,6
Arabinanos	1,6 $\pm$ 0,3
Grupos acetilo (como HAC)	3,1 $\pm$ 0,1
^a EtOH/Agua	

9.2.2. Extracciones realizadas

Se utilizó el reactor de aceite de silicona, que cuenta con un eje rotatorio para la inserción de 8 cápsulas idénticas de 300 ml de capacidad total. El mismo fue descrito en el Capítulo de “Tratamiento hidrotérmico”.

Se aplicó un diseño experimental factorial 3³, tomando como parámetros la temperatura máxima de extracción, el tiempo a esa temperatura y la carga de álcali utilizada (expresada en porcentaje de soda sobre masa de madera utilizada). Los valores de los parámetros se presentan en la Tabla 9-2 y se muestran en la Figura 9-2. La relación: masa de líquido total / masa de

pinchips (L/W) utilizada fue constante y se estableció en 5, por experiencia en trabajos previos. La carga de soda se calculó según se describe en la Ecuación 9-1.

$$\% \text{ Carga de NaOH} = \left(\frac{g \text{ de NaOH}}{g \text{ de aserrín seco}} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 9-1}$$

Tabla 9-2. Factores y niveles experimentales del diseño experimental realizado.

Nombre	Unidades	Niveles	Bajo	Medio	Alto
A:Temperatura	°C	-1, 0, +1	105,0	130,0	155,0
B:tiempo	min	-1, 0, +1	45,0	90,0	135,0
C:Conc. NaOH	%	-1, 0, +1	6,7	11,7	16,7

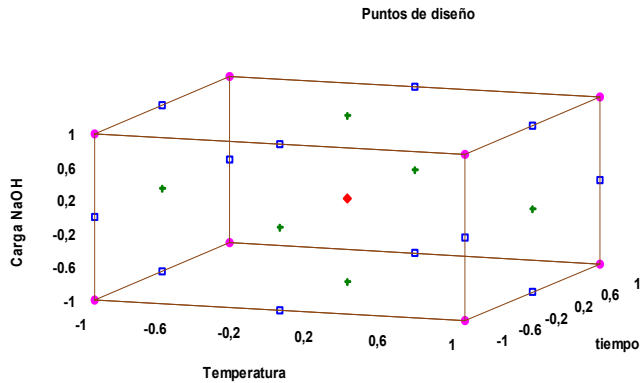


Figura 9-2. Puntos del diseño factorial 3³, con temperatura, carga de soda y tiempo como variables.

Finalizada la extracción, el material fue drenado y centrifugado a 1000 rpm, logrando separar la fracción sólida de la líquida. Se lavó exhaustivamente con agua desionizada. En el sólido se determinó el rendimiento de la extracción tomando en cuenta la masa inicial seca de partida y la masa seca obtenida posteriormente a la extracción, y se conservó para valorizar los glucanos (y eventualmente la lignina) del mismo. Sobre la fracción líquida se determinó: pH, sólidos totales (a 105°C), absorbancia a 280 nm, carbohidratos totales (derivados de xilosa, glucosa, arabinosa), ácidos orgánicos (acético y fórmico) y productos de degradación (furfural e hidroximetilfurfural (HMF)). Para la determinación de carbohidratos totales, ácidos orgánicos y productos de degradación se utilizó el procedimiento NREL/TP-510-42623, con la salvedad que se utilizó únicamente la columna Aminex 87H para todas las determinaciones. La expresión “b.m.s” refiere a que los resultados se expresan en porcentaje de la masa de madera de partida en base seca en estufa a 105°C.

Se evaluó el diseño experimental en términos de mayor rendimiento de extracción, mayor cantidad de xilosacáridos presentes en el licor y menor absorbancia a 280 nm de éste (se toma la absorbancia a 280 nm como medida relativa del contenido de lignina en el líquido).

Se estudió la distribución de pesos moleculares de las hemicelulosas presentes en las muestras que a priori presentan mejores características en términos de contenido de xilosacáridos y lignina. El mismo se determinó directamente sobre el licor obtenido y sobre el precipitado obtenido al utilizar etanol como agente precipitante. En el primer caso se centrifugó la muestra por 30 minutos a 3000g y se separa el sólido. El sobrenadante se filtró por 0,45 μm y 0,22 μm y se preparan los viales para su determinación. Por otro lado, para analizar el peso molecular del material factible de precipitar con etanol, se ajustó el pH del licor a 9, a los efectos de precipitar la lignina, se centrifugó durante 20 minutos a 3000g y sobre el sobrenadante se agregó 1 volumen de etanol (la discusión sobre la determinación de estas condiciones se presenta en el capítulo “Precipitación con solventes tratamientos alcalinos”). Se dejó reposar a 4 °C durante 48 horas y se centrifugó nuevamente a 3000g durante 30 minutos. El precipitado obtenido, rico en xilanos, se disolvió en NaOH 0,1 M y sobre esa solución se determinó la distribución de pesos moleculares. Para ello se aplicó la técnica de HPLC-SEC con detector RID, utilizando 5 columnas en serie de la marca PSS de acuerdo con la recomendación del proveedor: 3 columnas MCX 1000Å y 2 columnas MCX 100Å. Se utilizó una solución buffer a pH 12 (6,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 3,2 g de NaOH por litro de agua y eventual ajuste del pH a 12 con NaOH) como fase móvil y se trabajó a 35 °C de temperatura y un flujo de 0,6 mL/min. Se utilizó en serie el detector UV a 280 nm a los efectos de determinar la presencia de compuestos fenólicos en las muestras. Se realizó una curva de calibración utilizando como estándares la sal sódica de sulfato de poliestireno de la marca PSS que corresponden a los pesos moleculares: 4230, 7930, 10600, 14900, 20700 y 29100 Da.

Posterior a la evaluación de los datos obtenidos en el diseño experimental realizado, y en base a la bibliografía y los resultados obtenidos, se resolvió realizar otra serie de extracciones a menor temperatura y altas cargas de soda. Para ello se seleccionó la temperatura de 90 °C y se trabajó a 240 y 360 minutos con dos cargas de álcali (16,7 y 22,7 % NaOH/b.m.s). Todas las condiciones se aplicaron por duplicado. Finalizada la extracción, el material fue drenado y centrifugado a 1000 rpm, logrando separar la fracción sólida de la líquida. Al sólido remanente se le agregó agua desionizada en una relación 10 a 1 y se dejó drenar durante 24 horas. El material fue nuevamente centrifugado y el agua de lavado se guardó para su análisis. Posteriormente el sólido fue lavado exhaustivamente con agua desionizada. Los mismos análisis descriptos para el diseño anterior se realizaron sobre los licores extraídos. En las aguas de lavado se cuantificaron sólidos totales y carbohidratos totales (derivados de xilosa, glucosa, arabinosa), ácidos orgánicos (acético y fórmico) y productos de degradación (furfural e hidroximetilfurfural (HMF)), con las técnicas descriptas anteriormente.

Sobre los ensayos que presentaron los resultados más prometedores en términos de extracción de xilosacáridos se analizó el sólido remanente luego de la extracción de acuerdo al procedimiento NREL/TP-510-42618.

9.2.1. Análisis estadístico

La evaluación estadística de los resultados obtenidos se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion XVI. Se estimaron las superficies de respuesta, se realizaron análisis de la varianza, se obtuvieron modelos de regresión y se optimizaron mediante la función “deseabilidad”. Todos los análisis se realizaron a un nivel de significación del 95%.

9.3. Resultados y discusión

9.3.1. Diseño factorial 3³

Se utiliza la definición de rendimiento que se presentó en el capítulo “Tratamiento hidrotérmico”, la que indica qué porcentaje de la biomasa inicial se encuentra en el líquido extraído. La Figura 9-3 muestra el rendimiento obtenido en las diferentes condiciones evaluadas.

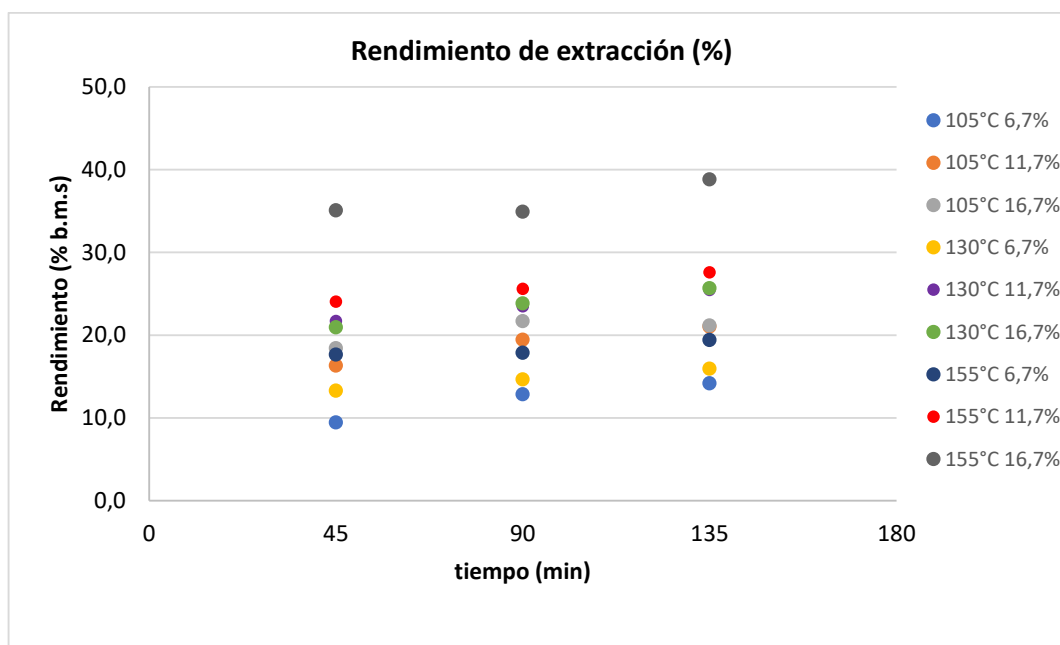


Figura 9-3. Porcentaje de biomasa inicial presente en el líquido extraído.



Figura 9-4. Licor extraído y pinchips luego de diferentes condiciones de extracción: a la izquierda, 105 °C, 45 minutos y 16,7% de carga de NaOH; a la derecha 155 °C, 135 minutos y 6,7 % de carga de NaOH.

Cómo es de esperar, para una misma carga de soda, el rendimiento aumenta con la temperatura, y a una misma temperatura, aumenta con la carga de álcali. Lo mismo sucede con la variable tiempo, pero en este caso influye de manera menos significativa.

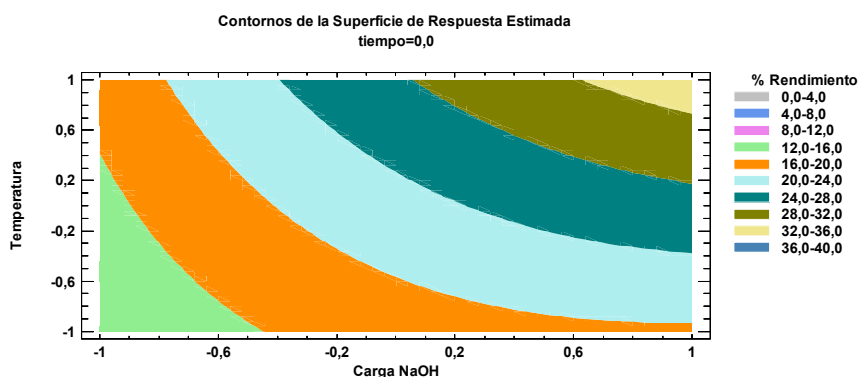
Del tratamiento estadístico realizado se observa que los efectos que tienen incidencia sobre el rendimiento son A: Carga de soda (p-valor: 0,0000), B: temperatura (p-valor: 0,0000), C: tiempo (p-valor: 0,0008) y las interacciones AA y AB (p-valor: 0,0299 y 0,0003 respectivamente).

El modelo ajustado se expresa por la Ecuación 9-2

$$\% \text{ Rendimiento} = 22,72 + 5,86 * \text{Carga NaOH} + 4,81 * \text{Temperatura} + 1,81 * \text{tiempo} - 1,86 * \text{Carga NaOH}^2 + 2,42 * \text{Carga NaOH} * \text{Temperatura} \quad \text{Ecuación 9-2}$$

El estadístico R^2 indica que el modelo, así ajustado, explica 93,7 % de la variabilidad en % rendimiento. La Figura 9-5 muestra la superficie de respuesta estimada.

a.



b.

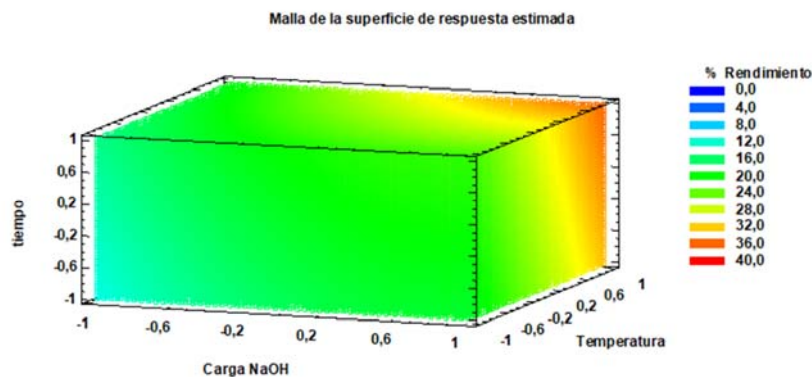


Figura 9-5. a. Contornos y b. Superficie de respuesta del rendimiento de la extracción.

Este comportamiento en el rendimiento está dado porque, como es conocido, en el tratamiento alcalino ocurren reacciones de degradación de polisacáridos que incluyen la disolución de

polisacáridos no degradados y degradados, la desacetilación de grupos acetilo en hemicelulosas, reacción de “peeling” de diferentes monosacáridos de unidades finales en las cadenas de polisacáridos con formación simultánea de varios hidroxiaácidos, y la hidrólisis alcalina de enlaces glicosídicos en cadenas de polisacáridos, seguida de la formación de nuevas unidades finales de grupos funcionales álcali-lábiles (grupos terminales reductores) susceptibles de la reacción secundaria de peeling. Además, también tiene lugar la disolución y eventual degradación de la lignina de la materia prima, así como la eliminación intensiva de extractivos con la saponificación simultánea de ésteres (Sjöström, 1993; Lehto and Alén, 2013). A las temperaturas más bajas de trabajo, las reacciones de degradación de la lignina así como las reacciones de “peeling” de las cadenas de celulosa no se dan o se dan en baja extensión, aunque son importantes a la mayor temperatura de trabajo (Sjöström, 1993).

El contenido de xilosacáridos en el licor extraído puede verse en la Figura 9-6.

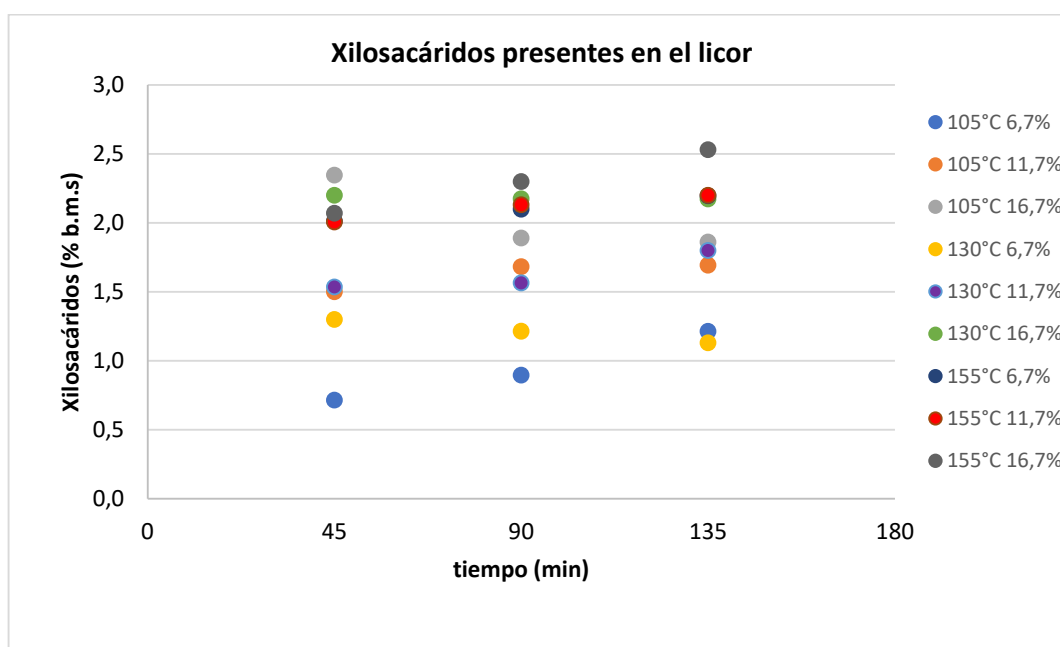


Figura 9-6. Xilosacáridos presentes en el licor en las distintas condiciones de extracción ensayadas.

Como se observa, la mayor concentración de xilosacáridos se obtiene aplicando las condiciones más fuertes ensayadas, (1,1,1) en variables codificadas, lo que corresponde a 155°C, 16,7 %NaOH/b.m.s. y 135 minutos de reacción a esa temperatura. En este caso, se logra extraer 2,5 % xilosacáridos/ b.m.s., lo cual corresponde al 17 % de los xilanos presentes en la materia prima. En las condiciones ensayadas donde se logra la menor extracción, (-1,-1,-1) en variables codificadas, 105 °C, 6,7 % NaOH/b.m.s. y 45 minutos, se logra remover el 4,8 % de los xilanos presentes en los pinchips de eucalipto utilizados.

De acuerdo al análisis de varianza para el contenido de xilosacáridos en el licor, se observa que 3 efectos tienen un valor de p menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%. Estos efectos son A: Carga de NaOH (p-valor=0,0000), B: Temperatura (p-valor=0,0000) y la interacción AB (p-valor= 0,0092).

El modelo ajustado se expresa por la Ecuación 9-3.

$$\% \text{ xilosacáridos (b.m.s)} = 1,82 + 0,42 * \text{Carga NaOH} + 0,36 * \text{Temperatura} - 0,17 * \text{Carga NaOH} * \text{Temperatura}$$

Ecuación 9-3

El estadístico R^2 indica que el modelo, así ajustado, explica el 84,9 % de la variabilidad en %xilosacáridos.

De acuerdo con la gráfica de interacción de las variables (no se muestra), el porcentaje de carga de soda es un factor muy importante a temperatura baja, perdiendo importancia con el aumento de temperatura.

La Figura 9-7 muestra las curvas de nivel de la superficie de respuesta estimada.

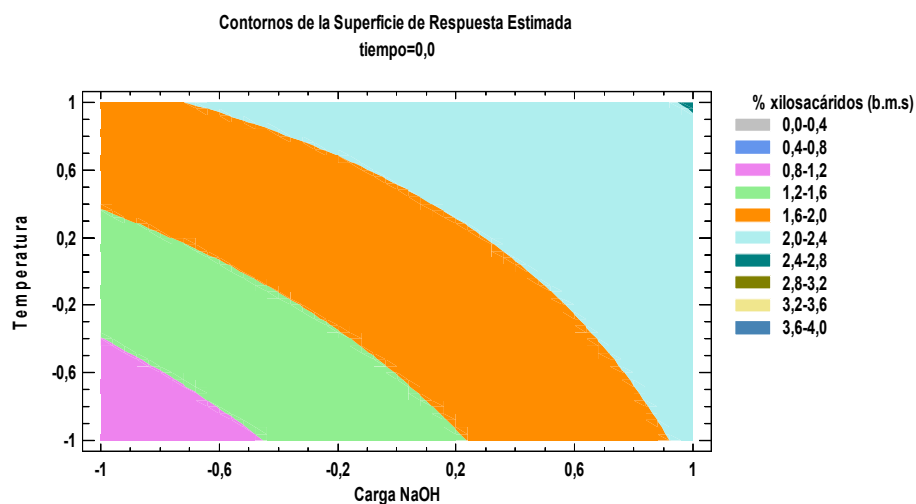


Figura 9-7. Curvas de nivel de la superficie de respuesta estimada para la variable xilosacáridos presentes en el licor.

En la Figura 9-7 se ve claramente que el efecto de la temperatura no es tan importante para la extracción de xilosacáridos a altas cargas, hecho que si ocurre a cargas bajas.

La Figura 9-8 indica la relación entre los xilosacáridos presentes en el licor y los otros carbohidratos cuantificados (compuestos de glucosa y arabinosa) en las distintas condiciones de extracción, para un tiempo de 90 minutos.

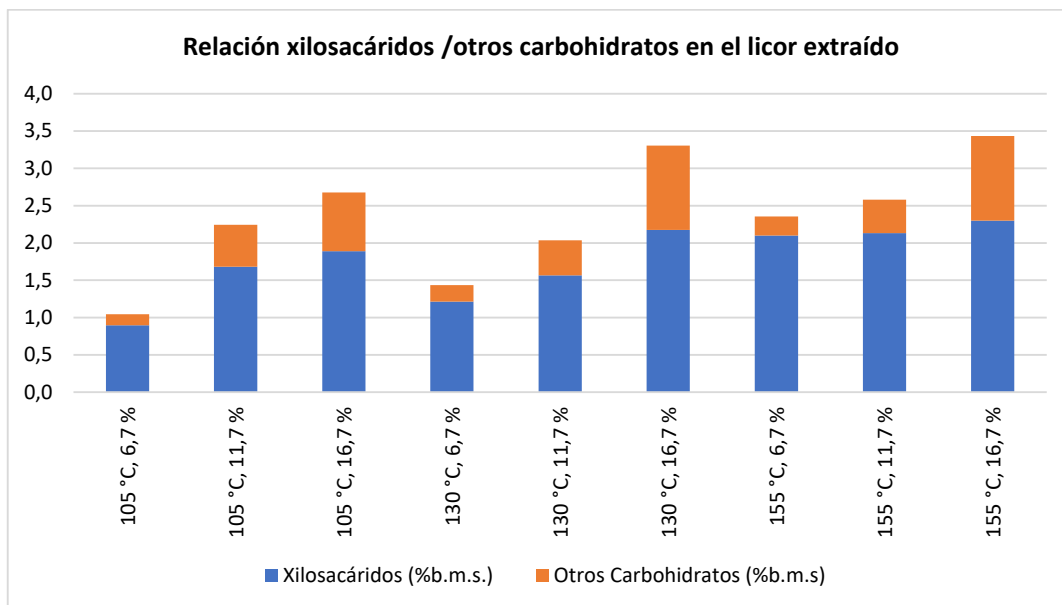


Figura 9-8. Relación de carbohidratos totales frente a los xilosacáridos presentes en el licor para un tiempo de 90 minutos.

Al igual que los xilosacáridos, los otros carbohidratos aumentan su concentración al aumentar la temperatura para una misma carga y al aumentar la carga para una misma temperatura. Sin embargo, la relación xilosacáridos/carbohidratos disminuye a cargas altas, productos de una mayor concentración de glucosacáridos en el licor, factiblemente provenientes de la celulosa de la madera, ya que las reacciones de “peeling alcalino” son más importantes.

La Figura 9-9 muestra la absorbancia del licor a 280 nm como medida indirecta del contenido de lignina en el licor.

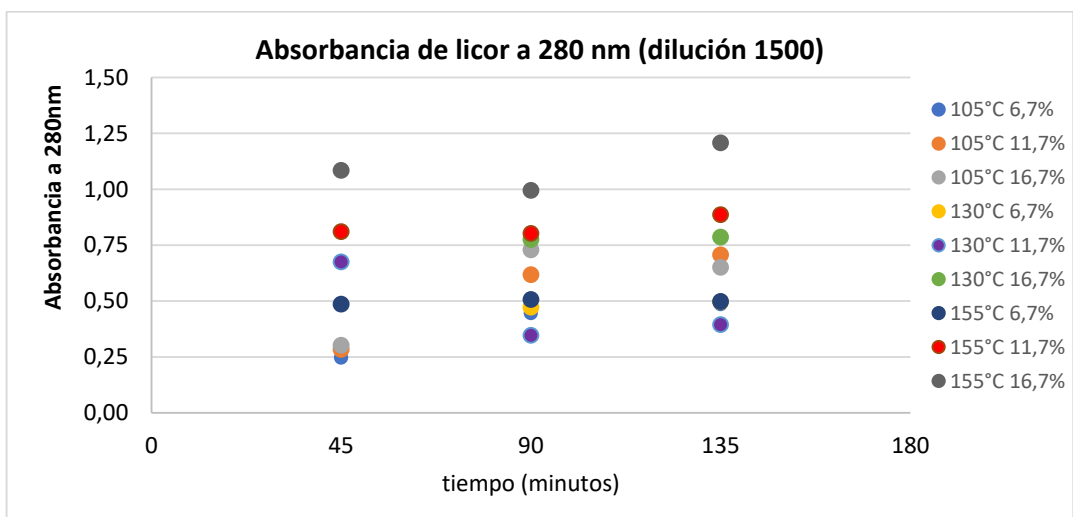


Figura 9-9. Absorbancia a 280nm de los licores extraídos (dilución 1500)

Con alta temperatura y carga de soda se obtienen los mayores valores de absorbancia del licor; sin embargo, a baja temperatura y alta carga de soda los valores de absorbancia son

significativamente menores. Este comportamiento es esperable, ya que a temperaturas menores a 130 °C disminuyen las reacciones de deslignificación (Sjöström, 1993; Alén, 2000).

Del ANOVA se observa que 3 efectos tienen un valor-p menor que 0,05. Estos son A: Carga de NaOH (p-valor=0,0001), B: Temperatura (p-valor=0,0001) y la interacción AB (p-valor= 0,0159). Como puede observarse, son los mismos efectos que tienen incidencia en la concentración de xilosacáridos en el licor.

De acuerdo con la gráfica de interacción de las variables (no se muestra), el % de carga de soda es un factor muy importante en la absorbancia a 280 nm cuando se trabaja a temperatura alta, incidiendo de menor forma a temperaturas bajas.

La Ecuación 9-4 muestra el ajuste del modelo.

$$\text{Absorbancia 280nm} = 0,628 + 0,156 * \text{Temperatura} + 0,181 * \text{Carga NaOH} + 0,108 * \text{Temperatura} * \text{Carga NaOH} \quad \text{Ecuación 9-4}$$

El estadístico R^2 indica que el modelo, así ajustado, explica 72,1% de la variabilidad en Absorbancia 280nm.

La Figura 9-10 muestra las curvas de nivel de la superficie de respuesta estimada.

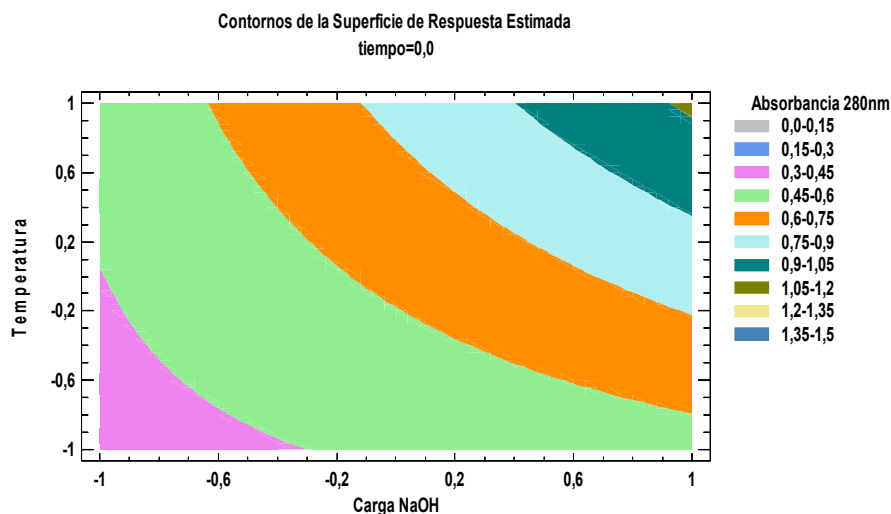


Figura 9-10. Curvas de nivel de la superficie de respuesta estimada para la variable absorbancia a 280 nm del licor extraído.

Como puede observarse, a alta temperatura y baja carga de soda se obtienen niveles de absorbancia a 280 nm similares a los obtenidos a baja temperatura y alta carga de soda. Como se espera, los valores de absorbancia aumentan al aumentar ambas variables.

Realizando una optimización de múltiples respuestas del diseño, maximizando la concentración de xilosacáridos en el licor y minimizando absorbancia a 280 nm se obtienen los resultados mostrados en la Figura 9-11.

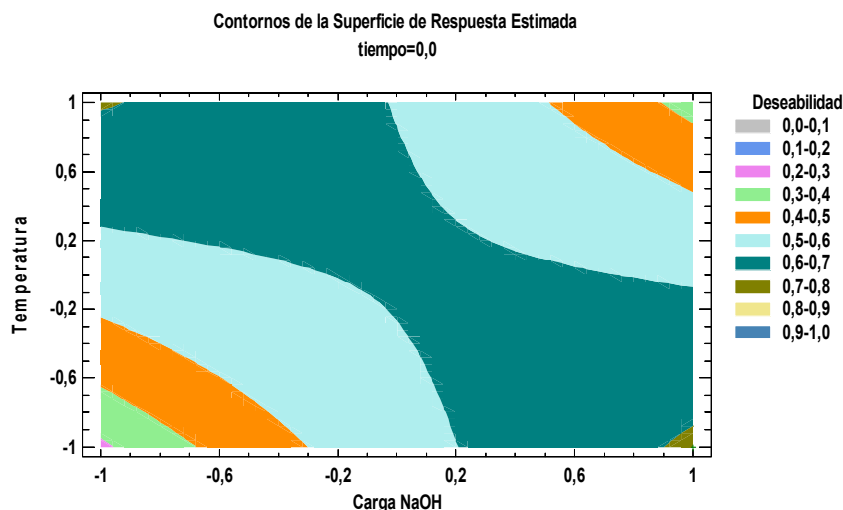


Figura 9-11. Curvas de nivel de la superficie de respuesta obtenida al evaluar múltiples respuestas: maximización de xilosacáridos presentes y minimización de absorbancia a 280nm.

La máxima deseabilidad observada está dada en las condiciones de mayor porcentaje de carga de soda (16,7%) y menor temperatura de trabajo (105 °C), esto es (1,-1) en variables codificadas, no teniendo incidencia el tiempo. Se obtiene en esta condición una deseabilidad prevista de 0,711 para los 3 tiempos utilizados. En la condición de baja carga de soda (6,7%) y alta temperatura (155 °C), ((-1,1) en variables codificadas), se logra también una buena deseabilidad: 0,706, para los tres tiempos ensayados, por lo que puede ser otra condición por seguir explorando.

Los pH de los licores extraídos se muestran en la Figura 9-12

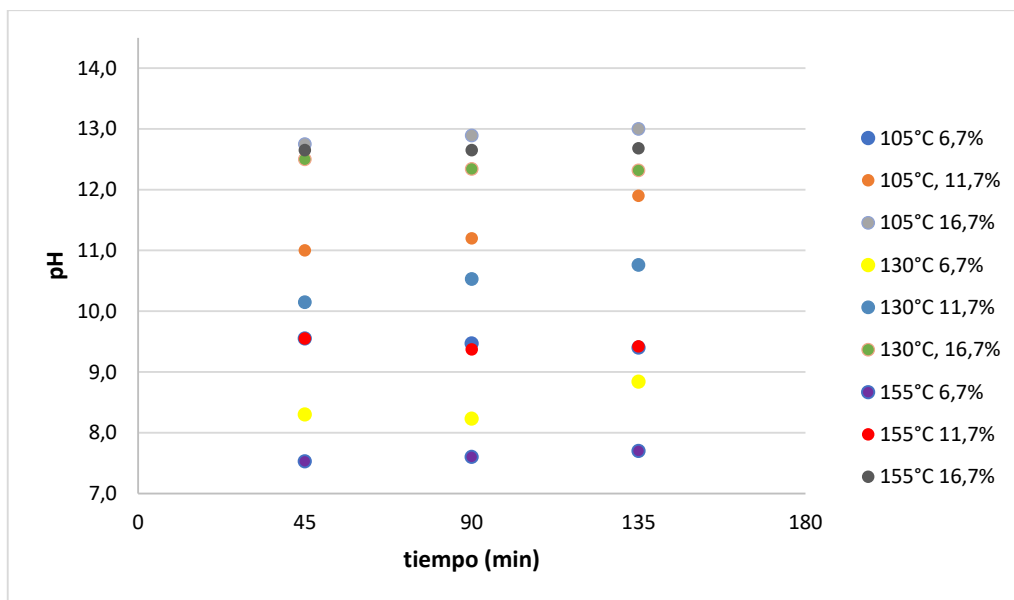


Figura 9-12. pH de los licores extraídos en las diferentes condiciones de trabajo.

Todos los licores presentan un pH final superior a la neutralidad, siendo el pH de los licores obtenidos a alta temperatura (155 °C) y baja carga (6,7 % NaOH) los que presentan los valores más cercanos a pH=7. La formación de grupos acetilos y urónicos sustituyentes en las cadenas de las hemicelulosas y la producción de hidroxácidos por las reacciones de peeling alcalino, así como por la neutralización de ácidos grasos derivados de los extractivos, justifican un menor pH al final de la extracción (Sjöström, 1993; Lehto and Alén, 2013).

Sobre las condiciones que presentaron una mayor deseabilidad o máximo contenido de xilosacáridos se analizó la distribución de los pesos moleculares de los licores extraídos, según se muestra en la Tabla 9-3.

Tabla 9-3. Distribución de pesos moleculares de licores extraídos en diferentes condiciones. Los datos en la columna representada por el símbolo de numeral (#) indica si el valor para las condiciones dadas se refiere a considerar todos los picos del cromatograma (Total) o cada pico individualmente.

Condiciones extracción				Distribución de pesos moleculares				
Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Carga de NaOH (%)	Deseabilidad prevista	#	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn	%
105	45	16,7%	0,711	Total	1351	11310	8,37	100
				1	24784	26654	1,07	40,1
				2	828	1049	1,27	59,9
155	45	16,7	0,363	Total	2183	6973	3,19	100
				1	27012	27917	1,03	16,5
				2	1846	2820	1,53	83,4
155	135	6,7	0,706	Total	3303	6194	1,88	100
				1	3303	6194		
155	45	6,7	0,706	Total	2189	4276	2,83	100
				1	27816	28558	1,02	4,7
				2	2094	3082	1,41	95,3

En la condición que se obtiene una mayor deseabilidad en el diseño de experimentos (105 °C, 45 minutos y 16,7 % de carga de NaOH), la distribución de pesos moleculares presenta dos máximos, a 26654 Da y 1049 Da (59,9 %) de peso molecular ponderado, resultando en un peso molecular ponderado medio de 11310 Da. Esto indica la presencia de hemicelulosas de alto peso molecular en una proporción importante (40,1 % de porcentaje de área) en el licor, aunque existe una proporción mayor de compuestos con un peso molecular bajo, los que puede atribuirse a cadenas de hemicelulosas más cortas.

A 155 °C y 6,7 % de carga de álcali, cuando se trabaja con un tiempo a temperatura máxima de 45 minutos se obtienen nuevamente dos máximos en la distribución de pesos moleculares ponderados, pero en este caso, la proporción de compuestos de alto peso molecular (28558 Da) es mucho menor que en la condición anterior, representando únicamente el 4,7% del área. Esto origina un peso molecular ponderado medio de 4276 Da. Trabajando en las mismas condiciones de álcali y temperatura, pero por 135 minutos, el peso molecular ponderado es de 6194, observándose un único máximo en el cromatograma. De acuerdo a Testova (Testova, 2014) y Sixta (Sixta, 2006), a temperaturas altas (> 140 °C), la hidrólisis alcalina es más significativa que las reacciones de “peeling” y reacciones de detención, afectando fuertemente el grado de polimerización de los polisacáridos. Cuando la extracción se realiza por 45 minutos existen aún cadenas de hemicelulosas de alto nivel de polimerización, las que son hidrolizadas al trabajar con tiempos mayores.

Se precipitaron las hemicelulosas con etanol a los efectos de obtenerlas sólidas y purificarlas, separándolas de las especies que no precipitan con este solvente. Analizando la solución

obtenida al redissolver el precipitado en NaOH 0,1M se obtiene la distribución de pesos moleculares que se muestra en la Tabla 9-4, mientras que la Figura 9-13 muestra una imagen del precipitado obtenido.



Figura 9-13. Precipitado obtenido al agregar etanol a pH=9 sobre el licor extraído a 155 °C, 6,7% y 45 minutos

Tabla 9-4. Distribución de pesos moleculares de los precipitados obtenidos a pH=9 y 1V de etanol de los licores extraídos, redissueltos en NaOH. (Conc. Prec. Disuelto: concentración del precipitado disuelto en la solución; dil: dilución).

Condiciones extracción			Distribución de pesos moleculares					Caracterización precipitado redissuelto		
Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Carga NaOH (%)	#	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn	%	Xil g/L	Abs 280 nm (dil. 100)	Conc. Prec. disuelto (g/L)
105	45	16,7	Total	27639	29978	1,08	100	5,3 (33,4%)	0,715	15,9
			1	27639	29978	1,08	100			
155	45	16,7	Total	24681	26737	1,08	100	0,95 (29,0%)	0,322	3,26
			1	25527	27032	1,06	98,4			
			2	7966	8040	1,09	1,5			
155	45	16,7	Total	8011	16873	2,10	100	0,66 (34,4%)	0,210	1,92
			1	16062	18433	1,15	90,7			
			2	1358	1633	1,20	9,3			
155	135	6,7	Total	1983	5720	2,88	100	0,78 (25,7%)	0,243	3,03
			1	28239	28678	1,02	11,9			
			2	1762	2625	1,49	88,1			
155	45	6,7	Total	26811	29854	1,11	100	0,33 (15,4%)	0,229	2,14
			1	26811	29854	1,11	100			

Como se ve en la Figura 9-13 el precipitado presenta un color pardo-negro, lo que indica presencia de lignina o derivados de la misma. Si bien se muestra una condición en la imagen, esta característica es común a todos los precipitados obtenidos cuyos datos se muestran en la tabla. Respecto a la composición del precipitado, aproximadamente un tercio o menos, está compuesto por xilosacáridos, mientras que grupos fórmicos y acetilos y arabinosacáridos componen otro tercio del precipitado (estos datos no están reportados). El color del precipitado y la absorbancia a 280 nm dan indicios de la presencia de lignina. La presencia de xilosacáridos

y fragmentos de lignina se confirma por el análisis de FTIR-ATR; la discusión de este se presenta en el Capítulo 11.

Referente a la distribución de pesos moleculares, los precipitados presentan un peso molecular ponderado medio mayor frente al que presenta la solución de la cual provienen. Esto se debe a que solamente los xilosacáridos de mayor peso molecular precipitan en estas condiciones. A pesar de que continúa apareciendo en los cromatogramas una señal a peso molecular en el orden de los 1000 a 8000 Da, la señal en el orden de los 25000-27000 Da se hace mucho más importante, indicando mayor presencia de compuestos con este peso molecular, posiblemente xilosacáridos químicamente unidos a fracciones de lignina.

Respecto a otros autores, la comparación se centrará en los valores obtenidos trabajando con maderas, fundamentalmente de fibra corta. Van Heiningen *et al.* (van Heiningen *et al.*, 2011) utilizaron una mezcla de chips de maderas de fibra corta del sur de Estados Unidos (roble rojo, arce rojo, álamo y magnolia austral) y trabajaron entre 120 y 165 °C con cargas de soda entre 3 y 20 % (como Na₂O) durante 45 a 90 minutos. Los rendimientos de extracción, entre 8 y 40 %, fueron similares o están un poco por debajo de los obtenidos en este trabajo. Sin embargo, los rendimientos de extracción de xilosacáridos fueron elocuentemente mejores que los obtenidos aquí. Reportaron una extracción del 54% de los xilanos presentes en el material original, trabajando a 150 °C, durante 90 minutos y con una carga de álcali de 20% (como Na₂O), (12,9% expresada como NaOH). Respecto a esto, (Timell, 1964) indica que, para las maderas de fibra corta de climas fríos, el contenido de lignina es menor que para las maderas de climas templados-cálidos, mientras que el de hemicelulosas es mayor (en el capítulo 2, se presentan datos al respecto), lo que favorece la extracción de hemicelulosas en las maderas de climas fríos. De acuerdo a Santiago y Pascoal Neto (Santiago and Pascoal Neto, 2008) en la madera de eucalipto, la extracción de xilanos ocurre predominantemente durante la fase de impregnación y el período de aumento de temperatura. La alta retención de este polisacárido en la madera (~60% del contenido total de xilanos) puede atribuirse a las características peculiares de los xilanos de eucaliptos, que no se encuentran en otros xilanos de madera dura.

Por su parte, Morais de Carvalho *et al.* (de Carvalho *et al.*, 2016) aplicaron la extracción alcalina sobre una mezcla de chips de *Eucalyptus Urophylla* y *Eucalyptus Grandis*. Trabajaron a 175 °C durante 15 minutos (factor H=628), con una relación licor: madera de 2:1 y ensayando 5, 10 y 15 % como carga de soda sobre madera seca. Los rendimientos de extracción reportados son 5 % para la carga más baja de soda, 12 % trabajando con 10 % de soda y 23 % trabajando con 15 %. Estos rendimientos fueron menores que los encontrados en el presente trabajo. El hecho de que el material de partida es de tamaño muy inferior en nuestro trabajo, pinchips, frente a chips industriales, justifica un mayor ataque de los reactivos a la biomasa utilizada. Otra explicación puede estar dada por la forma de separación del material pretratado y la recolección o no de las aguas de lavado. Dado que el rendimiento se calcula por diferencia gravimétrica del material tratado y sin tratar, este factor puede ser relevante en los valores obtenidos. Respecto a la extracción de hemicelulosas, reportó un rendimiento entre 9,6 y 12,4 % de azúcares diferentes a glucosa en base madera seca, lo que implica una remoción entre 47 y 60 % de los azúcares (no glucosa) originales. Estos son de los más altos encontrados en la revisión bibliográfica para extracciones alcalinas de madera de fibra corta.

Lehto y Alen (Lehto and Alén, 2013) utilizaron chips de abedul, trabajaron entre 130-150 °C, con tiempos entre 30 y 90 minutos y carga de soda entre 1 y 8 % de NaOH en base madera seca. Los rendimientos de extracción encontrados van desde 2 % para la condición más suave utilizada a 16,5 % en la condición más fuerte (150°C, 120 minutos 8 % NaOH/b.m.s.). Este valor está en el rango de los valores hallados en condiciones similares en este trabajo: 19,4 % de rendimiento para 155°C, 135 minutos y 6,7 % NaOH. En la condición más fuerte de trabajo, los autores reportaron un 4 % de extracción de carbohidratos/b.m.s, sin reportar cuanto de ello corresponde a xilosacáridos. En nuestro caso se alcanzó 2,8 % de extracción de carbohidratos (2,2 % corresponden a xilosacáridos). Si se tiene en cuenta que la concentración de xilanos en la madera de *Eucalyptus spp.* es menor que en la de abedul (21,1 % expresado como xilosa en base madera seca), se puede establecer que la extensión de la remoción de xilosacáridos es comparable en ambos casos.

Testova *et al.* (Testova *et al.*, 2014) aplicaron la extracción alcalina sobre chips de abedul trabajando a temperaturas entre 80 y 125 °C, y concentración de soda entre 1 y 2,5 M para una relación L/W = 10 y 60 minutos a la temperatura de trabajo. Utilizó también el espesor de los chips como variable, en dos niveles: 2-4 mm (S) y 4-6 mm (L). El rendimiento del residuo sólido en la preextracción alcalina dependió fuertemente de la temperatura, mientras que el efecto de la concentración de álcali no pudo definirse claramente. El rendimiento de extracción que obtuvieron varía entre 10 y 20 % para las condiciones más bajas de temperatura (80 y 90 °C), alrededor de 30 % para las condiciones a 110 °C y entre 40 y 50 % para las extracciones a 125°C. La extracción de xilanos aumentó directamente con el aumento de la alcalinidad y temperatura, llegándose a extraer hasta la mitad de los xilanos presentes (12,5 % xilano/b.m.s.) a 125 °C y 2,5 M. La extracción de lignina fue mayor a mayor temperatura; siendo moderada a 80 y 95 °C, mientras que es considerablemente mayor a 110 y 125 °C.

En relación a los pesos moleculares obtenidos, Testova *et al.* (Testova *et al.*, 2014) reportaron un Mn = 10300Da, Mw = 19800 kDa, en el licor extraído a 95 °C, 2,5 M NaOH y 60 minutos trabajando con chips de abedul. Por otro lado, Vena *et al.* (Vena *et al.*, 2013) trabajando con chips de *Eucalyptus grandis* a 40 °C, durante 240 minutos y con una concentración de 2 M de NaOH para una relación licor/madera= 4, reportaron un peso molecular ponderado medio de 53.400 Da. Dado que realizó la precipitación por diálisis del licor obtenido, señalaron que este peso molecular posiblemente este influido por fragmentos de lignina presentes.

Finalizado el análisis de datos en las condiciones del diseño estadístico realizado, en base a los resultados obtenidos y las referencias mencionadas en la revisión bibliográfica, se resolvió trabajar a menor temperatura, pero utilizando mayor tiempo de extracción, aumentando la carga de soda.

La Figura 9-14 muestra los rendimientos obtenidos para las diferentes condiciones aplicadas y el estado del sólido luego de la extracción de hemicelulosas.

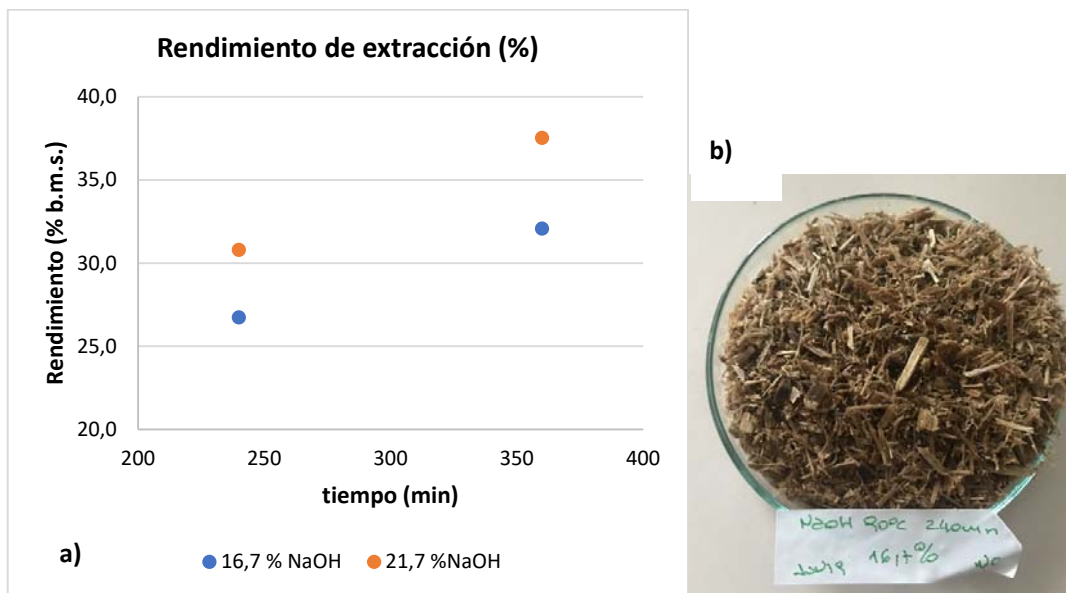


Figura 9-14. a) Rendimiento de extracción a temperatura de 90 °C. b) Sólido resultante luego de la extracción a 90 °C, durante 240 minutos con una carga de soda de 16,7 % (b.m.s.).

Cómo es de esperar, para un mismo tiempo el rendimiento aumenta con la carga de soda. Al aplicar la misma carga de soda, el rendimiento aumenta con el tiempo, a diferencia de lo que ocurría en el diseño factorial previo, que, para los tiempos trabajados, la incidencia del mismo era poco relevante. Comparando con los valores obtenidos en el diseño factorial previamente discutido, vemos que el rendimiento es un poco mayor que el obtenido a 105 °C y 16,7% de carga, sin embargo, hay que considerar que, en las extracciones realizadas a 90 °C, el tiempo de extracción fue considerablemente mayor (78 % y 167 % superior), lo que afecta la remoción.

Los valores de pH del licor extraído oscilan entre 12,3 y 12,7, no habiendo diferencias significativas entre las distintas condiciones aplicadas.

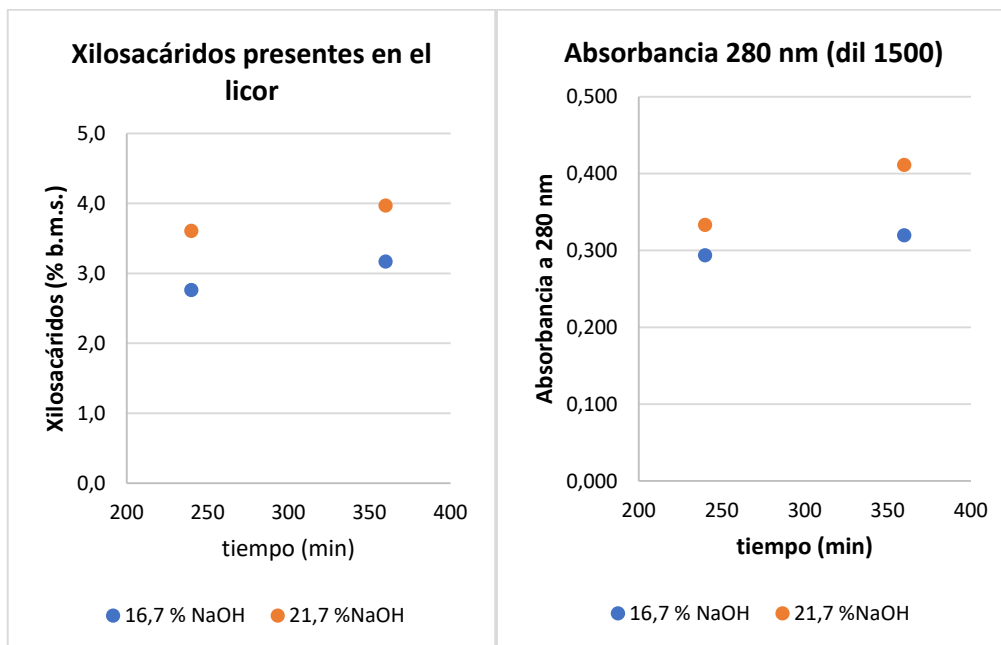


Figura 9-15. Contenidos de xilosacáridos y absorbancia a 280nm de los licores obtenidos a 90 °C.

Paralelamente, se analizaron las aguas de lavado de las distintas corridas, encontrándose entre 0,1 y 0,2 % de xilosacáridos (% b.m.s) en las mismas. El contenido de sólidos disueltos en los licores es del orden de 110 g/L cuando se utilizó la carga de álcali de 21,7% y de 85 g/L con la carga de 16,7%. En las aguas de lavado (de color oscuro) se encuentra, en promedio, un 10 % del contenido de sólidos disueltos respecto a los licores.

En los licores extraídos, de los carbohidratos y productos de degradación (ácidos alifáticos, furfural, HMF), nuevamente los xilosacáridos son los componentes mayoritarios presentes, seguidos por los grupos acetilo en el licor. Al aumentar la carga de soda aumenta la remoción de xilosacáridos, como era de esperar. Realizando la comparación de medias para las dos concentraciones a tiempo = 240 minutos (prueba t-Student), se determina que para un nivel de significación $\alpha=0,05$ las dos medias no son iguales. Sin embargo, a tiempo=360 minutos, la remoción de xilosacáridos a las dos cargas aplicadas es estadísticamente igual. Lo mismo sucede al comparar los valores de xilosacáridos en el licor para una misma concentración y a los dos tiempos analizados. Trabajando a carga de soda de 16,7%, las dos medias no son iguales, pero sí lo son cuando se trabaja a 21,7%. Dado que sólo se realizaron dos réplicas de cada condición y por ello la desviación estándar tiene una importancia muy grande, estos resultados estadísticos no se consideran del todo válidos.

No obstante, en estas nuevas condiciones se logra extraer un mayor contenido de xilosacáridos que en el diseño anterior, lográndose remover entre un 2,7 y 4,0 % de los xilosacáridos (b.m.s.), (entre un 17 y un 25 % de los xilanos presentes en la madera de partida) en las condiciones aplicadas a 90 °C.

Por otro lado, la absorbancia a 280 nm es del mismo orden o un poco menor que la encontrada en las mejores condiciones del diseño factorial, por lo que, en este caso, la relación xilosacáridos/lignina (medida como absorbancia a 280 nm), es mayor en las condiciones aplicadas a 90 °C. La presencia de glucosacáridos en el licor es del orden de 0,5 % b.m.s.

La Tabla 9-5 muestra la distribución de pesos moleculares para uno de los licores obtenidos.

Tabla 9-5. Distribución de pesos moleculares del licor obtenido a 90 °C, 360 minutos y 21,7 % de carga de NaOH.

Condiciones extracción			Distribución de pesos moleculares				
Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Carga de NaOH (%)	#	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn	%
90	360	21,7		1536	10752	6,99	100
			1	27045	29139	1,08	33,4
			2	1042	1511	1,45	66,6

Al igual que en el análisis de los licores obtenidos a mayor temperatura, pero con alta carga de álcali, en la distribución de pesos moleculares en el licor se observan dos picos definidos, uno en el orden de 27000 Da y otro con un peso molecular muy inferior.

En condiciones fuertemente alcalinas, a partir de temperaturas de 70 °C, el elevado pH ioniza parte de los grupos hidroxilo y conduce a una desacetilación de las hemicelulosas, ocurriendo entonces una hidrólisis catalizada por bases de grupos acetilos. Las hemicelulosas acetiladas se someten a una desacetilación rápida por saponificación de enlaces éster. Paralelamente, cerca de los 80 °C comienzan a darse las reacciones de peeling alcalino, las que continúan de manera gradual hasta que las condiciones de equilibrio de la tautomerización del ceto-enol son favorables para la formación del 1,2-enolato, convirtiéndose el grupo final reductor en un grupo de ácido sacarínico estable a los álcalis (reacciones de detención). A temperaturas menores a 100 °C, las reacciones de detención son menos favorables frente a las de peeling alcalino (Sixta, 2006; Paananen *et al.*, 2010). Esto último, sumado a que la extracción se realizó por más tiempo, justificaría el aumento de concentración de xilosacáridos en los licores extraídos a 90 °C y carga de NaOH de 16,7% (carga igual a la aplicada en la mejor condición obtenida del diseño factorial). Respecto a la incidencia de la concentración de álcali, Kondo y Sarkanen indicaron que a pH superiores a 12, la velocidad de la reacción de peeling es independiente de la concentración de hidroxilos, lo que justificaría que no exista demasiada variación en la extracción de xilosacáridos en las dos concentraciones utilizadas (Kondo and Sarkanen, 1984; Paananen *et al.*, 2010).

Kondo y Sarkanen (Kondo and Sarkanen, 1984) postularon la clasificación en dos especies de lignina durante la deslignificación inicial, una fácilmente removible y una más resistente al ataque químico. La fracción de lignina fácilmente removible y susceptible de ser removida en la deslignificación inicial alcanza al 14% de la lignina original en maderas de pino (Kondo and Sarkanen, 1984; Paananen *et al.*, 2010).

Al-dajani y Tschirner (Al-dajani and Tschirner, 2008) evaluaron la extracción de hemicelulosas previo al pulpeo Kraft de chips de álamo (contenido de xilanos de 17,7 % b.m.s.). Aplicaron cargas de álcali de 16,7, 26,7 y 33,3 % y temperaturas entre 32-90 °C, con una relación de licor a madera de 4:1, durante 4 h. A 90 °C se extrajo la mayor cantidad de compuestos, variando entre 18 y 22 % en función de la carga de álcali aplicada. Estos rendimientos están un poco por debajo de los obtenidos en nuestro trabajo, pero hay que tener presente que, dado el menor tamaño de partícula utilizado, es esperable una mayor degradación y pérdida del material en las aguas de lavado. El contenido de xilosacáridos en el licor extraído a 90 °C y con 26,7 % de carga de álcali fue 3,01 %, un poco por debajo del obtenido en este trabajo, y más aún si se considera que el contenido de xilanos en la madera de álamo es algo superior al de eucalipto. El peso

molecular reportado de la fracción extraída es mayor a 21.300 Da, valor similar al obtenido en este trabajo.

En el trabajo de Testova *et al.* (Testova *et al.*, 2014), previamente señalado, el rendimiento de extracción a 95 °C varió entre 10 % (para 1.0 M NaOH) y 24 % a 2,5 M NaOH. El contenido de xilosacáridos en el licor alcanzó el 10 % b.m.s, que corresponde al 46% del contenido de xilosacáridos original, trabajando a 95 °C durante 60 minutos y con una concentración de NaOH 2,5 M (100 % expresado como carga de NaOH en b.m.s). Cuando trabajaron con la menor carga utilizada, 1,0 M (40 % de carga de NaOH en b.m.s.) la extracción fue de 6,0 % xilosacáridos (b.m.s.), 29 % de los xilosacáridos originales presentes en la madera, un poco superior al reportado en este trabajo en la mayor concentración utilizada (21,7 %NaOH)

Vena *et al.* (Vena *et al.*, 2013), trabajaron con chips de *Eucalyptus grandis* entre 40 y 90 °C, durante 120 - 240 minutos y con una concentración de 1 y 2 M de NaOH para una relación Licor/madera= 4. En estas condiciones reportan una remoción de xilanos entre 1,5 y 3,4 % b.m.s. El valor de 3,4% de remoción de xilanos corresponde a la condición más exhaustiva aplicada (90°C, 240 minutos y 32 % carga de álcali). Este valor se encuentra en el orden al reportado en este trabajo.

Longue Jr. *et al* (Longue Junior *et al.*, 2010) utilizaron una mezcla de chips de *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus urophylla*, al que le aplicaron el tratamiento alcalino en diferentes condiciones. Trabajaron con una relación de licor a madera de 6:1, tiempos de reacción de 3, 8, 14 y 16 horas, temperaturas entre 70 y 90 °C y concentraciones de NaOH entre 60 y 156 g/L a presión atmosférica. También evaluaron la incidencia de la presión, trabajando a 300 kPa y 100 °C con tiempos de reacción entre 30 y 120 minutos y concentración de NaOH entre 100 y 200 g/L. En los tratamientos sin presurizar, la mayor remoción de xilosacáridos (35 % de los xilanos presentes inicialmente en la madera; 4,2 % b.m.s.) se logró trabajando a 90 °C durante 6 horas y con una concentración de soda de 156 g/L (93,2 % carga de soda). Trabajando con el reactor presurizado a 300 kPa, reportaron una remoción del 32,2 % de los xilanos iniciales, trabajando a 100 °C, durante 60 minutos y con una concentración de soda de 200 g/L. Asimismo, indicaron que la concentración de álcali tiene un impacto mayor en la remoción de xilanos que el tiempo de reacción, mientras que la variable temperatura, tiene poco efecto en la remoción, en el rango de trabajo utilizado.

En un trabajo posterior, Longue *et al.* (Longue Jr. *et al.*, 2013), aplicaron tratamientos alcalinos a chips de *Eucalyptus globulus*, a 100 °C durante 60 minutos y usando cargas de alcali de 10 y 50 % como NaOH, con una relación licor:madera de 10:1. Utilizando la carga de 10% lograron remover 2,2 % de los xilanos iniciales (b.m.s.) y 5,3 % para 50 % de carga de NaOH. El primer valor es comparable a los obtenidos en este trabajo en condiciones similares. La remoción de lignina fue de 1,4 % y 5,5 % de la lignina inicial (b.m.s.), respectivamente. Estos autores postulan la precipitación de las hemicelulosas con etanol en una relación 1:1 en volumen y la posterior recuperación de la soda (en la cola de destilación) y etanol (cabeza) utilizados por destilación a 85 °C. El peso molecular ponderado del precipitado fue de 41.000 Da para el precipitado obtenido del licor con 10 % de NaOH y 16.000 Da de para el precipitado obtenido del licor con 50 % de NaOH.

Posteriormente, y en el marco del Proyecto de Investigación “DOC.CB2G.2018_01. Pretratamiento de impregnación alcalina y explosión con vapor para la producción de etanol con separación de hemicelulosas y lignina”, se realizó un tratamiento alcalino a 20 % de carga de hidróxido de sodio en cámara controlada a 23 °C, durante 16, 20 y 24 horas con agitación mecánica (150 rpm). En estas condiciones se extrajeron $1,9 \pm 0,4$ % de los xilanos en base madera seca.

9.3.2. Balance masa de las mejores condiciones:

Sobre las condiciones que dieron mayor deseabilidad en el diseño experimental (105 °C, 45 minutos 16,7 % NaOH y 155 °C, 135 minutos 6,7 % NaOH) y a la condición que dió mayor remoción a 90 °C, se realizó la caracterización del sólido remanente luego de la extracción. El sólido de la condición experimental que presentó mayor remoción de xilosacáridos en el diseño experimental (155°C, 45 minutos y 16,7 % NaOH), también fue caracterizado.

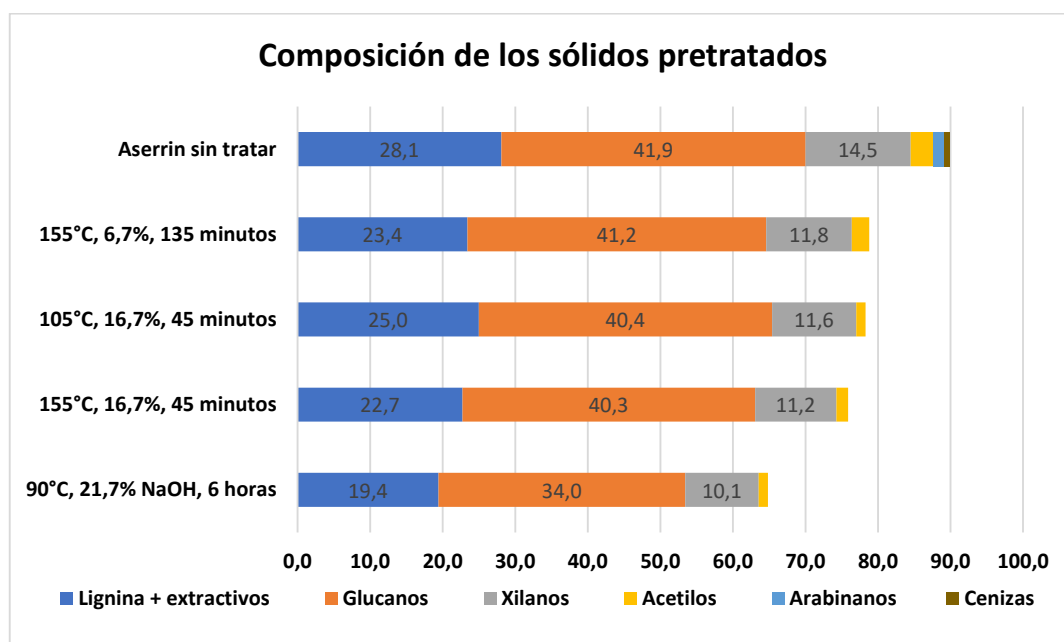


Figura 9-16. Composición en carbohidratos, lignina y ácidos orgánicos de los sólidos antes y luego de los mejores tratamientos alcalinos.

Luego de realizada esta cuantificación se puede indicar en primer término que a excepción de la extracción realizada a 90 °C, el contenido de glucanos se mantuvo prácticamente constante en el sólido sin tratar y en los pre-tratados, lo que concuerda con el balance de masa, ya que en las licores extraídos, se obtuvieron fracciones bajas de glucosacáridos (como se puede observar en la Figura 9-8). En el sólido remanente del tratamiento a 90 °C, el contenido de glucanos es sorprendentemente bajo. El contenido de glucosacáridos en el licor fue de 0,42 % b.m.s., lo que está en el orden de lo obtenido en las otras extracciones alcalinas realizadas, sin embargo, en este caso el contenido de ácido fórmico es alto (3,4 % b.m.s.). El ion formiato se puede formar por la degradación de los glucosacáridos (Tunc, 2008), lo que podría justificar el bajo contenido de glucosacáridos en la solución. Cabe destacar que la caracterización de los sólidos fue realizada

por triplicado, y particularmente en el caso de los glucanos del sólido obtenido por el tratamiento a 90 °C, 6 horas y 21,7 % de carga de soda, la desviación estándar fue de 1,0 % (b.m.s.). El contenido de lignina más extractivos de los sólidos remanentes es consistente con los valores de absorbancia a 280 nm medidos en los licores para los casos de los sólidos obtenidos a partir del diseño experimental. Factiblemente en esas condiciones, se extrajeron la mayoría de los extractivos y fragmentos de lignina que están asociados a las hemicelulosas en la madera. En el caso de la experiencia a 90 °C, existe una mayor disminución del contenido de lignina en el sólido pretratado, dado fundamentalmente porque esta experiencia se aplicó la mayor carga de soda de las analizadas y un tiempo de reacción bastante mayor a los aplicado en las extracciones del diseño experimental, por lo que las reacciones de deslignificación tienen lugar en mayor extensión.

9.4. Conclusiones

El tratamiento alcalino permitió la remoción de una fracción de xilosacáridos de la madera de eucalipto. En el rango del diseño experimental realizado, la mayor remoción de xilosacáridos, 2,5 % b.m.s., se logró al aplicar las condiciones más fuertes estudiadas (155 °C, 135 minutos y 16,7 % de carga de NaOH). Sin embargo, en estas condiciones la medida de absorbancia a 280 nm de la solución (medida indirecta del contenido de lignina), fue significativamente más alta que en las otras condiciones aplicadas. Realizando la optimización de las condiciones experimentales, considerando como respuestas a optimizar la mayor extracción de xilosacáridos y el menor contenido de lignina en el licor, se encontró que las mejores condiciones a aplicar correspondieron a una temperatura de 105 °C y carga de soda de 16,7 % en b.m.s., no afectando significativamente el tiempo de extracción (se analizó entre 45 y 135 minutos). En este caso, se logró remover el 2,3 % de xilosacáridos (b.m.s.), lo que corresponde al 15,6 % de los xilosacáridos presentes en la madera original. Otra condición en la que se obtuvo una relación buena entre los xilosacáridos y el contenido de lignina presentes en la solución fue trabajando a 155 °C y 6,7 % de carga de soda. En este caso se logró una remoción de xilosacáridos de 2,1 % b.m.s.

Trabajando a altas cargas de soda el peso molecular del material precipitado con etanol, se encuentra en el orden de 26000-30000 Da, comparable con el reportado por otros autores. Lo mismo sucede cuando se trabajó con cargas de soda más bajas a alta temperatura y poco tiempo de extracción. Sin embargo, al aumentar el tiempo de extracción para bajas cargas de soda a alta temperatura, el peso molecular fue considerablemente más bajo, posiblemente porque aumentan las reacciones de hidrólisis de las hemicelulosas extraídas.

Por otro lado, al trabajar a 90 °C, aumentando la carga de soda y el tiempo frente a lo ensayado en el diseño experimental, se logró mejorar la extracción de xilosacáridos, logrando remover en estas condiciones entre un 2,8 y 4,0 % de los xilosacáridos presentes (b.m.s.), lo que corresponde entre 17 y 25 % de los xilosacáridos de la madera de partida. Sin embargo, al analizar el sólido pretratado, el contenido de glucanos y lignina baja sensiblemente, factor que hay que considerar pensando en la utilización de estas fracciones.

En conclusión, de las extracciones alcalinas analizadas, la mejor condición de extracción se logró trabajando a 105°C durante 45 minutos y con una carga de álcali de 16,7 %. Aumentar la carga de álcali posiblemente permita mejorar más el rendimiento de la extracción en términos de xilosacáridos. Hasta donde aumentar la carga y/o el tiempo de reacción debe ser determinado con un análisis global de la ingeniería involucrada en la extracción y purificación de las hemicelulosas; considerando también los métodos y rendimientos de la recuperación de los reactivos involucrados, así como también las características y uso de los otros componentes de la madera.

Las hemicelulosas obtenidas, por el peso molecular que presentan, pueden ser utilizadas en aplicaciones que requieran el uso de hemicelulosas de alto peso molecular: biofilms, recubrimientos, espumas, geles, así como las modificaciones químicas de los xilanos para la producción de los productos antes mencionados. La contaminación con lignina que presentan las hemicelulosas obtenidas puede condicionar estos usos, fundamentalmente el color puede ser perjudicial para las aplicaciones requeridas, aunque la heterogeneidad del compuesto de hemicelulosa-lignina que se obtiene podría ser beneficioso para la formación de films, pero esto debe ser estudiado experimentalmente y no es objeto de este trabajo. En el capítulo 2 se

presentan los trabajos realizados para la concentración y purificación de las hemicelulosas extraídas.

10. PRETRATAMIENTOS: TRATAMIENTO CON HIDRÓXIDO DE SODIO : PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (NaOH : H₂O₂).

En este apartado se analiza el pretratamiento con hidróxido de sodio (soda) auxiliado por peróxido de hidrógeno para la extracción de hemicelulosas a partir de residuos industriales de eucalipto.

Este trabajo es parte del Proyecto de Investigación FSE-1-2015-1-109698 “Alternativas para el procesamiento de residuos forestales: Energía, Bioetanol y Biomateriales”, donde se compararon diferentes alternativas para valorizar los residuos industriales de eucalipto: combustión para generación de energía, obtención de pulpa semi-química, para ser usada como pulpa filler o producción de etanol lignocelulósico y sub-productos. En este documento sólo se analizará el efecto del pretratamiento sobre pinchips industriales desde el punto de vista de la recuperación de hemicelulosas.

10.1. Objetivos específicos

- Analizar cómo afectan las variables temperatura de extracción, carga de soda : peróxido de hidrógeno y tiempo al rendimiento de la extracción.
- Analizar los productos formados en los licores extraídos en las diferentes condiciones.

10.2. Metodología

10.2.1. Materia prima utilizada

Se utilizó la misma materia prima que en el Capítulo “Tratamientos con Hidroxido de sodio”, biomasa proveniente del screening de chips (pinchips) de una planta de celulosa que procesa eucalipto.

10.3. Extracciones realizadas

Para los ensayos de pulpeo se utilizó un reactor Parr modelo 4522, de 2L de capacidad nominal. Este reactor consiste en un cilindro metálico cerrado en su parte inferior, donde se colocan la biomasa y los reactivos químicos. La tapa está provista de ejes a los cuales se ajusta el agitador deseado, en este caso un agitador helicoidal. Este sistema se cierra con una serie de tornillos y se coloca en una camisa con resistencias eléctricas. El reactor cuenta además con un sistema de control de temperatura automático, que utiliza un sistema de refrigeración por serpentín; este mecanismo permite un control fino de temperatura. El material del reactor y sus componentes es Carpenter 20®. La Figura 10-1 muestra una imagen del reactor utilizado.



Figura 10-1. Reactor Parr utilizado para la realización de las experiencias de extracción. A la derecha se muestra un detalle del agitador utilizado y del sistema de enfriamiento con serpentín.

Previo a agregar la mezcla de biomasa al reactor, se impregnó ésta con los reactivos en 2 etapas, utilizando para ello un impregnador fabricado en el Instituto de Ingeniería Química. La impregnación es una etapa importante en el proceso, fundamentalmente por el uso de peróxido de hidrógeno; una mala distribución de los reactivos puede incidir directamente en los rendimientos y calidad de la pulpa obtenida. Para el diseño del impregnador se imitó el diseño desarrollado por Kruzolek (Kruzolek, 2000). En la Figura 10-2 se muestra el diseño de este y una fotografía del equipo utilizado. El dispositivo consiste en un cilindro perforado donde se ubica los pinchips, con una platina móvil en la parte inferior. El sistema se ubica dentro de otro contenedor donde se colocan los reactivos químicos. Todo este dispositivo se colocó en una prensa, aplicándole una presión de 5 Kg/cm² a la biomasa (300 g b.m.s) y logrando la impregnación de los reactivos en ella por “efecto esponja” al liberar suavemente la presión. Finalizada la impregnación, se trasvasó completamente el sólido con el líquido al reactor Parr.

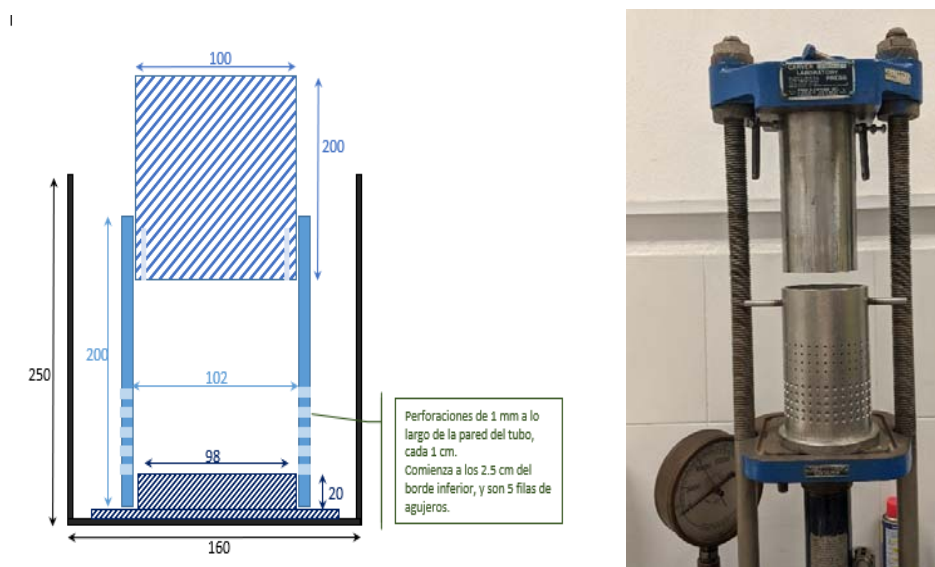


Figura 10-2. Esquema constructivo e imagen del impregnador utilizado.

Para el pre-tratamiento en el reactor Parr, se aplicó un diseño experimental factorial 3^3 (denominados Serie A), tomando como parámetros la temperatura máxima de extracción, el tiempo a esa temperatura y la carga de soda y peróxido utilizada (expresada en porcentaje sobre masa de madera seca utilizada). El orden de los experimentos fue realizado al azar. Los valores de los parámetros se presentan en la Tabla 10-1. En el diseño se aplicó siempre una relación 2:1 de carga de soda : peróxido de hidrógeno ($\text{NaOH} : \text{H}_2\text{O}_2$). La relación masa de líquido total / masa de pinchips (L/W) utilizada en el reactor fue constante y se estableció en 7, por experiencia en trabajos previos con esa granulometría de la biomasa en ese reactor. Se aplicaron 8 kg/cm^2 al sistema, utilizando nitrógeno gas para ello.

Se utilizó DTPA (ácido dietilentriamino-pentaacético) como quelante en una proporción de 0.2% b.m.s. La función del quelante en este caso es remover metales pesados, a los efectos de evitar el consumo del peróxido de hidrógeno, por reacción con estos. De acuerdo a Kruzolek (Kruzolek, 2000) los extractivos coloreados presentes en el eucalipto, también reaccionan con este quelante.

Tabla 10-1. Factores y niveles experimentales del diseño experimental realizado.

Nombre	Unidades	Niveles	Bajo	Medio	Alto
A:Temperatura	°C	-1, 0, +1	50,0	75,0	100,0
B:tiempo	min	-1, 0, +1	30	60,0	90,0
C: carga de $\text{NaOH} : \text{H}_2\text{O}_2$	%	-1, 0, +1	8:4	10:5	12:6

Finalizada la extracción, el material fue drenado y centrifugado a 1000 rpm, logrando separar la fracción sólida de la líquida. Se lavó exhaustivamente con agua desionizada. En el sólido se determinó el rendimiento de la extracción tomando en cuenta la masa inicial seca de partida y la masa seca obtenida posteriormente a la extracción, y se conservó para ser posteriormente refinado en un refinador de discos (en condiciones predeterminadas y constantes), con el

objetivo de producir pulpa semi-química o aumentar la accesibilidad a las cadenas de celulosa para favorecer la hidrólisis enzimática. Sobre la fracción líquida se determinó: pH, sólidos totales (a 105°C), absorbancia a 280 nm, carbohidratos totales (derivados de xilosa, glucosa, arabinosa), ácidos orgánicos (acético y fórmico) y productos de degradación (furfural e hidroximetilfurfural (HMF)). Para la determinación de carbohidratos totales, ácidos orgánicos y productos de degradación se utilizó el procedimiento NREL/TP-510-42623, con la salvedad que se utilizó únicamente la columna Aminex 87H para todas las determinaciones. La expresión “b.m.s” refiere a que los resultados se expresan en porcentaje de la masa de madera de partida en base seca en estufa a 105°C. Se determinó peróxido residual por iodimetría y álcali residual de acuerdo a norma SCAN-N 33:94.

Se evaluó el diseño experimental en términos de mayor rendimiento de extracción, mayor cantidad de xilosacáridos presentes en el licor, grado de blanco de las pulpas obtenidas luego del refinado o eficiencia de la hidrólisis enzimática de las mismas.

Realizado aproximadamente el 40% del diseño descripto, se constató que los rendimientos obtenidos eran muy bajos para los diferentes objetivos planteados (pre-extracción de hemicelulosas, obtención de pulpa semi-química con un grado de blanco aceptable o eficiencia en la hidrólisis enzimática), por lo que se resolvió, de acuerdo con la revisión bibliográfica orientada a la temática de producción de bioetanol (Karagöz *et al.*, 2012; Rabelo, Andrade, Maciel Filho, Costa, *et al.*, 2014; Dutra *et al.*, 2018), trabajar con condiciones más exhaustivas de extracción (Serie B de ensayos).

A partir de aquí la relación NaOH : H₂O₂ fue de 1:1. En primera instancia se trabajó a 75 °C y 90 minutos de reacción y se varió la carga de NaOH entre 5 y 45 % (b.m.s.). Posteriormente, se aumentó el tiempo de reacción, para diferentes cargas de soda, entre 8 y 30 %, manteniendo la temperatura en 75 °C. En estos casos, el agregado de peróxido se realizó en 2 - 4 etapas secuenciadas en el tiempo. En la Tabla 10-2 se muestran las nuevas condiciones analizadas.

Tabla 10-2. Condiciones ensayadas en segunda etapa. La relación NaOH: H₂O₂ es de 1:1

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Carga de NaOH (% b.m.s.)
75	90	5
75	90	10
75	90	15
75	90	30
75	90	45
75	90	60
75	240	15
75	480	15
75	240	30
75	480	30

10.4. Resultados y discusión

La Figura 10-3 muestra las características del sólido obtenido luego del tratamiento y la pulpa post refinación, así como el licor extraído. Como puede apreciarse y como es de esperar, el sólido obtenido fue más claro que el aserrín original, luego del tratamiento con $\text{NaOH} : \text{H}_2\text{O}_2$. Es evidente el efecto del peróxido en este aspecto. Sin embargo, el licor obtenido presentó un color oscuro, de aspecto similar a los obtenidos en los tratamientos sin peróxido.

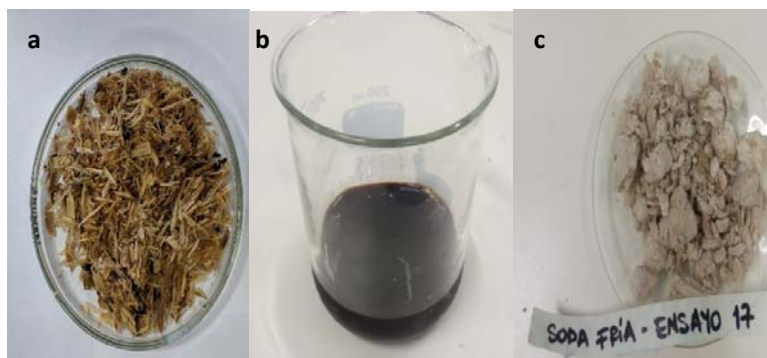


Figura 10-3. a) Sólido obtenido luego del tratamiento álcali: peróxido. b) licor extraído y c) Pulpa obtenida luego de la refinación

10.4.1. Serie A: Diseño factorial 3^3 (inconcluso)

Se utiliza la definición de rendimiento de extracción definida en los apartados anteriores, la que indica qué porcentaje de la biomasa inicial se encuentra en el líquido extraído. La Figura 10-4 muestra el rendimiento obtenido en las diferentes condiciones evaluadas.

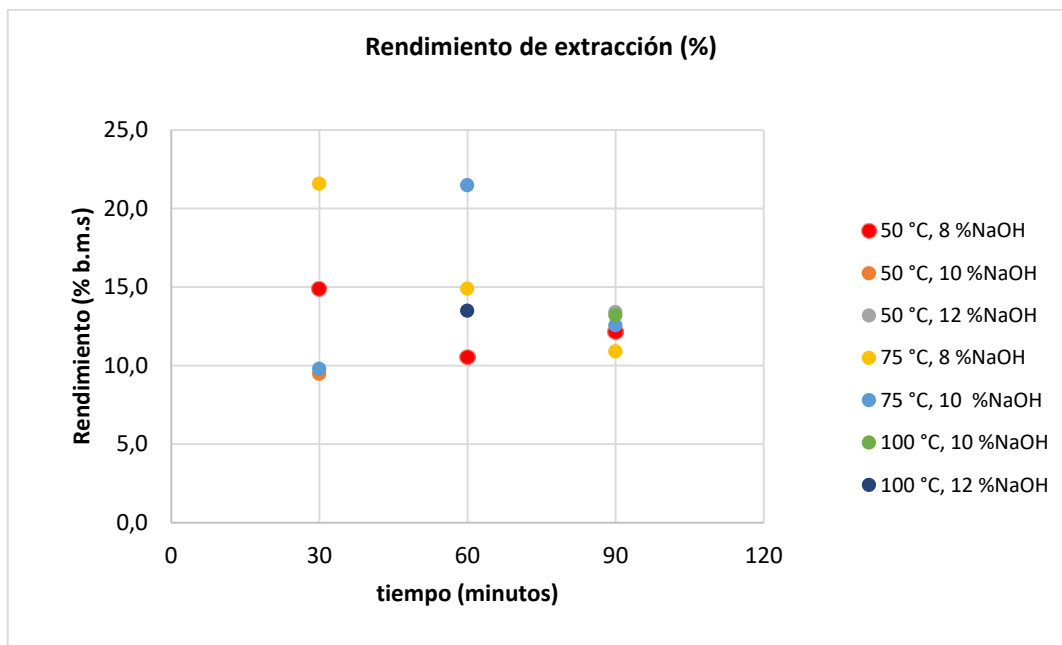


Figura 10-4. Porcentaje de biomasa inicial presente en el líquido extraído.

Los rendimientos de extracción se encontraron entre 9,5 y 21,6 % b.m.s. No obstante, no se observó una tendencia clara con ninguno de los parámetros estudiados. Estos rendimientos son comparables a los obtenidos por Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2011), quienes trabajaron con chips de álamo en condiciones similares a las de este trabajo (temperatura: 50 - 100 °C, tiempo: 10 – 60 minutos, carga de soda 1,5 – 6,7 % y relación soda: peróxido de hidrógeno 2:1), obteniendo rendimientos de extracción entre 6 y 15 %.

La Figura 10-5 muestra los valores de pH de los licores extraídos en la ejecución de los experimentos del diseño experimental.

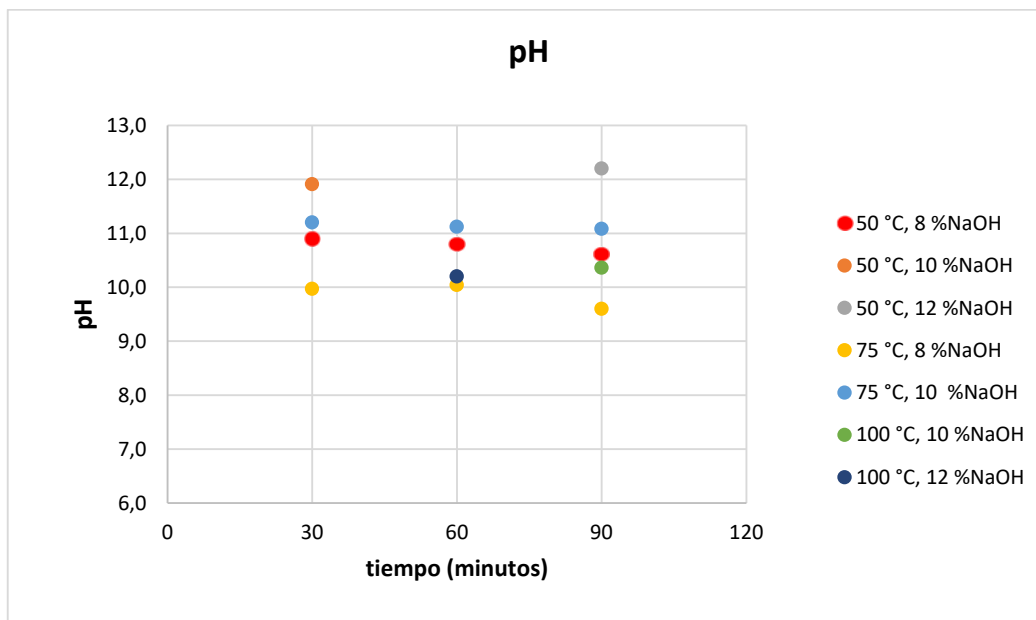


Figura 10-5. pH de los licores extraídos en las diferentes condiciones de trabajo del diseño experimental.

Todos los licores presentaron un pH superior a la neutralidad. Los valores de pH finales de los licores surgen, por un lado, de la carga de soda aplicada en cada condición, siendo de esta forma más altos cuando las demás condiciones son iguales y, por otro lado, por el avance de la extracción; de esta forma, al liberarse más grupos acetilos y/o urónicos, la neutralización de estos por los OH^- de la soda aplicada ocasiona una disminución del pH.

Fang *et al.* (Fang, Sun and Tomkinson, 2000) indicaron que la extensión de la deslignificación y solubilización de las hemicelulosas por tratamiento con peróxido alcalino era fuertemente dependiente del pH de la reacción. En su trabajo, por debajo de pH 11.0, la eficiencia de deslignificación y solubilización de hemicelulosas disminuyó significativamente mientras que por encima de pH 11.5, la tasa de deslignificación mejoró considerablemente, y la solubilización de hemicelulosas aumentó sustancialmente. Cuando se ajusta adecuadamente, la alcalinidad total de la solución debe ser lo suficientemente alta como para asegurar una concentración adecuada de anión hidroperóxido (HOO^-), a lo largo del ensayo. De acuerdo con los equilibrios involucrados, el óptimo se encuentra en pH 11.5-11.6, que corresponde al pKa del peróxido de hidrógeno. Por otro lado, la alcalinidad debe ser lo suficientemente baja para minimizar la descomposición del peróxido, por formación del radical hidroxilo ($\text{HO}^\cdot$) (Doner, Sweeney and Hicks, 1997; Ek, Gellerstedt and Henriksson, 2009). En este punto, Fang *et al.*, mencionan que trabajando en pH hasta 13, no encontraron un efecto significativo en la solubilización de las hemicelulosas en paja de arroz.

Como el pH que se reporta en la Figura 10-5 es el valor de pH del licor una vez finalizado el tiempo de tratamiento, no se puede asegurar el pH durante la reacción. No obstante, analizando el rendimiento de la extracción, el pH y el contenido de xilosacáridos en el licor extraído, no se observa ninguna tendencia que permita concluir que el pH tuvo incidencia en los rendimientos de extracción.

El contenido de xilosacáridos en el licor extraído puede verse en la Figura 10-6.

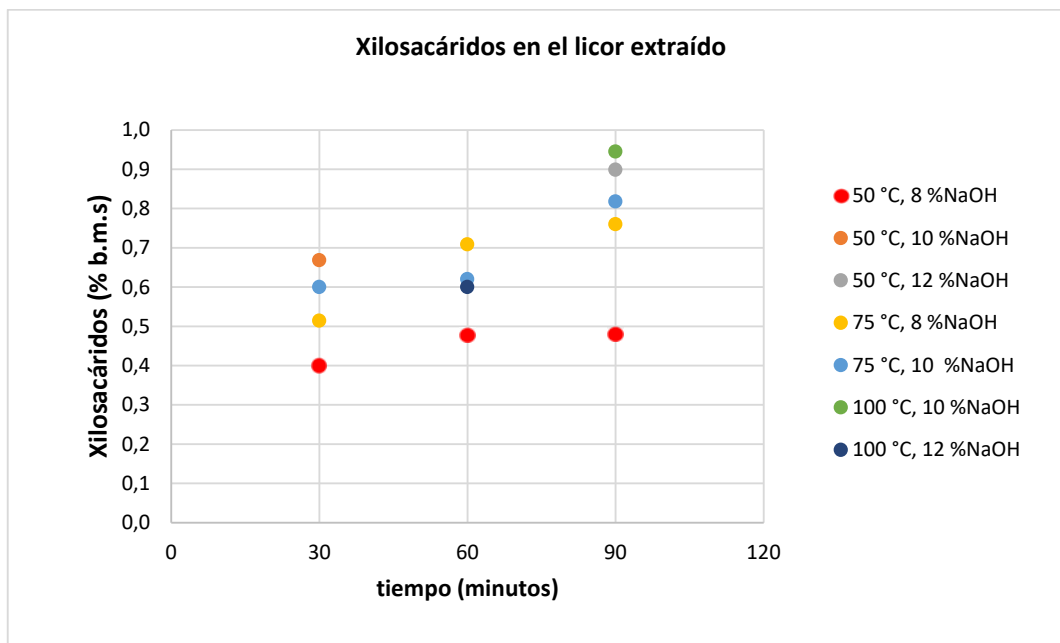


Figura 10-6. Xilosacáridos presentes en el licor en las distintas condiciones de extracción ensayadas.

No se observa una tendencia clara respecto al contenido de xilosacáridos extraídos; pudiendo decirse a priori, que el mismo aumentó con el tiempo, manteniendo fija la carga de NaOH (%) y la temperatura de extracción. Sin embargo, para las otras variables analizadas, no fue posible determinar el comportamiento. De todas formas, en las condiciones ensayadas, se extrajo menos del 7% de los xilosacáridos presentes en la madera original, valor muy por debajo de lo considerado aceptable pensando en un posterior escalado, por lo que se resolvió no continuar con la realización de este diseño experimental.

Por otro lado, los valores obtenidos son comparables a Shimizu *et al.* (Shimizu *et al.*, 2018), quienes reportaron una extracción de entre 4 y 11 % de las hemicelulosas presentes en ramas de banano, trabajando con cargas de H_2O_2 entre 2 y 8 % (no se indica carga de soda o pH de trabajo), a 25 °C durante 4 horas, tiempo bastante mayor al utilizado en este trabajo en condiciones similares de carga. En el trabajo de Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2011), mencionado previamente, se reportó una extracción de xilanos entre 3 - 22,5 %, muy superior a las obtenidas en este trabajo. En el trabajo de estos autores, el contenido de xilanos en la extracción fue cuantificado por la diferencia entre el contenido de xilanos en la biomasa inicial y la biomasa extraída, lo que tiene implícitamente en cuenta, el material que pudo haberse perdido en los lavados, etc. Esta diferencia en las metodologías utilizadas podría explicar los diferentes resultados encontrados con este trabajo.

Gupta *et al.* (Gupta and Lee, 2010) utilizaron madera de álamo de dos tipos, una a la que llamaron “de alto contenido de lignina” (29,1 % lignina total, 14,9 % xilanos) y otra “de bajo contenido de lignina” (21,4 % lignina, 17,8 % xilanos). Extrajeron durante 24 horas a 80 °C con una carga de 1,5 y 5 % NaOH (y 5 % de H_2O_2 en ambos casos), logrando una remoción de 19 - 35 % de los xilanos presentes en la madera de alto contenido de lignina y entre 27 - 40 % de los xilanos en el caso de la madera con bajo contenido de lignina. Particularmente, el tiempo

ensayado fue muy superior a los de nuestro trabajo y ello explicaría los mejores valores en la remoción de hemicelulosas que obtienen los autores. Por otro lado, los autores remarcan la influencia del contenido de lignina en la eficacia de remoción de hemicelulosas, ya que ha menor contenido de lignina aumenta la accesibilidad a las cadenas de hemicelulosas.

La Figura 10-7 muestra la absorbancia del licor a 280 nm como medida indirecta del contenido de lignina en el licor.

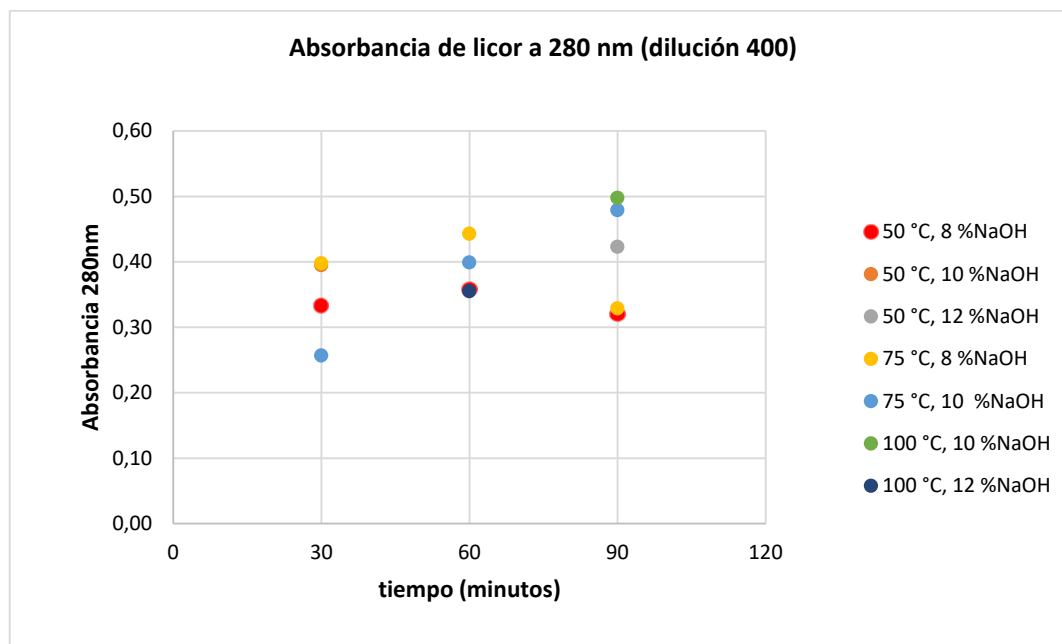


Figura 10-7. Absorbancia a 280nm de los licores extraídos (dilución 400)

No se observa una tendencia clara del comportamiento de la absorbancia a 280nm con las diferentes variables. Dada las bajas temperaturas de trabajo utilizadas, la remoción de lignina es baja, incluso si se compara con los resultados obtenidos cuando se trabaja sólo con álcali a baja temperatura (90 °C) (Capítulo “Tratamiento con hidróxido de sodio), aunque en ese caso, los tiempos utilizados fueron mucho mayores (6 y 8 horas).

10.4.2. Serie B: Condiciones más exhaustivas de reacción (mayor carga de químicos y/o tiempo).

La Figura 10-8 muestra los rendimientos de extracción obtenidos al trabajar en las condiciones reportadas en la Tabla 10-2.

Se observa que, trabajando a temperatura y tiempo constante, el rendimiento aumentó linealmente con la carga de soda aplicada en la extracción hasta una carga de 30 %, para luego mantenerse constante. Cuando se trabajó a una misma temperatura y carga de soda constante, el rendimiento no tiene una tendencia clara, aumentando hasta los 240 minutos, pero posteriormente descendiendo severamente.

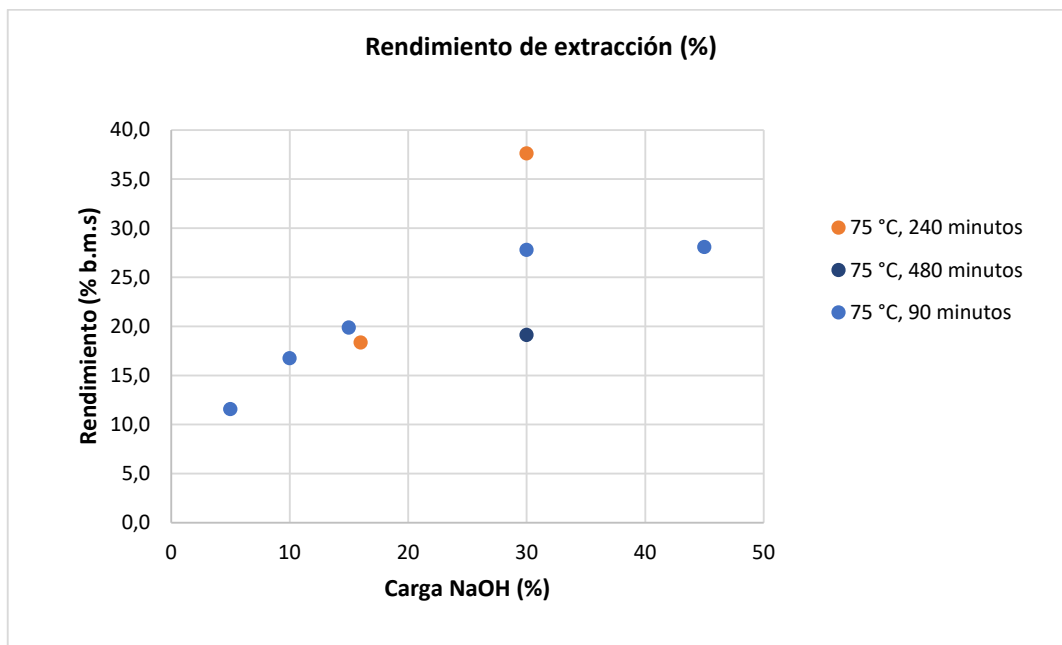


Figura 10-8. Rendimientos de extracción obtenidos al trabajar en condiciones más severas.

De acuerdo a la Figura 10-9, la concentración de xilosacáridos en el extracto aumentó linealmente con la concentración de NaOH:H₂O₂, cuando se trabajó a temperatura y tiempo constantes. Sin embargo, al variar el tiempo de extracción para una misma carga de soda y temperatura, el aumento del tiempo influyó negativamente en la concentración de los carbohidratos extraídos. Una posible explicación de este fenómeno estaría dada por la redeposición de los xilosacáridos extraídos en la superficie del sólido. En la condición donde se logró la mayor extracción de xilosacáridos, se removió un 36 % de los mismos (5,9 % de los xilanos en base madera seca).

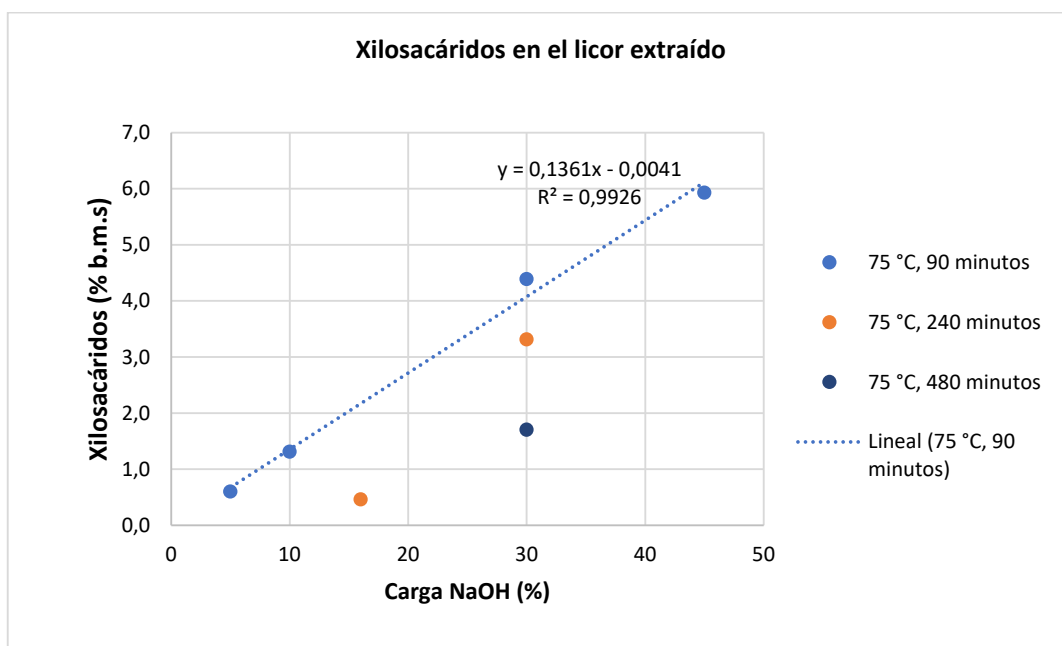


Figura 10-9. Xilosacáridos presentes en el licor al aplicar condiciones de extracción más severas.

Sun *et al.* (Sun *et al.*, 2000), utilizando paja de trigo y realizando la extracción a 50 °C, durante 4 - 30 horas con una carga de H₂O₂ de 60 % (pH 11,5) reportaron una extracción de entre 75 - 90 % de las hemicelulosas y 79 - 86 % de la lignina inicial, valores superiores a los obtenidos en este trabajo, aunque las condiciones aplicadas también fueron mayores a las utilizadas aquí. En el trabajo de Rabelo *et al.* (Rabelo, Andrade, Maciel Filho and Costa, 2014), se obtuvieron rendimientos de extracción del 55 %, trabajando con bagazo de caña y en condiciones de mayor carga de H₂O₂ (73,6 % H₂O₂ en b.m.s.) a menor temperatura (25 °C) durante 60 minutos. Los autores reportaron una extracción de hemicelulosas y lignina de alrededor al 70 %. Li *et al.* (Li *et al.*, 2018) utilizaron mazorcas de maíz y realizaron un tratamiento con 50 % H₂O₂ (pH 11,5) a 30 °C por 24 horas. En estas condiciones extrajeron el 56 % de las hemicelulosas iniciales y 92 % de la lignina inicial. Gupta & Lee (Gupta and Lee, 2010) trabajado a 60 °C y durante 24 horas y con carga de 50 % de soda y peróxido, reportaron una extracción de alrededor 40 % de los xilosacáridos originariamente presentes en madera de álamo; valor similar al obtenido en este trabajo en las condiciones más exhaustivas aplicadas. Como puede observarse, los rendimientos de extracción de hemicelulosas son dispares entre los autores y dependientes del material y condiciones utilizados. Estas últimas tienden a tiempos largos de reacción, alta carga de soda : peróxido y bajas temperaturas.

Los pH de los licores finales estuvieron en el entorno de 12,7 – 13,0 para cargas de NaOH: H₂O₂ de 10 % o superiores.

Sobre las tres condiciones que presentaron mayor extracción de xilosacáridos se precipitaron los mismos con un volumen de etanol, ajustando previamente el pH a 7 con ácido clorhídrico. Al ajustar el pH a 7, precipitó entre el 8 – 14 % de los sólidos disueltos y entre el 10 – 20 % de los xilosacáridos. La Figura 10-10 muestra una imagen de uno de los precipitados obtenidos.



Figura 10-10. Precipitado obtenido al agregar etanol a pH=7 sobre el licor extraído a 75 °C, 30% NaOH (Relación NaOH: H₂O₂=1) y 90 minutos.

Como se observa en la Figura 10-10, los precipitados obtenidos luego de agregar etanol fueron de color negro, lo que indica una importante presencia de lignina o derivados de la misma. El aspecto es de un plástico quebradizo.

El precipitado obtenido a partir del licor extraído a 75 °C, 90 minutos y 30 % soda: peróxido se disolvió en NaOH 0,1M y se analizó en términos de contenido de xilosacáridos, absorbancia a 280 nm y distribución de peso molecular, obteniéndose los datos que se muestran en la Tabla 10-3. La baja cantidad precipitada de los otros dos licores (dado que se partió de menos volumen de licor, por no disponer del mismo), no permitió que se pudieran redisolver. Sin embargo, no se estima que existan diferencias sustanciales con el precipitado analizado.

Al igual que los precipitados obtenidos en el tratamiento realizado únicamente con hidróxido de sodio, el precipitado está compuesto por un 30 % de xilosacáridos, observándose también la presencia de grupos fenólicos, dada indirectamente por la medida de absorbancia a 280nm. Un 3% del precipitado corresponde a grupos acetilos.

Tabla 10-3. Distribución de pesos moleculares de los precipitados obtenidos a pH=9 y 1V de etanol de los licores extraídos, redisolultos en NaOH. (Conc. Prec. Disuelto: concentración del precipitado disuelto en la solución).

Distribución de pesos moleculares					Caracterización precipitado redisoluelto		
#	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn	%	Xil g/L	Abs 280 nm	Conc. Prec. disuelto (g/L)
Total	2553	14933	5,8		1,90 (27 %)	0,450 dil. 100	7,1
1	44334	44626		0,3			
2	20408	23102		56,9			
3	1111	1400		40,3			

El peso molecular ponderado medio (Mw) es de 14933 Da, un poco menor a los obtenidos en los ensayos del diseño experimental del tratamiento con hidróxido de sodio, donde, trabajando en el rango de temperaturas entre 105 °C y 155 °C, los pesos moleculares ponderados medios, se encontraron en el entorno de 25000 – 30000 Da. Sin embargo, el valor obtenido es comparable al Mw del precipitado obtenido extrayendo con alta carga de soda (21,7 %), 90 °C y 6 horas de extracción (Mw= 10752 Da). No está claro el efecto del peróxido en las características del precipitado. Al igual que en el precipitado obtenido en estas condiciones aparece una señal en el entorno de los 1500 Da y una señal en la región de los 25000 Da, lo que indica que ambos precipitados están compuestos por fracciones similares.

La presencia de xilosacáridos y fragmentos de lignina se confirma por el análisis de FTIR-ATR que se muestra en la Figura 10-11. En este caso, solo se muestra el precipitado obtenido a partir del licor extraído a 75 °C, 90 minutos y 30:15 % soda:peróxido. Los demás precipitados obtenidos presentaron características muy similares.

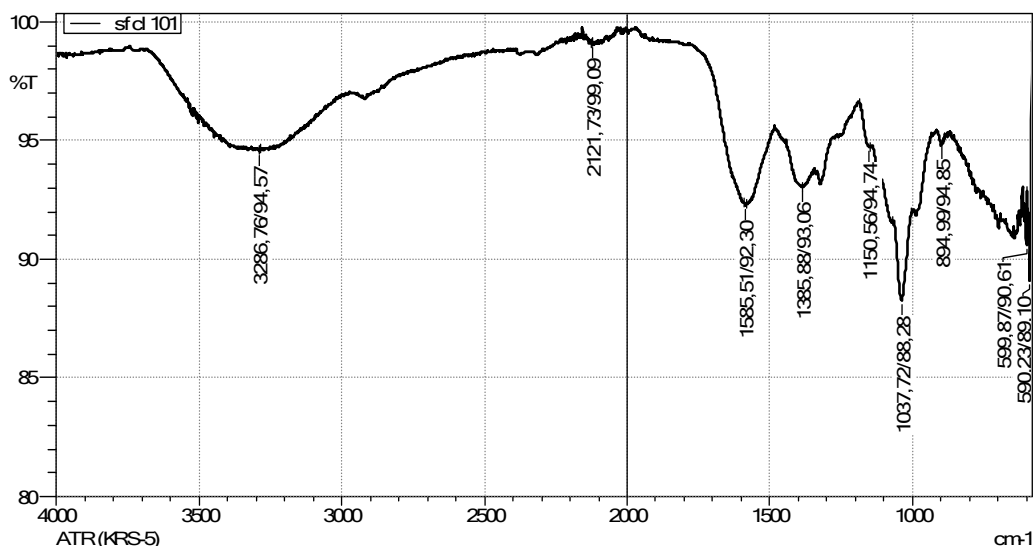


Figura 10-11. Espectros ATR-FTIR del precipitado obtenido por el agregado de 1V de etanol a pH 9 al licor extraído a 75 °C, 90 minutos y 30 % soda: peróxido.

En los precipitados se pueden observar las bandas en el entorno de 1040 cm^{-1} , de las vibraciones de estiramiento de C-C y C-O y de rotación de C-OH, asignadas a los (1-4)- β -xilanos, así como las bandas en la zona de $1160\text{-}1130\text{ cm}^{-1}$ correspondientes al estiramiento C-O-C y asignadas al enlace glicosídico. Se observa también el pico característico a 895 cm^{-1} , de rotación de C-H en el grupo furano, típico del enlace β -glicosídico. Estas bandas confirman la presencia de xilosacáridos en el precipitado. Se observa también, una banda ancha en la zona de 3300 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de estiramiento de los grupos O-H.

En la región entre $1427\text{ y }1242\text{ cm}^{-1}$ se pueden ver las bandas provocadas por las vibraciones de estiramiento C=O y de C-O-R, correspondientes a los ácidos metilglucorónico y grupos acetilos del precipitado.

Se observan claramente, las bandas en la región entre $1550\text{ y }1730\text{ cm}^{-1}$, de las vibraciones de estiramiento de los grupos C=C y C-H asignables a fragmentos de lignina.

10.5. Conclusiones

El tratamiento alcalino reforzado con peróxido de hidrógeno ha sido ensayado en dos rangos de condiciones, una considerada de baja-moderada carga de químicos, en rangos de condiciones utilizadas para el pulpeo semiquímico (Serie A), y en condiciones más fuertes de extracción dadas por la carga de químicos y mayor tiempo de reacción (Serie B), normalmente utilizadas para la aumentar la accesibilidad a la celulosa en un posterior tratamiento enzimático.

La remoción de xilosacáridos en las condiciones de trabajo de la Serie A ha sido muy baja, menor al 1 % de los xilosacáridos en base madera seca (7 % de los xilosacáridos presentes en la madera original), por lo que se descartan estas condiciones para la extracción de hemicelulosas.

Para las condiciones utilizadas en los ensayos de la Serie B, se logran condiciones de remoción de hasta 6 % xilosacáridos en b.m.s (36 % del contenido inicial de xilosacáridos), trabajando con una carga de soda:peróxido del 60:60 % (b.m.s). No obstante, las extremadamente altas cargas aplicadas en este caso hacen difícilmente rentable su utilización.

En condiciones de carga de soda similares a las utilizadas en el tratamiento realizado únicamente con soda (apartado 1.4), se obtienen rendimientos de extracción similares o más bajos, por lo que no se justifica la inclusión de este último. Las características y rendimientos del precipitado formado por el agregado de etanol reafirman lo antedicho.

Por lo precedente, en las condiciones evaluadas, el tratamiento con soda: peróxido de hidrógeno, no resulta atractivo como método de separación de las hemicelulosas presentes en la madera de eucalipto.

11. ENSAYOS DE PURIFICACION Y CONCENTRACIÓN: PRECIPITACIÓN CON SOLVENTES EN LICORES PROVENIENTES DEL TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO.

En este apartado se evaluarán las condiciones y características de la precipitación con solventes de las hemicelulosas extraídas de la madera por tratamiento hidrotérmico (autohidrólisis).

11.1. Objetivos específicos

- Evaluar distintas alternativas de precipitación con etanol, tomando como variables el pH del extracto, la relación volumen de extracto: volumen de solvente, temperatura de precipitación, incidencia de la agitación.
- Evaluar la incidencia del contenido inicial de xilanos en el extracto y la relación de xilanos y xilosa monómero.
- Analizar el rendimiento y características del precipitado obtenido mediante procesos de remoción de lignina previo al agregado de solvente de precipitación.
- Comparar el rendimiento de la fracción precipitada utilizando 4 solventes: etanol, metanol, isopropanol y dioxano. Comparar las características del precipitado formado con distintos solventes.
- Evaluar los rendimientos y características de los precipitados obtenidos precipitando escalonadamente las hemicelulosas.

11.2. Metodología

Para evaluar la precipitación con solventes, se utilizó una condición de autohidrólisis que permitiera lograr un alto rendimiento de extracción de hemicelulosas de la madera y a su vez, que una parte importante de estas no estuviera como monómero. Este estudio se hizo previo a la optimización multiparamétrica realizada en el apartado "Tratamiento hidrotérmico" y por ello no se trabajó con el punto que en este estudio se estimó como óptimo, sino con puntos cercanos que daban una buena relación de xilosacáridos en el licor y baja absorbancia a 280 nm. Particularmente, con el objetivo de obtener xilooligosacáridos, se buscaron condiciones en que se tuvieran una alta concentración de éstos. De esta forma se utilizaron las condiciones de tratamiento hidrotérmico de 160°C de temperatura y 60 minutos a esa temperatura (denominada 160°C, 60 min) y las de temperatura máxima de 160°C y 110 minutos (denominada 160°C, 110 min) y 140°C de temperatura máxima y 180 minutos a esa temperatura (denominada 140°C, 180 min) ya que, si bien la extracción de hemicelulosas es menor que en las otras, esta se encuentra fundamentalmente como oligosacárido y además la cantidad de lignina extraída es baja. Dado que el volumen de extracto obtenido en cada extracción es de aproximadamente 1L, estas condiciones se repitieron en varias oportunidades. Cada vez el extracto obtenido se analizó en términos de rendimiento de la extracción, pH, sólidos totales (a 105°C), carbohidratos monoméricos presentes en el extracto, carbohidratos totales (monómeros, oligómeros y

polímeros) y productos de degradación, de acuerdo con las técnicas descritas en el capítulo de “Tratamiento hidrotérmico”.

En la Tabla 11-1 se presentan las características principales de los extractos obtenidos. La Figura 11-1 muestra el licor obtenido luego de la extracción a 160°C, 110 minutos.

Tabla 11-1. Características de los extractos utilizados. (Prom $\pm$ σ). (b.m.s.: base madera original seca)

Condiciones extracción	Temperatura = 160°C tiempo a T máx.= 110min, n=7
Rendimiento extracción (% b.m.s.)	27,5 $\pm$ 4,7
% solidos disueltos en el extracto	2,3 $\pm$ 0,4
pH	3,3 $\pm$ 0,1
Xilosacáridos (g/L)	15,0 $\pm$ 2,1
Xilosacáridos (% b.m.s.)	11,1 $\pm$ 1,5
Xilosa (g/L)	2,5 $\pm$ 0,6
Xilosa (% b.m.s.)	1,8 $\pm$ 0,4
Grupos acetilos (% b.m.s.)	2,6 $\pm$ 0,4
Absorbancia a 280nm (dilución 1/100)	0,848 $\pm$ 0,176
Condiciones extracción	Temperatura = 140°C, tiempo a T máx.= 180min, n=3
Rendimiento extracción (% b.m.s.)	24,7 $\pm$ 3,2
% solidos disueltos en el extracto	2,4 $\pm$ 0,1
pH	3,4 $\pm$ 0,1
Xilosacáridos (g/L)	17,2 $\pm$ 2,5
Xilosacáridos (% b.m.s.)	12,4 $\pm$ 1,8
Xilosa (g/L)	2,8 $\pm$ 0,3
Xilosa (% b.m.s.)	1,9 $\pm$ 0,2
Grupos acetilos (% b.m.s.)	3,3 $\pm$ 0,6
Absorbancia a 280nm (dilución 1/100)	1,828 $\pm$ 0,324
Condiciones extracción	Temperatura = 160°C, tiempo a T máx.= 60min, n=3
Rendimiento extracción (% b.m.s.)	18,2 $\pm$ 1,6
% solidos secos en el extracto	2,2 $\pm$ 0,1
pH	3,8 $\pm$ 0,1
Xilosacáridos (g/L)	13,4 $\pm$ 2,0
Xilosacáridos (% b.m.s.)	9,1 $\pm$ 1,5
Xilosa (g/L)	1,2 $\pm$ 0,3
Xilosa (% b.m.s.)	0,85 $\pm$ 0,1
Grupos acetilos (% b.m.s.)	1,5 $\pm$ 0,3
Absorbancia a 280nm (dilución 1/100)	0,647 $\pm$ 0,043

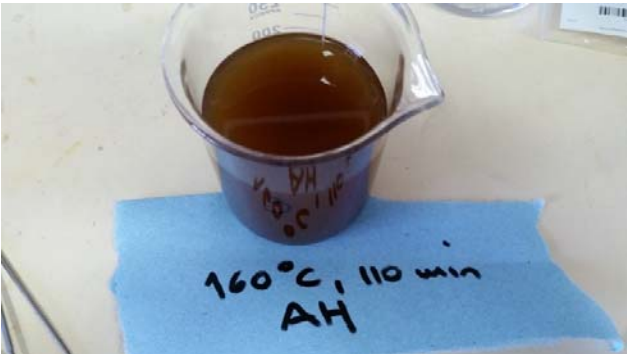


Figura 11-1. Licor extraído del tratamiento hidrotérmico a 160°C y 110 minutos a temperatura máxima.

11.3. Ensayos realizados

De acuerdo con la revisión bibliográfica y considerando siempre la utilización de un procedimiento que posteriormente pueda ser escalable, se seleccionaron 4 solventes para comparar la eficiencia de la precipitación de hemicelulosas. Estos solventes fueron: metanol, etanol, isopropanol y 1-4 Dioxano. Primeramente, se ensayaron diferentes condiciones de precipitación con etanol (por disponibilidad y costo) y posteriormente estas condiciones fueron aplicadas al resto de los solventes utilizados, considerando a priori que deberían tener similar comportamiento con las variables ensayadas.

11.3.1. Precipitación utilizando etanol como solvente

Se evaluaron diferentes parámetros que pueden influir en el rendimiento de la separación.

- a) Relación de volumen de solvente a volumen de licor conteniendo las hemicelulosas: se trabajó con una relación de EtOH : licor entre 1:1 y 4:1.
- b) Incidencia de la temperatura en la separación. Luego de realizar la mezcla licor/solvente se dejó decantar el precipitado obtenido durante 48 horas, en un ambiente controlado, sin agitación. Se analizaron los rendimientos obtenidos al decantar el residuo a temperatura ambiente y a 4°C.
- c) Efecto del pH. Se trabajó con el pH sin ajustar (aproximadamente 3,3) y ajustado a 5,7, de acuerdo a referencias bibliográficas (Bian *et al.*, 2010; Peng, 2012).
- d) Agregado de etanol al sobrenadante de una precipitación anterior, para determinar cómo cambia el rendimiento y las especies precipitadas.
- e) Incidencia de la agitación durante el mezclado del solvente. Se evaluó la diferencia de rendimientos al agitar esporádicamente la mezcla y con una agitación controlada por 30 minutos.
- f) Contenido de hemicelulosas en el licor inicial. La muestra de licor obtenida se rotaevaporó a 40°C para concentrar los xilosacáridos y eliminar el ácido acético de la muestra.
- g) Precipitación previa de lignina por disminución del pH. Se acidificó a pH =2 y se separó el precipitado por centrifugación previo al agregado de etanol.
- h) Separación de lignina y otros compuestos, previo a la precipitación, por extracción líquido – líquido, utilizando acetato de etilo como extrayente.

Las tres primeras experiencias, detalladas a continuación, se realizaron y analizaron en simultáneo. Luego, con las mejores condiciones obtenidas de estas tres experiencias, se realizaron las experiencias siguientes, donde se estudiaron los otros parámetros.

Experiencia 1: relación de volumen de solvente a volumen de licor.

Se tomaron 50 mL de licor (1V) a temperatura ambiente y se agregaron de 1 a 4 volúmenes (1V a 4V) de etanol con agitación manual. Se dejó por 48 horas a temperatura ambiente y se filtró el precipitado a vacío utilizando filtros de HVLP de 0,45µm de poro.

Experiencia 2: incidencia de la temperatura de decantación

Para evaluar la temperatura de decantación se repitió el procedimiento descrito en la experiencia 1, pero en lugar de dejar decantar el precipitado a temperatura ambiente, se dejó a una temperatura de 4°C.

Experiencia 3: efecto del pH

Se realizó el procedimiento descrito en la Experiencia 1, con la variante que se ajustó el pH = 5,7. Se dejó decantar a temperatura ambiente y a 4°C durante 48 horas.

Experiencia 4: efecto de la agitación durante el agregado de etanol.

Se agregó el etanol al licor extraído en un matraz con agitación magnética. Una vez finalizado el agregado de etanol, se continuó agitando el matraz por 30 minutos y se dejó decantar el precipitado a 4°C por 48 horas. Se ensayó esta condición para la extracción 160°C, 110 min. Se trabajó con el pH ajustado en 5,7 y con una relación de etanol: licor de 4V. Sobre el líquido remanente luego de filtrar se repitió el procedimiento agregando otros dos volúmenes de etanol.

Experiencia 5: incidencia de la concentración de xilosacáridos en el licor.

Para evaluar como incide la concentración de Xilosacáridos contenidos en el licor extraído, se concentró el mismo por rotaevaporación a 38°C, hasta que el volumen se redujo a 1/3 del volumen inicial (5a).

Paralelamente, a los efectos de utilizar condiciones similares a las que se pueden utilizar en la industria, se repitió el procedimiento anterior, pero concentrando ahora en estufa de vacío, con un vacío de 0,9 atm a 40°C (5b).

En ambos casos, se agregaron 4V de etanol, trabajando con el pH de extracto ajustado y sin ajustar, y se agitó durante 30 minutos después del agregado de etanol. Se dejó decantar a 4 °C por 48 horas.

Experiencia 6: efecto de la precipitación previa de lignina a pH=2

Se bajó el pH a 2, centrifugando a 3000g por 20 minutos para remover lignina y sobre el sobrenadante se adicionaron 4 volúmenes de etanol con agitación magnética. Se dejó decantar por 48 horas a 4°C.

Experiencia 7: Extracción con acetato de etilo (AcOEt) y precipitación con etanol.

A los efectos de remover contaminantes de las hemicelulosas en el extracto (fenoles, furfural, ácido acético, entre otros) para obtener un precipitado más puro en hemicelulosas, se realizó una extracción líquido-líquido usando acetato de etilo. Las condiciones de extracción fueron optimizadas en un trabajo anterior (Cebreiros, Guigou and Cabrera, 2017), en el cual se concluyó que la mejor forma de remover los contaminantes, minimizando las pérdidas de oligosacáridos en el extracto acuoso es trabajando a pH=2,5 y realizando la extracción en 3 etapas y con una relación volumen extracto acuoso: volumen AcOEt de 1 a 1 en cada etapa. Del extracto orgánico, posteriormente se pueden recuperar ácidos fórmico, acético y furfural por destilación fraccionada (Cebreiros, Guigou and Cabrera, 2017). En este trabajo no se evaluó la recuperación

de polifenoles y derivados de lignina, los cuales también se desplazan a la capa orgánica durante la extracción. Para este ensayo se utilizó el licor obtenido en las condiciones de autohidrólisis de 160°C, 110 minutos, trabajando con el licor tal como se obtiene y con el licor concentrado 3 veces en estufa de vacío y se realizó la extracción líquido-líquido del modo mencionado previamente.

La Tabla 11-2 muestra las condiciones utilizadas de las diferentes experiencias.

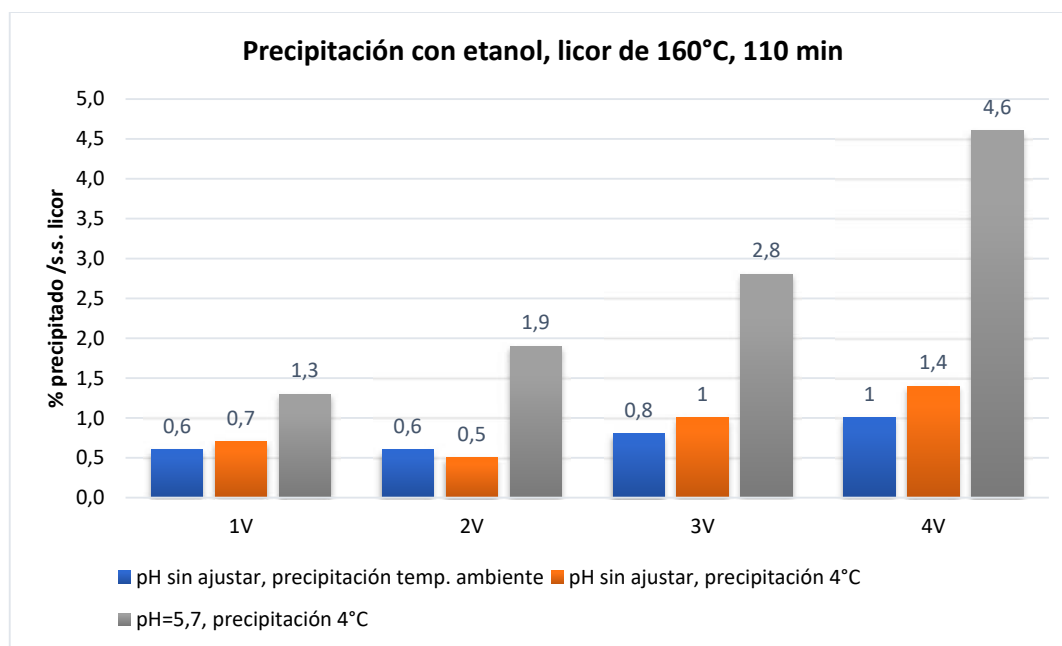
Tabla 11-2. Experiencias de precipitación de hemicelulosas con etanol.

Experiencia	Condición de extracción	pH licor	Relación EtOH:licor	Tipo de agitación	Temperatura decantación
1	160°C.110min	3,3	1	manual	Ambiente
			2		
			3		
			4		
	140°C.180min		1		
			2		
			3		
			4		
2	160°C.110min	3,3	1	manual	4°C
			2		
			3		
			4		
	140°C.180min		1		
			2		
			3		
			4		
3	160°C.110min	5,7	1	manual	4°C
			2		
			3		
			4		
	140°C.180min		1		
			2		
			3		
			4		
4	160°C.110min	5,7	4 4+2	Agitador magnético	4°C
5a	160°C.110min concentrada 3 veces mediante rotaevaporador	5,7	4 4+2	Agitador magnético	4°C
5b	160°C.110min concentrada 3 veces mediante estufa de vacío		4 4+2		
	160°C. 60min concentrada 3 veces mediante estufa de vacío		4 4+2		
	140°C 180min concentrada 3 veces mediante estufa de vacío		4 4+2		
6	140°C,180min	2 y separando precipitado previo agregado de etanol	4 4+2	Agitador magnético	4°C
7	160°C.110min	Extracción L-L con acetato de etilo	4 4+2	Agitador magnético	4°C
	160°C.110min concentrada 3 veces mediante estufa de vacío		4		
			4+2		

Una vez evaluadas las condiciones de precipitación anteriores, se realizó la precipitación de hemicelulosas de forma escalonada (Experiencia 8). Para ello se partió del licor extraído por autohidrólisis en dos condiciones: 160°C, 110 minutos y 160°C, 60 minutos. Se trabajó con el licor con el pH ajustado en 5,7, y se agregó el etanol con agitación magnética durante y posterior al agregado, de acuerdo con lo reportado previamente. Se dejó decantar por 48 horas a 4°C y se separó el precipitado por filtración. En primera instancia, se agregó etanol en una relación 1:1 y luego de separar los sólidos por filtración se agregó otro volumen de etanol sobre el sobrenadante. Se repitió el procedimiento hasta una relación EtOH: licor de 5:1.

11.4. Resultados y discusión

En la Figura 11-2 se muestran los resultados obtenidos en las primeras 3 experiencias, expresados en términos de porcentaje en masa de precipitado obtenido por gramo de sólidos secos disueltos en el licor a precipitar (% precipitado / s.s. licor).



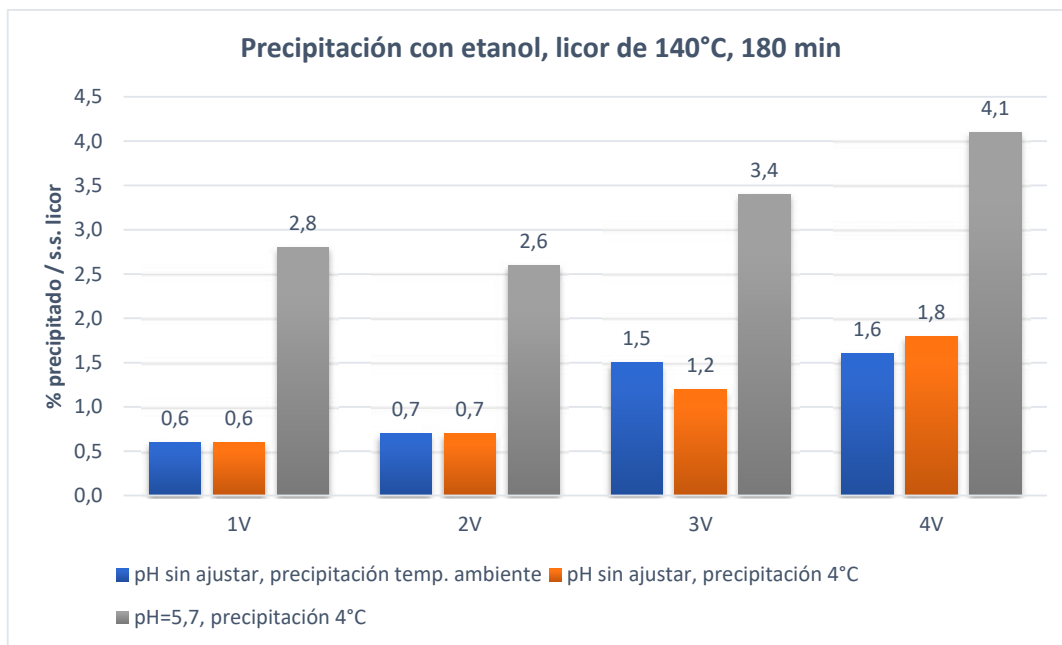


Figura 11-2. Resultados obtenidos al agregar etanol en las experiencias 1-3 para dos condiciones diferentes de tratamiento hidrotérmico.

Los precipitados obtenidos al agregar etanol a los extractos hidrotérmicos presentan un rendimiento muy bajo, menor a 5%, en las 3 experiencias analizadas. Analizando la relación de volumen de etanol a volumen de licor a agregar, el rendimiento mayor se obtiene trabajando con una relación de 4:1. Se observa una mejoría en el rendimiento de precipitación al ajustar el pH a 5,7, tal como lo sugiere la literatura (Bian *et al.*, 2010; Egüés *et al.*, 2012). Referente a dejar precipitar a temperatura ambiente o a 4°C, si bien no se observan diferencias relevantes en ambas condiciones, los precipitados obtenidos a 4°C, presentan mayor tamaño de los cristales y son más fáciles de filtrar. Las mismas observaciones, se manifiestan para las dos condiciones de extracción ensayadas.

En la Figura 11-3 , se muestra la incidencia de la agitación durante y posterior al agregado de etanol (experiencia 4) y de la concentración de xilosacáridos en el extracto a precipitar (experiencias 5a y 5b).

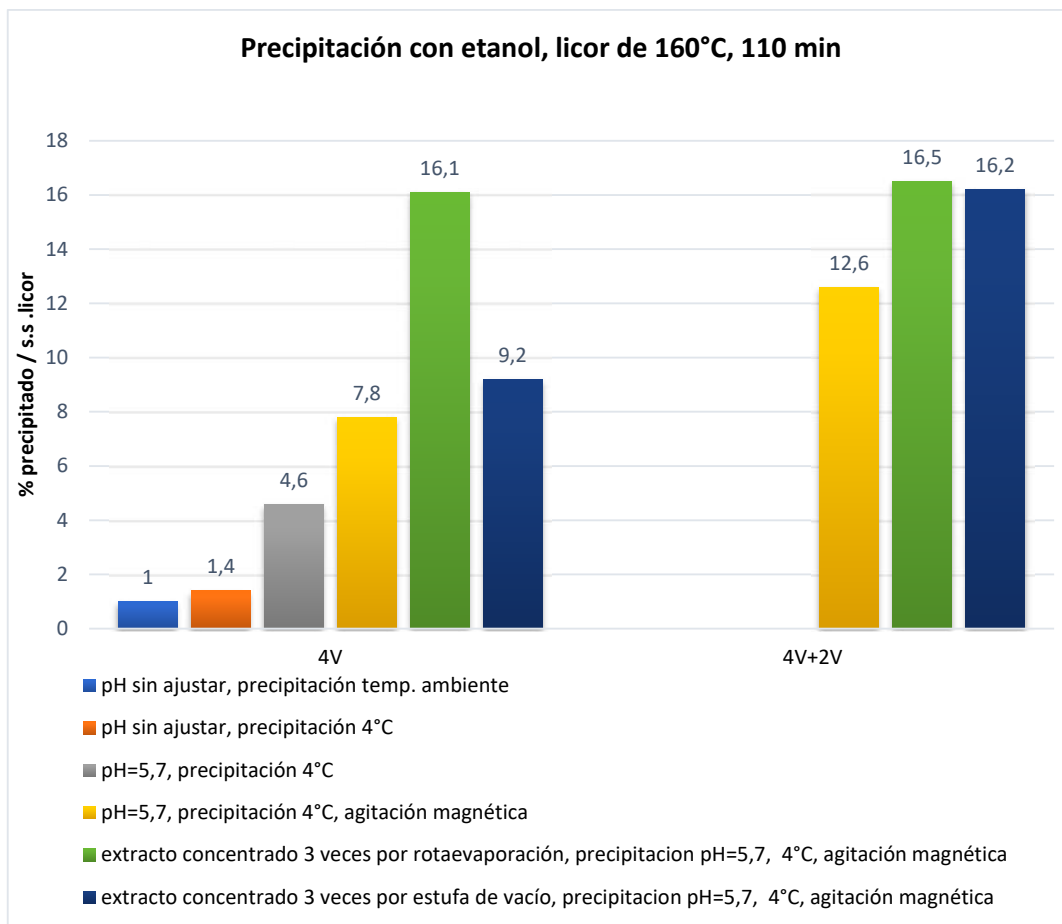


Figura 11-3. Rendimientos de precipitación obtenidos para el agregado de 4 volúmenes de etanol, en distintas condiciones de precipitación y de concentración de xilosacáridos en el extracto. El valor de 4V+2V, refiere al precipitado total obtenido, al agregar 2 volúmenes más de etanol al sobrenadante, luego de separar el precipitado obtenido por el agregado de 4 volúmenes de etanol.

La agitación de la solución, durante y posterior al agregado de etanol, mejora sensiblemente el rendimiento de precipitación, mientras que trabajar con muestras más concentradas también tiene un efecto positivo en el rendimiento. La Figura 11-4 muestra el aspecto del sólido obtenido luego de la precipitación.



Figura 11-4. Sólido precipitado luego del agregado de 4V de etanol a pH=5,7 al extracto obtenido en el tratamiento hidrotérmico a 160°C y 110min (Experiencia 4).

Con las condiciones de precipitación con etanol establecidas hasta ahora (pH ajustado a 5,7, agitación magnética durante y posterior al agregado de etanol, 48 horas de sedimentación a 4 °C), se analizó el efecto de la precipitación en muestras concentradas por estufa de vacío para las tres diferentes condiciones de tratamiento hidrotérmico ensayadas. Los resultados se muestran en la Figura 11-5.

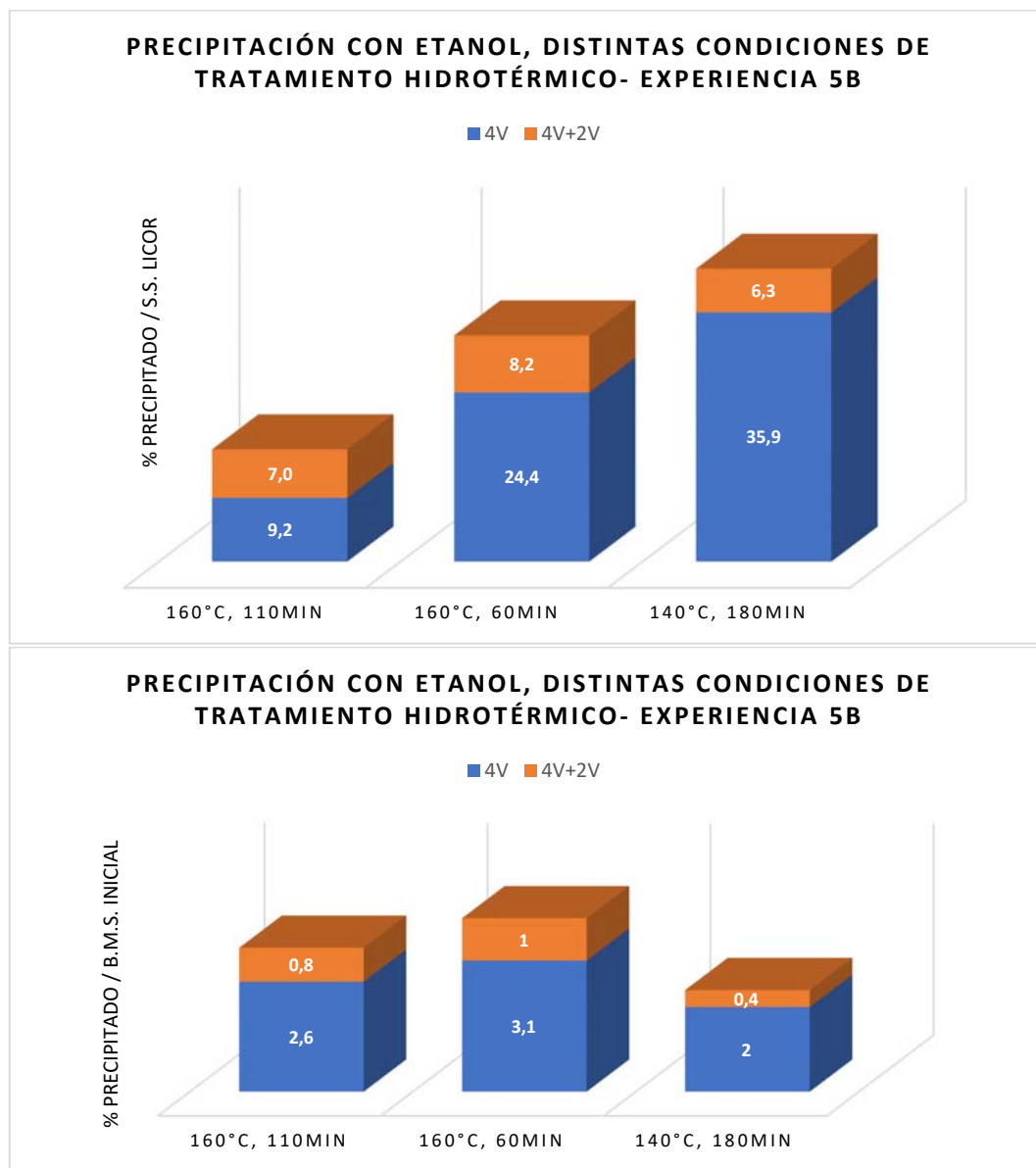


Figura 11-5. Precipitación con etanol en muestras concentradas 3 veces su volumen original (concentración por estufa a vacío a 40°C). Las condiciones de precipitación son: pH=5,7, agitación magnética durante y posterior al agregado de etanol y sedimentación a 4°C durante 48 horas. Rendimientos de precipitación referidos a: a) cantidad de sólidos disueltos secos en la solución a precipitar, b) masa de aserrín previo al tratamiento hidrotérmico realizado (%precipitado/b.m.s. inicial)

La Figura 11-5 muestra que al trabajar con muestras más concentradas (experiencia 5), el rendimiento de precipitación mejora, llegando a 40% de los sólidos inicialmente disueltos en el licor extraído. Asimismo, el consumo de solvente es menor, ya que la relación vol EtOH: vol licor

se realiza considerando el volumen concentrado (1/3 del original en el caso de los ensayos). La relación de vol EtOH: vol licor que muestra mejores resultados respecto al rendimiento de precipitación, es la condición 4:1.

Como puede observarse en las Figura 11-6, el color de los precipitados obtenidos en la primera precipitación es oscuro (pardo-negro, indicativo de la presencia de compuestos provenientes de lignina), mientras que cuando se realiza una segunda precipitación (por ej. 4+2V), el color del segundo precipitado es amarronado-amarillento.



Figura 11-6. a. Licor concentrado 1/3 de su volumen inicial y con el agregado de 4V de etanol (pH=5.7). **b.** Precipitado obtenido a partir de la muestra de la izquierda, luego de 48 horas de sedimentación a 4°C. **c.** Precipitado obtenido al agregar 2 volúmenes de EtOH al sobrenadante de la precipitación mostrada arriba. Las imágenes corresponden a la Experiencia 5a.

Analizando la composición de los extractos antes y después de concentrar, se puede decir que la relación de las concentraciones de los distintos componentes del licor (carbohidratos, ácidos y lignina) se mantiene, esto es, se triplica al disminuir el volumen a la tercera parte; a excepción del ácido fórmico, cuya concentración se encuentra entre 2-2,4 veces la concentración inicial al disminuir 3 veces el volumen. Siendo el ácido fórmico el componente con el menor punto de ebullición de las especies cuantificadas, se asume que existe cierta evaporación de este ácido en los tratamientos con vacío.

En la Experiencia 6 se buscó remover la lignina para lo cual se acidificó el extracto, bajando el pH a 2 y sobre el sobrenadante se precipitaron las hemicelulosas con etanol, utilizando las condiciones establecidas previamente. Los resultados se muestran en la Figura 11-7 .

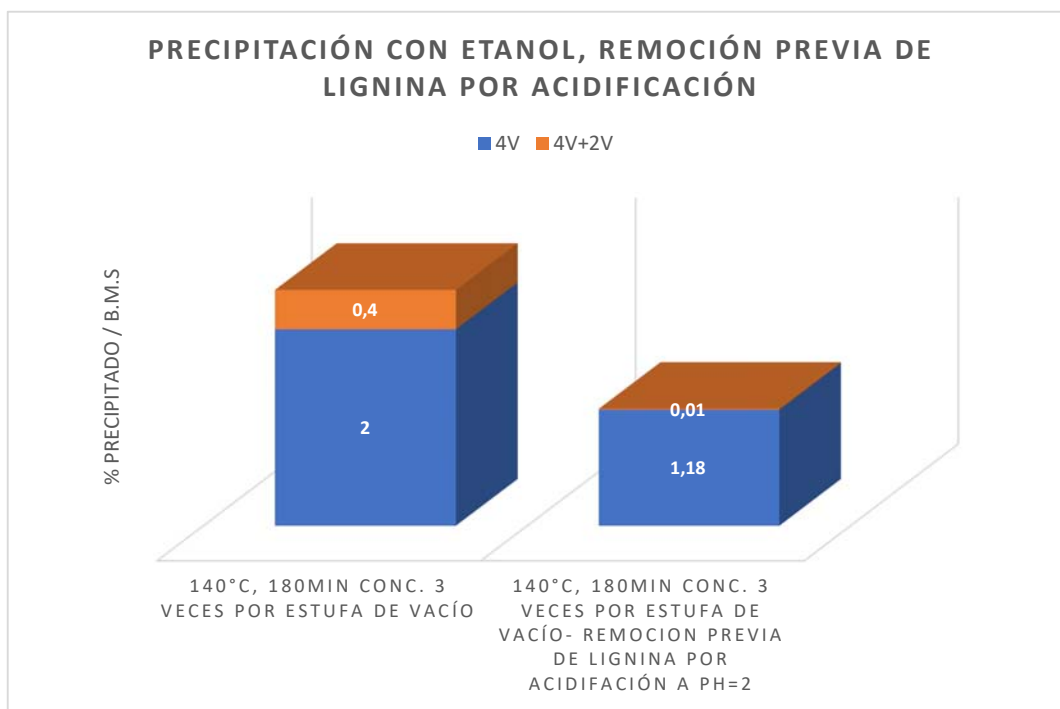
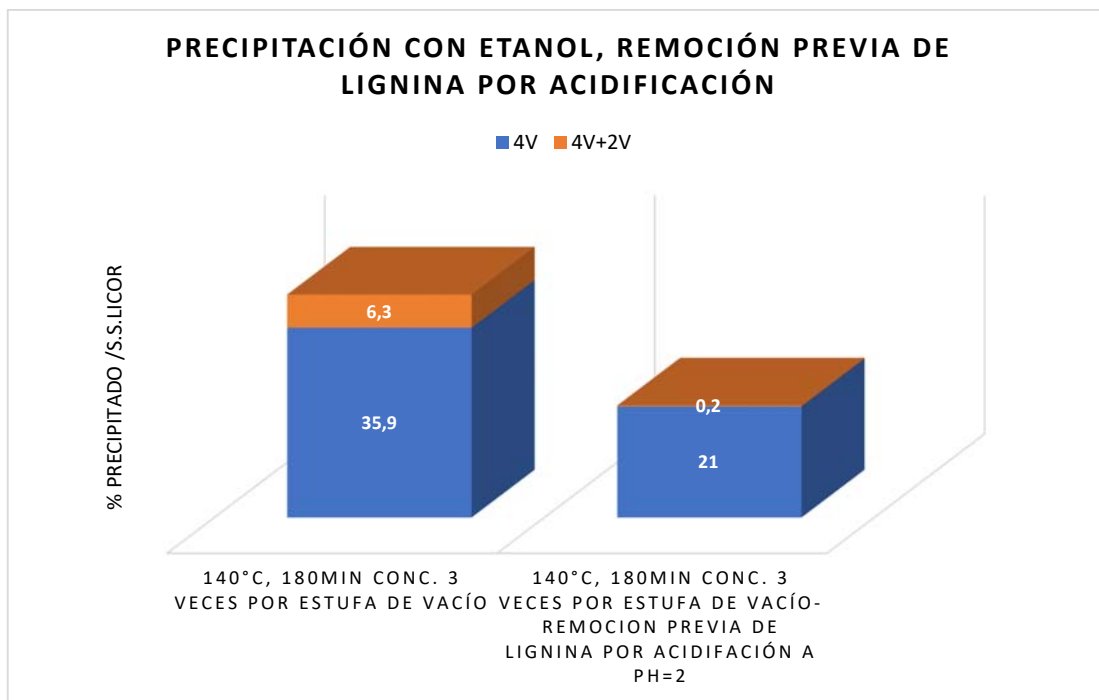


Figura 11-7. Variación del rendimiento al separar la lignina por acidificación a pH 2 previo al agregado de etanol

Al disminuir la lignina de la solución el rendimiento de precipitación disminuye comparado con las mismas condiciones sin remoción previa de lignina. Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 11-8, el precipitado obtenido tiene un color amarillo-amarronado brillante a diferencia de los precipitados negros-pardos obtenidos a pH mayores. Esto es indicativo de una mayor

proporción de xilosácaridos en el precipitado obtenido. Este comportamiento también es reportado por Egüés *et al.* (Egüés *et al.*, 2012).



Figura 11-8. Precipitado obtenido al agregar etanol al sobrenadante de acuerdo con la Experiencia 6.

En general, los rendimientos de precipitación obtenidos se consideran muy bajos, llegando en el mejor de las condiciones a precipitar el 42,2% de los sólidos disueltos presentes en el licor, lo que equivale al 2,4% del material presente en el aserrín original (experiencia 5b, 140°C, 180 minutos). En las condiciones en que se obtiene mayor cantidad de precipitado respecto al aserrín original (Experiencia 5b, 160°C, 60 minutos) se obtienen 4,1 g de sólidos precipitados/ 100 g b.m.s, lo cual sigue siendo muy bajo. Sin embargo, estos resultados son comparables a otros reportados en la literatura.

Vázquez *et al.* (Vázquez *et al.*, 2005) obtuvieron resultados de alrededor de 5% de los sólidos iniciales disueltos en la solución, más bajos que los obtenidos aquí. Trabajaron con *Eucalyptus globulus* y realizando una autohidrólisis en dos etapas (130-150°C la primera etapa y 203°C la segunda, no se reporta el tiempo ni factores de severidad). Infieren que el menor rendimiento de precipitación que el obtenido con otras biomásas parece estar relacionado con el patrón de sustitución de los oligosacáridos, con una proporción comparativamente alta de grupos urónicos y / o con la presencia de otros componentes estabilizantes presentes en los licores de autohidrólisis de eucalipto.

Tunc (Tunc, 2008; Tunc and Van Heiningen, 2011) aplicaron tratamientos hidrotérmicos a una mezcla de maderas de frondosas del hemisferio norte, entre 130 y 170°C a 150 min a temperatura máxima. Precipitaron las hemicelulosas del extracto obtenido con 4 volúmenes de etanol y alcanzaron rendimientos de precipitación de carbohidratos entre 0,7 y 2,4 g /100 g b.m.s.; resultados similares a los obtenidos en este trabajo. Mientras que el precipitado representó solo una pequeña fracción de los carbohidratos oligoméricos del extracto obtenido a 160 y 170°C, a temperaturas inferiores, de 130 y 140°C, el rendimiento del precipitado fue similar al de los carbohidratos oligoméricos presentes en el extracto de hemicelulosas. Esto sugiere que la hidrólisis adicional de los carbohidratos extraídos es significativa a 160 y 170°C, lo que da como resultado un grado relativamente bajo de polimerización (DP) y oligómeros que permanecen solubles tras la adición de etanol.

Willför y Holmbom, trabajando con arabinogalactanos de maderas de coníferas (extracciones acuosas), logran rendimientos de precipitación en etanol de alrededor del 80% tanto para *Piceas*

como para duramen de pinos. Los autores consideran que el precipitado está totalmente compuesto por carbohidratos en ambos trabajos (Willför and Holmbom, 2004).

Por otro lado, Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2011), trabajando con una mezcla de arce, abedul y álamo, realizaron un tratamiento hidrotérmico por 30 minutos a 170°C y con el objetivo de precipitar la lignina presente en el hidrolizado bajó el pH del licor a 2 y agregó 4 volúmenes de etanol al sobrenadante con agitación. En esas condiciones reportó una recuperación del 86 % de las hemicelulosas extraídas.

Experiencia 7: Extracción con acetato de etilo (AcOEt) y precipitación con etanol.

En la Figura 11-9 se puede observar que parte de los compuestos coloreados del extracto migran hacia la fase de acetato de etilo. Sobre los extractos acuosos obtenidos, se realizó la precipitación de hemicelulosas con las mismas condiciones experimentales que las utilizadas en la Experiencia 4.



Figura 11-9. Extracción con acetato de etilo del licor

Los resultados obtenidos luego de la precipitación con etanol se muestran en los gráficos de la Figura 11-10.

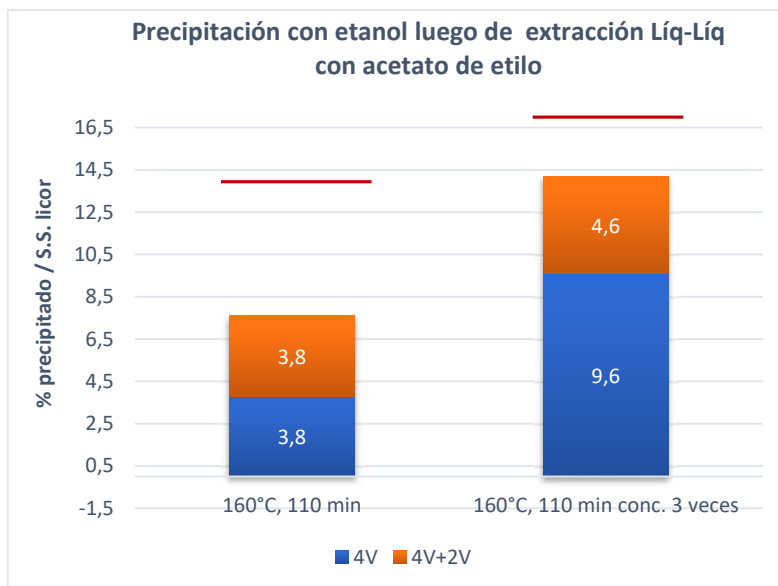


Figura 11-10. Precipitación de hemicelulosas con Etanol luego de extracción líquido-líquido con Acetato de etilo para remover derivados de lignina, furfural y ácido acético, entre otros. 3 veces se refiere a concentrado 3 veces mediante estufa de vacío.

La realización de una etapa previa de extracción líquido-líquido no mejora los rendimientos de precipitación, por el contrario, se aprecia una disminución de la cantidad precipitada (las líneas rojas en el gráfico indica los rendimientos obtenidos en la situación análoga sin extracción previa con acetato de etilo), la que se explica por el hecho que los compuestos fenólicos y ácidos alifáticos fueron removidos. Sin embargo, como es de esperar el precipitado cambia su aspecto, siendo ahora de un color blanco-amarillento, lo que indicaría menor presencia de lignina en el mismo.

Los resultados obtenidos son similares a los de Vázquez *et al.* (Vázquez *et al.*, 2005), quienes obtuvieron un rendimiento de precipitación de 11% en términos de sólidos disueltos no volátiles, al precipitar con etanol la fase acuosa remanente de una extracción con acetato de etilo, trabajando con *Eucalyptus Globulus*.

11.4.1. Caracterización química de los precipitados obtenidos

A los efectos de establecer el contenido de hemicelulosas de los precipitados obtenidos, se seleccionaron aquellos precipitados en que se obtuvieron mayores rendimientos o condiciones diferentes a otros precipitados. Se solubilizaron los mismos en agua hasta obtener una solución de 2g/L. Se determinaron carbohidratos monoméricos y totales y productos de degradación, de acuerdo al procedimiento NREL/TP-510-42623, absorbancia de la solución a 280nm y contenido de cenizas por calcinación del precipitado a 575°C para la condición 140°C, 180 min utilizada en las experiencias 5b y 6 (por disponibilidad de precipitado). En la Tabla 11-3 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 11-3. Caracterización química de los precipitados obtenidos en las experiencias 5b y 6 (n.d:indica no determinado).

Experiencia	Extracto utilizado	Xilosacáridos (%)	Glucosacáridos (%)	Ác acético (%)	Cenizas (%)
5b	160°C, 110min (4V EtOH)	45,6	19,6	0,9	n.d.
5b	160°C, 110min (4+2 V EtOH)	63,8	0,0	11,7	n.d.
5b	160°C, 60 min (4V EtOH)	46,9	5,1	7,4	n.d.
5b	160°C, 60 min (4+2 V EtOH)	54,7	0,0	7,5	n.d.
5b	140°C, 180 min (4V EtOH)	46,7	35,9	2,6	3,7
5b	140°C, 180 min (4+2 V EtOH)	49,6	0,2	0,0	n.d.
6	140°C, 180 min (4V EtOH) pH =2	48,1	12,8	1,3	17,3
7	160°C, 110min (4V EtOH), conc. 3 veces y extracción con ACOEt	24,1	6,7	0,0	n.d.
7	160°C, 110min (4+2 V EtOH), conc. 3 veces y extracción con ACOEt	37,6	0,0	4,4	n.d.

En general, se puede afirmar que el carbohidrato mayoritario presente en los precipitados son los xilosacáridos. Esta observación es coincidente con el trabajo de Liu *et al.* ((Liu *et al.*, 2011) y es esperable si se considera que los xilosacáridos son los componentes mayoritarios en el licor extraído; pero difiere con el trabajo de Tunc y Van Heiningen ((Tunc and Van Heiningen, 2011), quienes trabajaron con maderas de frondosas del sur de Estados Unidos y encontraron que los glucosacáridos fueron los carbohidrato predominantes en el precipitado. En éste, los autores señalan que factiblemente los xilosacáridos se encuentran en mayor proporción como oligosacáridos de bajo nivel de polimerización y por ello su tendencia a precipitar es menor que la de los glucosacáridos extraídos.

En los precipitados obtenidos en la Experiencia 5b, la proporción de xilosacáridos al agregar 4V de etanol fue de alrededor de 45 - 47 %, un poco inferior a los resultados de Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2011) quienes reportan un contenido de 55% de éstos en el precipitado. Al agregar una nueva proporción de etanol (4+2V), la proporción de xilosacáridos en el precipitado aumentó un 10%, siendo despreciable el contenido de glucosacáridos.

Si se comparan los precipitados provenientes del extracto obtenido a 140°C y 180 min, concentrado 3 veces, en las condiciones de precipitación de la experiencia 5b y en la experiencia 6, se observa que al eliminar previamente la lignina a pH =2, la proporción de xilosacáridos en el precipitado aumenta poco (48.1 frente a 46.7%) y aumenta considerablemente el contenido de cenizas, probablemente por formación de sales de sulfato al aumentar la concentración de ácido sulfúrico en la solución. Este comportamiento es similar al reportado en Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2011). Sin embargo, por el color del precipitado (amarillento), esta es una condición interesante, ya que, además, una interferencia por iones sulfato es más sencilla de purificar que los fragmentos que son precipitados al bajar el pH.

Experiencia 8: Precipitación escalonada.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11-11.

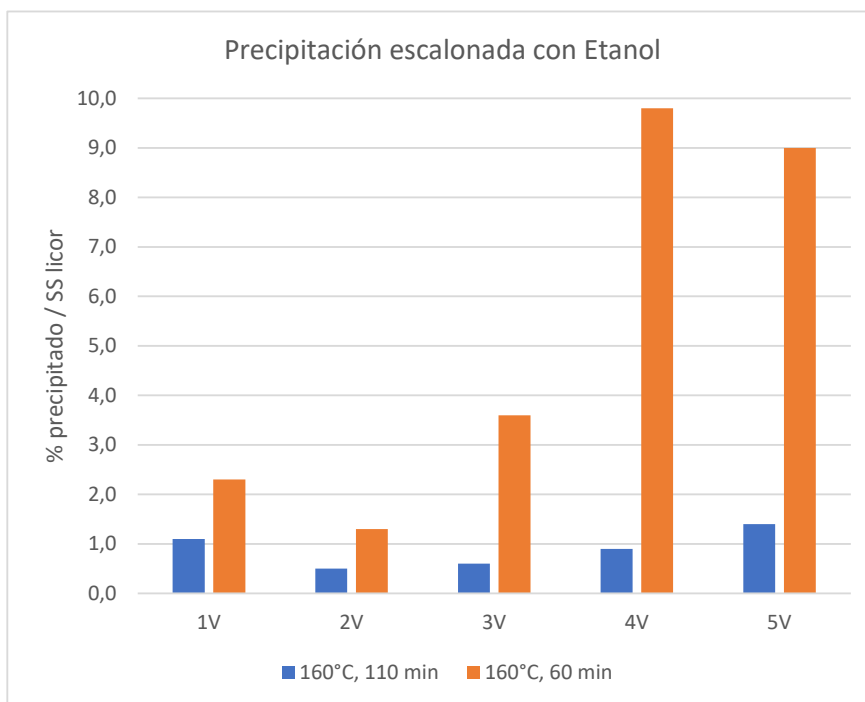
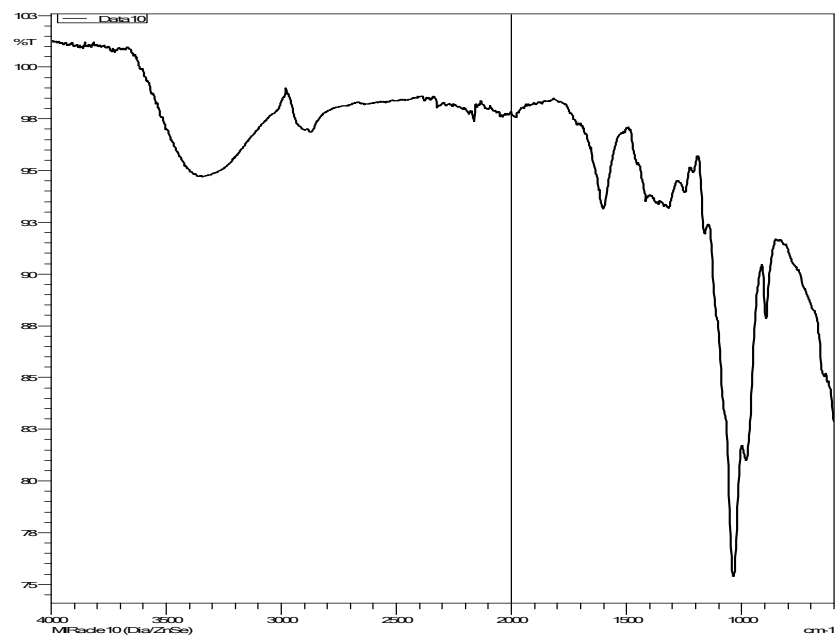
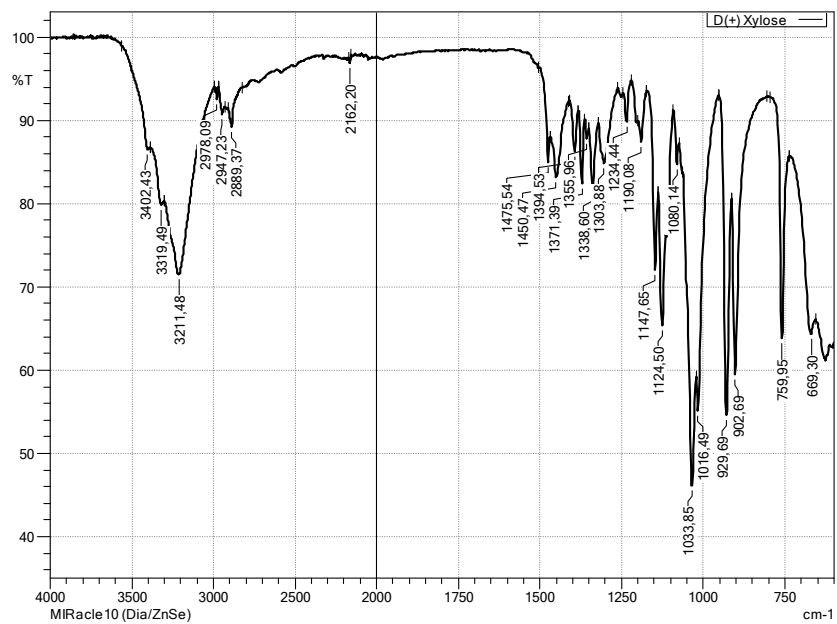


Figura 11-11. Resultados obtenidos en la precipitación escalonada de hemicelulosas con etanol.

Al igual que en las experiencias de precipitación en licores sin concentrar, los rendimientos de precipitación son muy bajos, alcanzándose en el mejor de los casos (160°C, 60 min, 4V), un rendimiento del 9.8 % respecto al contenido inicial de sólidos disueltos en el licor. Dada los magros resultados obtenidos y la complejidad en el procedimiento, se descartó esta opción para la obtención de xilosacáridos en los extractos provenientes del tratamiento hidrotérmico.

11.4.2. Análisis de los precipitados obtenidos por FTIR-ATR

A los efectos de obtener más información sobre la constitución química de los precipitados obtenidos se los analizó mediante espectroscopia FTIR-ATR. Para ello se utilizó un espectrómetro FTIR marca Shimadzu IR Affinity 1-S con accesorio de ATR Pike MIRacle. Los espectros se realizaron entre los números de onda de 4000 – 600 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} , siendo cada espectro el resultante de 32 escaneos. El ATR tiene una superficie óptica de 1.8 mm de diámetro de diamante/ ZnSe. A efectos comparativos se realizaron estándares de D(+)-xilosa de Sigma, Xilano de madera de haya de Sigma, y xilano de cáscara de avena de Fluka Analytics. En la Figura 11-12 se observan los espectros obtenidos de estos estándares.



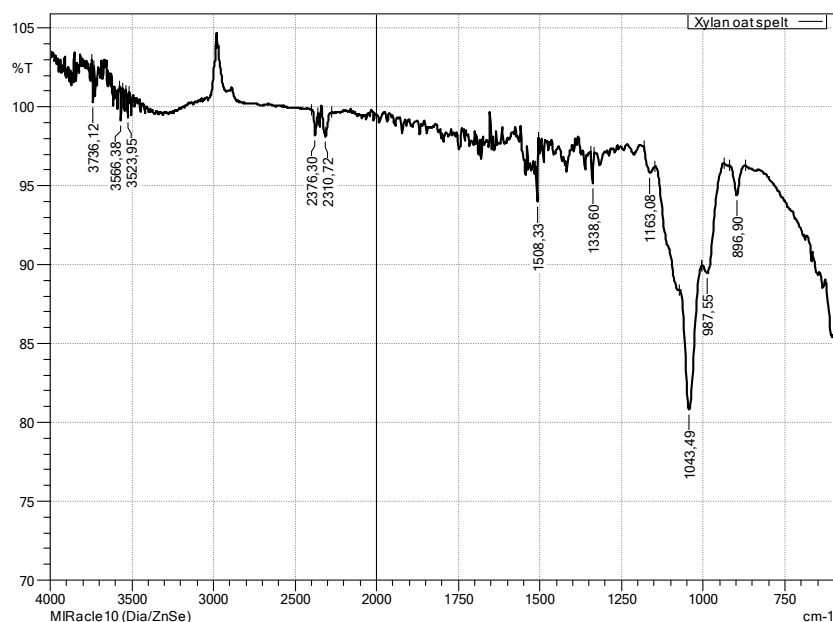


Figura 11-12. Espectros FTIR-ATR de los estándares deD (+)-xilosa, xilano de haya y xilano de cascara de avena comerciales.

De acuerdo a lo visto en el capítulo de “Estructura” podemos considerar que la constitución de las hemicelulosas en las maderas de frondosas tienen una cadena principal de 4-*O*-metilglucuronoxilanos y aproximadamente el 10% de las unidades de xilosa están sustituidas en la posición C-2 por un grupo lateral del ácido 4-*O*-metil-D-glucurónico (MeGlcA), mientras que algunas posiciones C-2 y C-3 están acetiladas (Ebringerova *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2015). Por otra parte, la cadena principal de las hemicelulosas en los cultivos anuales (Ebringerova *et al.*, 2000) está formada por arabino (glucurono) xilanos. Los certificados de análisis de los dos xilanos comerciales utilizados muestran que el xilano de madera de haya presenta más del 90% de residuos de xilosa y para el caso de cáscara de avena se reporta un contenido de residuos de xilosa > a 70% y residuos de arabinosa y glucosa menores a 10 y 15% respectivamente (Sigma Aldrich, no date; Sigma-Aldrich, no date). Se hará particular hincapié en el análisis del espectro del primer xilano, y se usará comparativamente el espectro del segundo.

Análisis del espectro FTIR-ATR del estándar de xilosa

Los espectros IR de monosacáridos en la región 1170 - 980 cm^{-1} son sensibles a las posiciones axiales y ecuatoriales de los grupos (OH) que pueden afectar de manera bastante significativa las posiciones de la banda principal (Kacuráková *et al.*, 2000). Los picos a 1016, 1033, 1080 y 1124 cm^{-1} se atribuyen a vibraciones C-C, C-OH y C-H en el anillo y grupo lateral. El pico a 1147 cm^{-1} corresponde a la vibración del enlace C-O-C (Kacuráková *et al.*, 2000).

Respecto a la región del espectro entre 3500 – 3200 cm^{-1} , se deben a vibraciones del grupo OH. Particularmente, las bandas a 3211 y 3319 cm^{-1} se puede asignar a vibraciones de O-H de las aguas de hidratación (Kacurakova *et al.*, 1998; Buslov *et al.*, 2009).

Los picos en la zona 2988 – 2862 cm^{-1} , corresponden a vibraciones de los enlaces C-H (Kacurakova *et al.*, 1998).

Análisis del espectro FTIR-ATR del estándar de xilano de haya

Analizando particularmente el espectro FTIR del xilano de madera de haya se observa un pico ancho e intenso con máximo a 1038 cm^{-1} , pico típico de los (1-4)- β -xilanos, que corresponde a las vibraciones de estiramiento de C-C, C-O y de rotación de C-OH, del anillo y del grupo lateral (Kacurakova *et al.*, 1998; Kacuráková *et al.*, 2000; Buslov *et al.*, 2009).

Otra banda que se muestra ancha e intensa en el espectro es la de la región $3600 - 3000\text{ cm}^{-1}$. Estas bandas son debidas a las vibraciones de grupos hidroxilos intra e intermoleculares, así como a la presencia de agua de hidratación (Kacurakova *et al.*, 1998; Buslov *et al.*, 2009). Cabe destacar que no se observa el pico correspondiente a agua libre, que es característico de la región.

El pico a 2873 cm^{-1} se puede asignar a las vibraciones de estiramiento de los grupos CH_3 , CH_2 y CH que aparecen en esta región. Esto puede deberse a la presencia de grupos acetilos o al ácido 4-O-metil-D-glucurónico (Buslov *et al.*, 2009). Este pico, sin embargo, no se observa en el espectro de xilano de cascara de avena, lo que confirma lo antedicho.

Una cadena de unidades de xilosa pura no presentaría señal en el rango $1800 - 1500\text{ cm}^{-1}$. Las vibraciones en esta región pueden deberse a vibraciones de estiramiento de grupos $\text{C}=\text{C}$ y $\text{C}-\text{H}$, posiblemente por fragmentos de lignina en la muestra (Buslov *et al.*, 2009).

Al igual que en (Chen *et al.*, 2015) el espectro de xilano de haya muestra bandas fuertes a 1605 y 1246 cm^{-1} . Estas corresponden al estiramiento $\text{C}=\text{O}$ del carboxilato (en forma de sal o éster) y del estiramiento $\text{C}-\text{O}-\text{R}$ correspondientes a los sustituyentes ácidos metilglurónico y grupos acetilos (Dammström, Salmén and Gatenholm, 2009; Chen *et al.*, 2015).

Las bandas a $1160-1130\text{ cm}^{-1}$ son debidas al enlace glicosídico ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) (Kacuráková *et al.*, 2000).

Una banda muy ancha a 974 cm^{-1} (en el espectro de xilano de haya con máximo en 981 cm^{-1}) se asigna a las vibraciones tipo tijeras de CH_3 y $\text{C}-\text{OH}$ (Kacurakova *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2015).

La banda a 895 cm^{-1} es debida al enlace β -glicosídico y es típica de este enlace (Chen *et al.*, 2015).

Análisis del espectro FTIR-ATR de los precipitados obtenidos

En primer lugar, se comparan globalmente todos los espectros de los diversos precipitados obtenidos. Al observar a nivel macro que estos precipitados tienen muchas similitudes, se seleccionan algunas muestras en particular para realizar un análisis más pormenorizado.

El primer espectro analizado es el correspondiente a la precipitación utilizando 4 volúmenes de etanol, sin ajustar el pH y agitando durante y post el agregado de etanol (experiencia 4), de la muestra extraída a 160°C , 110 minutos (Figura 11-13).

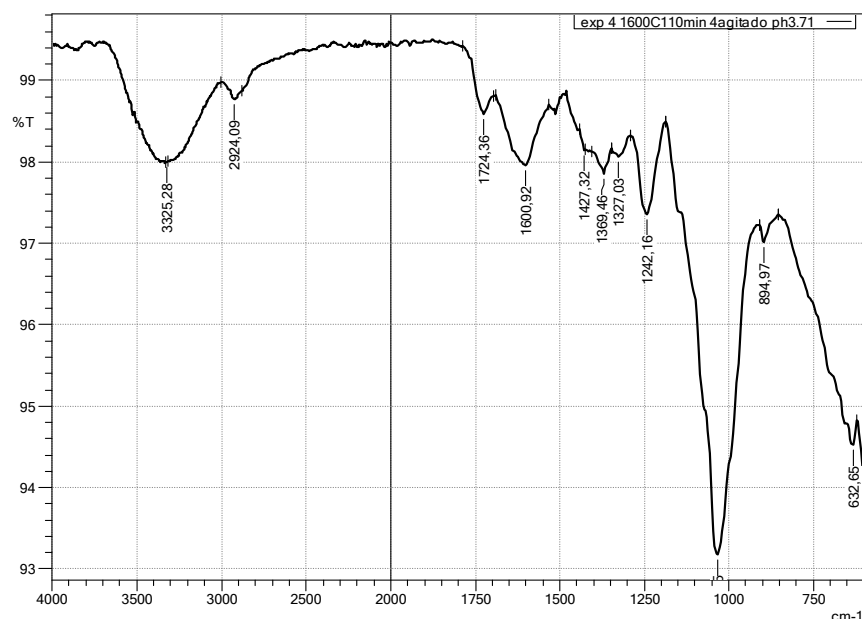


Figura 11-13. Espectros FTIR-ATR del precipitado obtenido en las condiciones de la Experiencia 4, pH sin ajustar y usando 4 volúmenes de etanol.

Como puede verse, el espectro obtenido es similar a los de xilanos de haya comercial. En la Tabla 11-4 se indican las bandas características que presenta el espectro y se asignan los grupos que la originan.

Tabla 11-4. Frecuencias observadas y asignación de bandas del espectro FTIR- ATR del precipitado obtenido en la Experiencia 4. (Kacurakova *et al.*, 1998; Kačuráková *et al.*, 1999; Kacuráková *et al.*, 2000; Buslov *et al.*, 2009; Dammström, Salmén and Gatenholm, 2009; Xu, Chen and Sun, 2015)

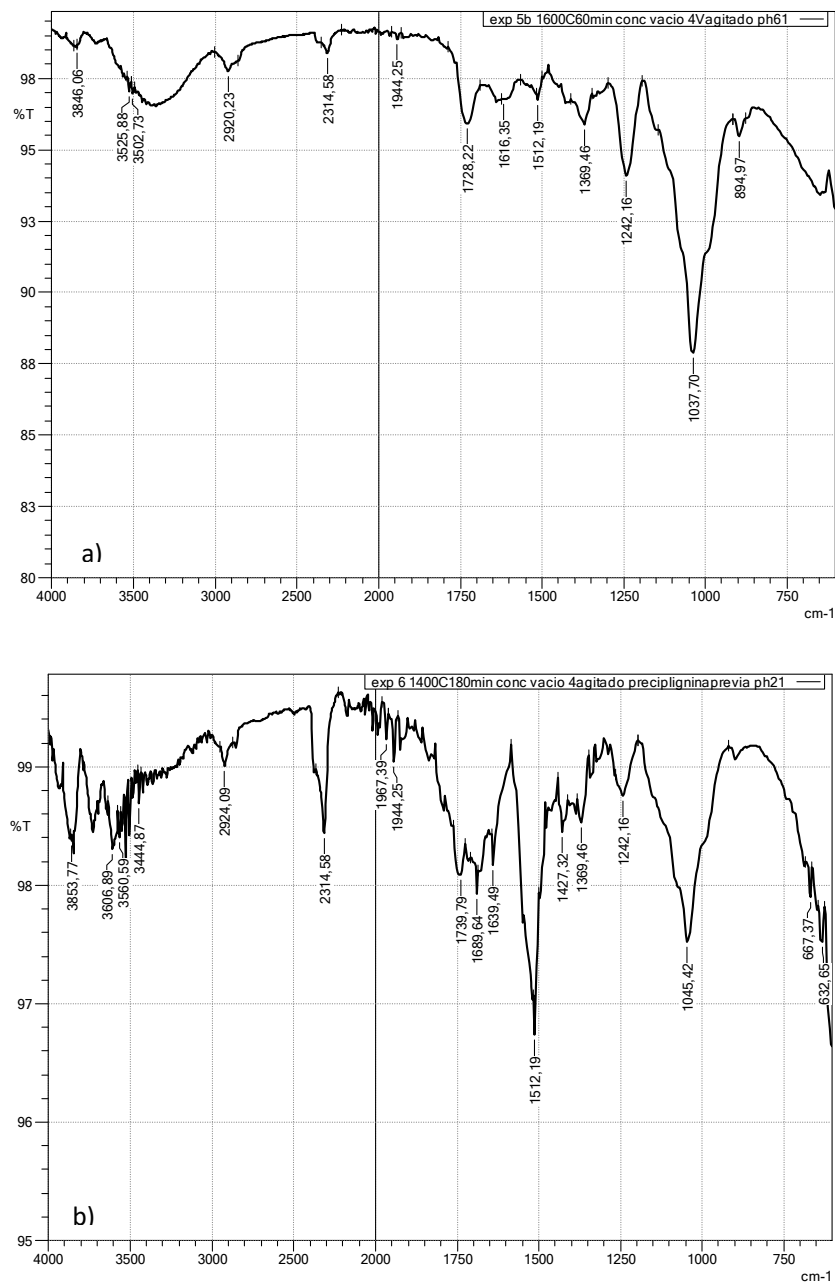
Numero de onda (cm ⁻¹)	Tipo de vibración	Asignado a
1034	de estiramiento de C-C, C-O y de rotación de C-OH,	(1-4)- β - xilanos (anillo y grupo lateral)
3325	estiramiento del O-H	OH de origen intra e intermolecular, y aguas de hidratación
2988-2862	estiramiento C-H	grupos CH ₃ , CH ₂ y CH
Región entre 1600 y 1724 cm ⁻¹	estiramiento de grupos C = C y C-H	fragmentos de lignina
Región de 1512 cm ⁻¹	anillo aromático	compuestos fenólicos
Región entre 1427 y 1242 cm ⁻¹	estiramiento C=O y estiramiento C- O – R	sustituyentes ácidos metilglurónico y grupos acetilos
1160- 1130 cm ⁻¹	C – O – C	enlace glicosídico
895 cm ⁻¹	Rotación C-H en grupo furano	enlace β-glicosídico

El análisis FTIR-ATR del precipitado confirma que se trata de xilanos contaminados por fragmentos de lignina.

Los picos en 1600 y 1724 cm⁻¹ posiblemente se deban a vibraciones de estiramiento de grupos C = C y C-H, por fragmentos de lignina en la muestra (Buslov *et al.*, 2009). Por otro lado, si se compara la relación de áreas del espectro de xilano de madera de haya de Sigma con este espectro, en el primero los picos de esta región representan el 10% del pico característico del xilano a 1034 cm⁻¹, mientras que en esta muestra la relación es del 15%, lo que indica que hay

más compuestos de lignina presentes, lo que también es de esperar ya que el precipitado es oscuro (negro) mientras que el de xilano comercial es amarillento (crema).

La Figura 11-14 muestra los espectros FTIR-ATR de otras de las condiciones de precipitación ensayadas.



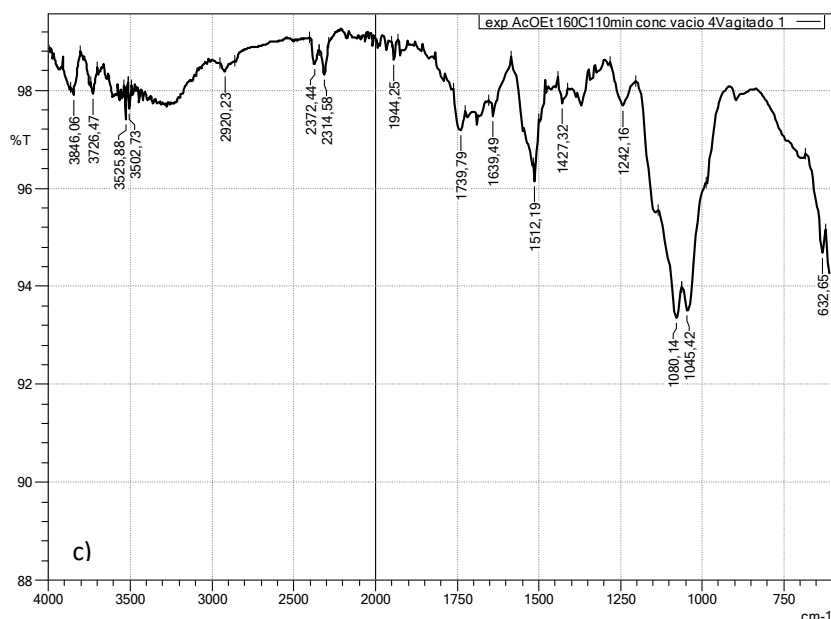


Figura 11-14. Ejemplos de los espectros FTIR-ATR de los precipitados obtenidos en las distintas experiencias. a) Precipitado con 4V de etanol de muestra de autohidrólisis a 160°C, 60 minutos concentrada 3 veces con estufa de vacío (Experiencia 5b). b) Precipitado con 4V de etanol de muestra de autohidrólisis a 140°C, 180 minutos concentrada 3 veces con estufa de vacío y separación de lignina a pH=2 previa a precipitar (Experiencia 6) c) Precipitado con 4V de etanol de muestra de autohidrólisis a 160°C, 110 minutos concentrada 3 veces con estufa de vacío y extracción L-L con acetato de etilo previa a precipitar (Experiencia 7). Los cambios más notables se deben a la variación del área relativa entre el pico característico de los xilanos en la región de 1040 cm⁻¹ y los picos atribuibles a fragmentos de lignina en la región 1740- 1630-cm⁻¹.

Si se comparan los espectros obtenidos en las diferentes experiencias, todos presentan los mismos picos característicos, por lo que se puede decir que en todas las condiciones ensayadas precipita un compuesto o una mezcla de compuestos formados por xilanos (o xilosacáridos) y fragmentos de lignina. La variación fundamental que se encuentra entre los espectros es el porcentaje relativo de las áreas de los picos correspondientes a la fracción de xilanos frente a la fracción de compuestos de lignina. A los efectos de comparar esta variación, se realiza una relación entre el área que corresponde al pico característico de los (1-4)- β - xilanos a 1045 - 1030 cm⁻¹ y las áreas que ocupan los fragmentos de lignina en la región entre 1730 y 1512 cm⁻¹. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11-5.

En sombreado celeste se indican las condiciones de los ensayos que darían una relación favorable respecto del contenido de xilanos frente a compuestos de lignina en la muestra (se tomó arbitrariamente, un 20% del área a 1034 cm⁻¹ como tolerancia).

Tabla 11-5. Comparación de bandas características entre los espectros obtenidos por las diferentes condiciones de extracción y precipitación.

Experiencia	Cond. Extracción	Vol. etanol precipitación	FTIR- ATR		
			Área corregida 1045 cm ⁻¹	Áreas corregidas 1730 -1512 cm ⁻¹	Relación (%) A“lignina”/A“xilanos”)
Xilano de madera de haya			542	56	10
Lignina AH precipitada a pH2			22	792	3549
1	140 °C, 180 min	1V	278	130	47
1	140 °C, 180 min	2V	280	130	46
1	140 °C, 180 min	3V	399	119	30
1	140 °C, 180 min	4V	751	55	7
1	160 °C, 110 min	2V	405	406	100
1	160 °C, 110 min	3V	730	662	91
1	160 °C, 110 min	4V	634	102	16
2	140 °C, 180 min	3V	593	137	23
2	140 °C, 180 min	4V	594	177	30
2	160 °C, 110 min	2V	889	147	17
2	160 °C, 110 min	3V	514	93	18
2	160 °C, 110 min	4V	213	89	42
4a	160 °C, 110 min	4V	100	6	6
4b	160 °C, 110 min	4+2 V	390	127	33
4b	160 °C, 110 min	4V	547	85	16
4b	160 °C, 110 min	4+2 V	174	23	13
5a	160 °C, 110 min	4V	501	68	14
5a	160 °C, 110 min	4+2 V	171	2	1
5b	140 °C, 180 min	4V	26	18	72
5b	140 °C, 180 min	4+2 V	12	19	160
5b	160 °C, 60 min	4V	747	96	13
5b	160 °C, 60 min	4+2 V	635	188	30
5b	160 °C, 110 min	4V	73	11	15
5b	160 °C, 110 min	4+2 V	802	64	8
6a	140 °C, 180 min	4V	196	18	9
7	160 °C, 110 min	4V	590	189	32
7	160 °C, 110 min	4+2 V	453	29	6

11.4.3. Evaluación de distintos solventes

La precipitación con otros solventes, por ejemplo, acetona, 2-propanol, metanol y dioxano, se ha empleado para la refinación de las hemicelulosas (particularmente xilosacáridos) (Vázquez *et al.*, 2005; Moure *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2012). El grado de purificación y la recuperación dependen en principio del solvente empleado y de la composición del material lignocelulósico en la materia prima, así como las transformaciones que tengan lugar en el proceso de separación de la matriz lignocelulósica (Ebringerova, Hromadkova and Heinze, 2005; Moure *et al.*, 2006). Es decir que depende del patrón de sustitución de las cadenas de xilooligosacáridos y la posible presencia de estabilizantes no sacáridos (Vázquez *et al.*, 2005).

A los efectos de comparar los resultados obtenidos utilizando etanol como solvente con otros solventes que se encuentran en referencias bibliográficas y que, por disponibilidad y costo, puedan ser factibles de ser utilizados, se realizaron algunos ensayos de precipitación con

solventes utilizando metanol, isopropanol y dioxano. Se trabajó con el licor proveniente del tratamiento hidrotérmico a 160°C y 110 minutos. Se analizan los resultados de la precipitación con 3 y 4 volúmenes del solvente, con el pH sin ajustar y ajustado a 5.7. Las demás condiciones se establecen como en la experiencia 4 de precipitación con etanol. En la Figura 11-15 se muestran los resultados obtenidos.

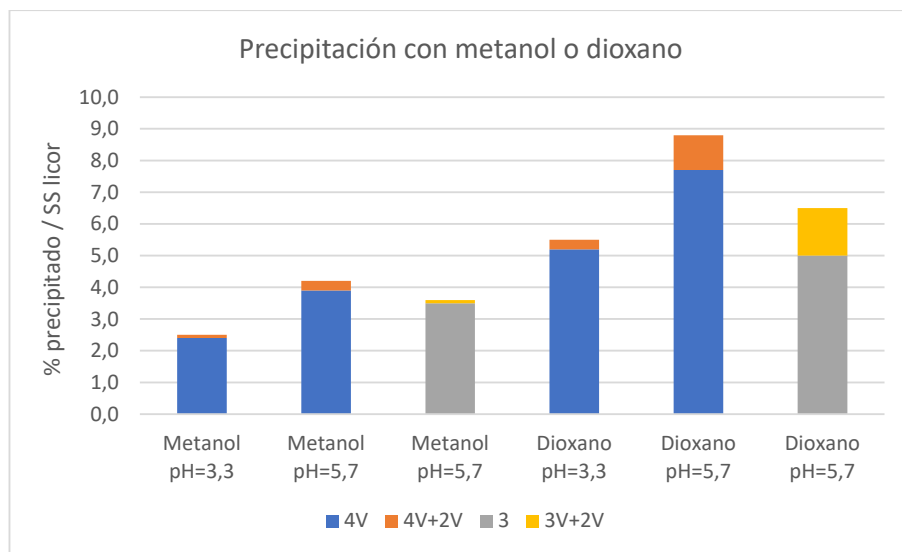


Figura 11-15. Resultados obtenidos en las diferentes experiencias de precipitación de hemicelulosas con solventes orgánicos.

No se reportan los valores obtenidos al utilizar isopropanol, ya que el precipitado obtenido resultó muy pegajoso (“sticky”), difícil de secar y quedó adherido en las paredes del recipiente.

Los valores de rendimiento fueron bajos (el máximo correspondió a 8,8% de los sólidos disueltos en el licor), similares a los obtenidos con etanol y por ello no se continuó trabajando con estos solventes, ya que presentan desventajas frente al etanol respecto a su perjuicio para la salud del operario y ambientales, disponibilidad y costo. Los efectos de los parámetros estudiados (pH y volumen de solvente) tienen el mismo comportamiento que con el uso de etanol; esto es, el rendimiento mejora levemente al trabajar con pH ajustado en 5,7 y aumenta al trabajar con 4 volúmenes de solvente.

En la Figura 11-16 se muestran los líquidos obtenidos luego del tratamiento con solvente y los precipitados separados por filtración.



Figura 11-16. Licores obtenidos luego del agregado de los distintos solventes ensayados y precipitados obtenidos.

Los resultados obtenidos son nuevamente concordantes con los resultados que comenta (Vázquez *et al.*, 2005), trabajando con *Eucalyptus globulus*. De acuerdo con estos autores, el tipo y relación de solvente tiene poco efecto sobre los rendimientos de precipitación obtenidos.

11.4.4. Análisis del espectro FTIR-ATR de los precipitados obtenidos.

La Figura 11-17 presenta los espectros FTIR-ATR de diferentes precipitados obtenidos al utilizar metanol como agente precipitante.

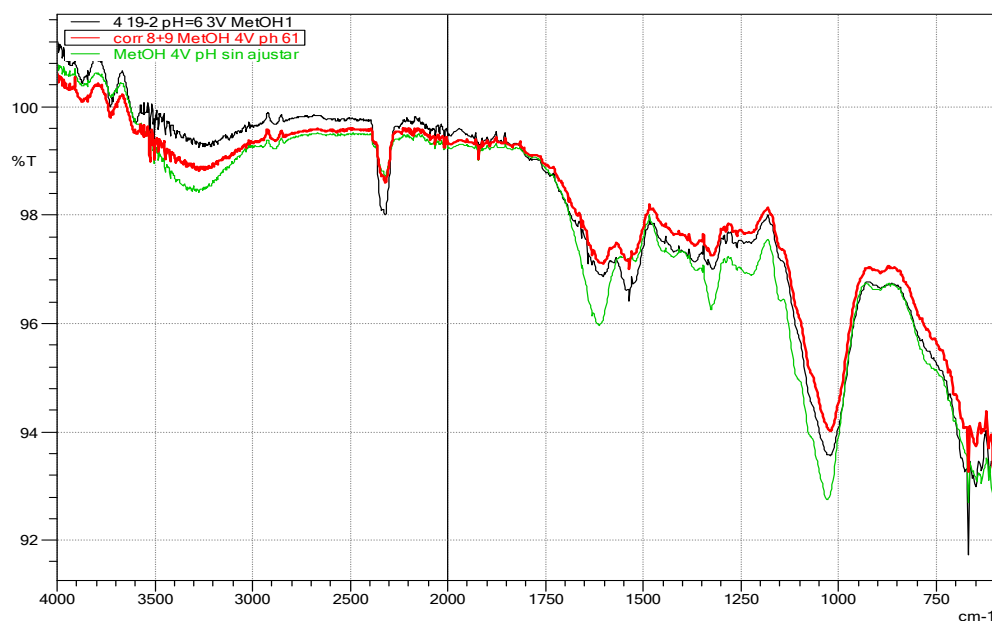


Figura 11-17. Espectros FTIR-ATR de los precipitados obtenido al utilizar metanol como agente precipitante. Rojo: se ajusta pH de extracto a 5,7 y se agregan 4V de metanol; verde: se agregan 4V de metanol sin ajustar el pH; negro: se agrega 3V de metanol al extracto con el pH ajustado en 5,7.

Más allá de las pequeñas diferencias obtenidas en el rendimiento de precipitación, según las condiciones de precipitación utilizadas (Figura 11-15), puede verse que las características

espectrales de los tres precipitados que se muestran son muy similares, lo que indica que se trata de las mismas especies. El análisis de las bandas características se hará más adelante.

Para el caso del dioxano como agente precipitante, se puede observar que las señales difieren un poco si se realiza la precipitación con ajuste de pH a 5,7 o sin ajustar. La intensidad del pico característico de los (1-4)- β -xilanos en la región de 1020-1050 cm^{-1} , indicaría que la precipitación de hemicelulosas se favorece trabajando con el pH del extracto, frente a la condición de pH ajustado a 5,7.

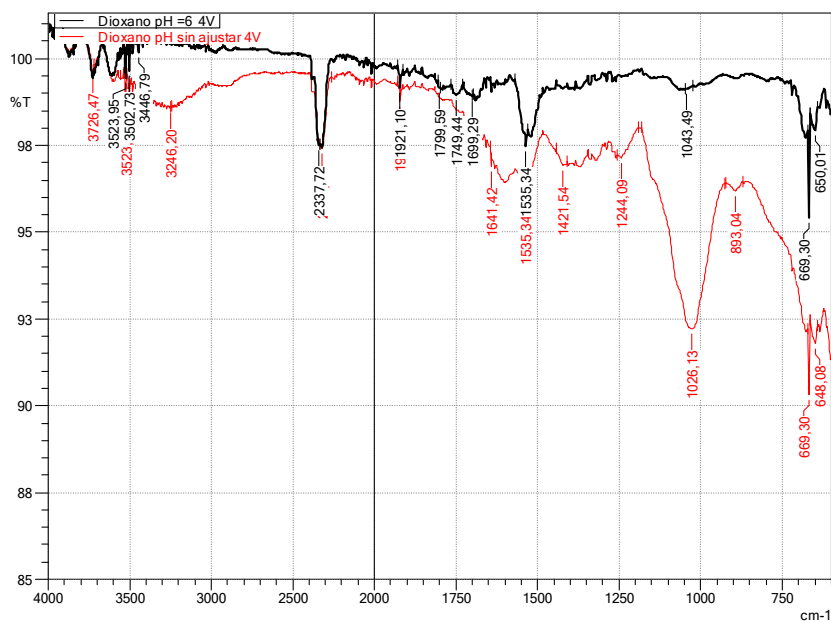


Figura 11-18. Espectros FTIR-ATR de los precipitados obtenido al utilizar dioxano como agente precipitante. Negro: se ajusta pH de extracto a 5,7 y se agregan 4V de dioxano; rojo: se agregan 4V de dioxano sin ajustar el pH.

En la Figura 11-19 se pueden ver los espectros de distintos precipitados obtenidos con los 3 solventes ensayados. Como puede observarse, los espectros son muy similares entre sí, destacándose en todos los picos correspondientes a la presencia de (1-4)- β -xilanos (1020-1050 cm^{-1}), del enlace glicosídico (895 cm^{-1}), las bandas correspondientes a las vibraciones de estiramiento C=O y estiramiento C-O-R de los sustituyentes ácidos metilglurónico y grupos acetilos en la región entre 1240 y 1427 cm^{-1} , así como los picos correspondientes a la presencia de compuestos fenólicos en la zona de 1537 cm^{-1} .

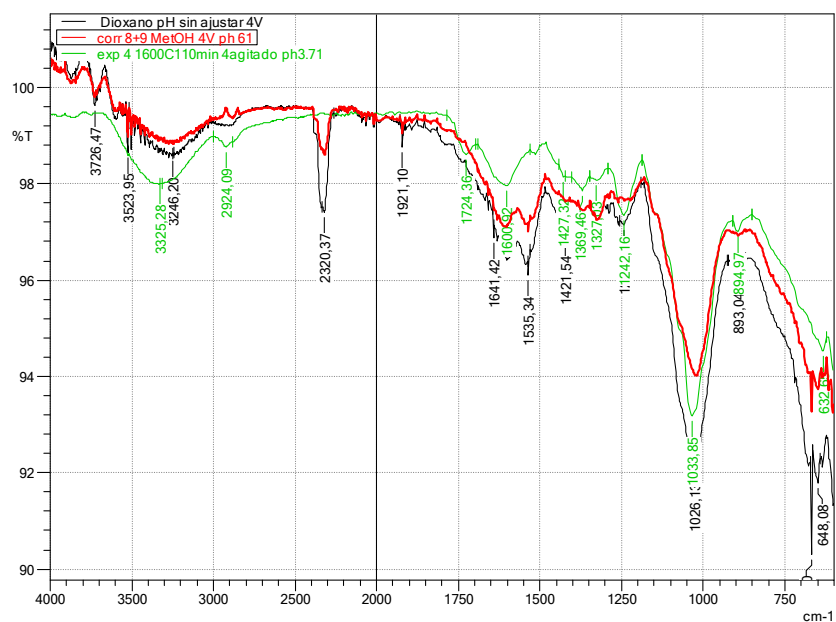


Figura 11-19. Comparación de los espectros FTIR-ATR de los precipitados obtenidos al utilizar los distintos solventes como agentes precipitantes. Negro: se agregan 4V de dioxano sin ajustar el pH; rojo se agregan 4V de metanol con pH ajustado en 6, verde: se agregan 4V de etanol sin ajustar el pH.

11.5. Conclusiones

Se evaluó la precipitación de compuestos derivados de xilosa con distintos solventes (etanol, metanol, isopropanol y dioxano).

Dentro de los parámetros estudiados se concluye que el mejor solvente a utilizar es el etanol ya que permite obtener los mayores rendimientos de precipitación y presenta ventajas adicionales referentes a la facilidad para su manipulación y menor costo. La condición de precipitación usando 4 volúmenes de etanol es la que alcanza el mayor porcentaje de precipitado respecto a los sólidos en el licor, así como a la biomasa original extraída. El ajuste de pH a 5,7 mejora los rendimientos de precipitación respecto a trabajar con las muestras a su pH original (alrededor de 3,5). La agitación durante y posterior a la precipitación mejora significativamente el rendimiento. Trabajar con muestras con mayor contenido de xilosacáridos (muestras concentradas) permite mejorar el rendimiento de precipitación, así como disminuir el consumo de etanol. El aspecto físico de las muestras es de un sólido pardo-negro, a excepción de los precipitados obtenidos al agregar etanol al sobrenadante (4+2V), donde el precipitado es amarronado. Sin embargo, el rendimiento de esta segunda precipitación es poco significativo.

Al realizar la precipitación ajustando el pH a 2 y removiendo los sólidos precipitados previo al agregado de etanol, se obtiene un precipitado amarillento-amarronado que indica a priori un menor contenido de lignina en el mismo.

Como ha sido mencionado en la discusión, los rendimientos de precipitación obtenidos se consideran muy bajos, siendo el máximo rendimiento obtenido el 42,2% de los sólidos disueltos presentes en el licor, lo que equivale al 2,4% del material presente en el aserrín original (experiencia 5b, 140°C, 180 minutos). En las condiciones en que se obtiene mayor cantidad de precipitado respecto al aserrín original (Experiencia 5b, 160°C, 60 minutos) se obtienen 4,1 g de sólidos precipitados/ 100 g b.m.s.

La caracterización química de los precipitados se realizó sobre muestras en las que se obtuvo mayor cantidad de precipitado. El contenido de xilosacáridos en estas muestras es de alrededor de 45-48%. En el caso de la precipitación a pH=2, el contenido de cenizas es del 17%, frente a la precipitación a pH = 5,7 donde las cenizas son el 3,7%.

En el análisis de los precipitados por FTIR-ATR se observan en todos los casos, las bandas características de los xilo-oligosacáridos (1034 cm^{-1} , $1160\text{-}1130\text{ cm}^{-1}$, 895 cm^{-1} , entre otras) y bandas correspondientes a los compuestos fenólicos (región de 1512 cm^{-1}). De esta forma se confirma que los precipitados obtenidos están compuestos por xilanos u xilooligosacáridos, contaminados por fragmentos de lignina.

12. ENSAYOS DE PURIFICACION Y CONCENTRACIÓN: PRECIPITACIÓN CON SOLVENTES EN LICORES PROVENIENTES DE TRATAMIENTOS ALCALINOS.

En este apartado se evalúan las condiciones de la precipitación con solventes de las hemicelulosas extraídas de la madera por tratamiento con álcali (hidróxido de sodio) y se analizan los precipitados obtenidos. El objetivo general es establecer las mejores condiciones de precipitación de las hemicelulosas.

12.1. Objetivos específicos

- Evaluar distintas alternativas de precipitación con etanol, tomando como variables el pH del extracto y la relación volumen de extracto: volumen de solvente.
- Evaluar la incidencia del contenido inicial de xilanos y fragmentos de lignina en el extracto.
- Analizar el rendimiento y las características de los precipitados obtenidos realizando una precipitación escalonada con etanol como solvente.
- Comparar el rendimiento de las fracciones precipitadas utilizando etanol y dioxano como agentes precipitantes. Comparar las características de los precipitados formados con ambos solventes.
- Analizar el efecto de utilizar ácido sulfúrico, ácido acético o ácido clorhídrico para ajustar el pH previo al agregado de solventes.

12.2. Procedimiento

Se trabajó con tres condiciones experimentales a los efectos de evaluar las distintas etapas de este trabajo. Para ello se eligieron las condiciones experimentales con las que se reportó mayor deseabilidad en la optimización de múltiples respuestas del diseño estadístico efectuado y la condición del diseño experimental donde se logró la mayor extracción de xilosacáridos (Capítulo 9). Estas condiciones, así como su caracterización fisicoquímica se muestran en la Tabla 12-1. A los efectos de tener mayor volumen para poder analizar distintas condiciones de precipitación con solventes, se repitieron las extracciones de licor, y por ello algunos valores son diferentes a los reportados en el Capítulo 9.

Tabla 12-1. Características de los extractos utilizados. (Prom $\pm$ σ). (b.m.s.: base madera original seca), n=2

Extracción 1		Temperatura = 155 °C, tiempo a T máx.= 45 minutos, Carga NaOH = 16,7 %
Rendimiento extracción (% b.m.s.)		36,6 $\pm$ 2,1
Sólidos disueltos en el extracto (%)		13,5 $\pm$ 0,3
pH		12,7 $\pm$ 0,2
Xilosacáridos (g/L) / Xilosacáridos (% b.m.s.)		4,1 $\pm$ 0,1 / 2,1 $\pm$ 0,1
Glucosacáridos (g/L) / Glucosacáridos (% b.m.s.)		0,9 $\pm$ 0,1 / 0,5 $\pm$ 0,1
Absorbancia a 280nm (dilución 1/1500)		0,585 $\pm$ 0,010
Extracción 2		Temperatura = 155 °C, tiempo a T máx.= 45 minutos, Carga NaOH = 16,7 % - repetición
Rendimiento extracción (% b.m.s.)		39,7 $\pm$ 2,2
Sólidos disueltos en el extracto (%)		15,2 $\pm$ 0,3
pH		12,2 $\pm$ 0,1
Xilosacáridos (g/L) / Xilosacáridos (% b.m.s.)		5,5 $\pm$ 0,3 / 2,7 $\pm$ 0,2
Glucosacáridos (g/L) / Glucosacáridos (% b.m.s.)		0,3 $\pm$ 0,1 / 0,2 $\pm$ 0,1
Absorbancia a 280nm (dilución 1/1500)		0,612 $\pm$ 0,028
Extracción 3		Temperatura = 105 °C, tiempo a T máx.= 45 min, Carga NaOH = 16,7 %
Rendimiento extracción (% b.m.s.)		18,2 $\pm$ 1,6
Sólidos disueltos en el extracto (%)		11,4 $\pm$ 0,2
pH		12,6 $\pm$ 0,1
Xilosacáridos (g/L) / Xilosacáridos (% b.m.s.)		5,6 $\pm$ 0,3 / 2,8 $\pm$ 0,2
Glucosacáridos (g/L) / Glucosacáridos (% b.m.s.)		2,4 $\pm$ 0,4 / 1,2 $\pm$ 0,3
Absorbancia a 280nm (dilución 1/1500)		0,298 $\pm$ 0,001
Extracción 4		Temperatura = 155 °C, tiempo a T máx.= 135 minutos, Carga NaOH = 6,7 %
Rendimiento extracción (% b.m.s.)		28,4 $\pm$ 1,5
Sólidos disueltos en el extracto (%)		8,2 $\pm$ 0,2
pH		10,9 $\pm$ 0,1
Xilosacáridos (g/L) / Xilosacáridos (% b.m.s.)		4,8 $\pm$ 0,1 / 2,4 $\pm$ 0,1
Glucosacáridos (g/L) / Glucosacáridos (% b.m.s.)		1,2 $\pm$ 0,2 / 0,6 $\pm$ 0,1
Absorbancia a 280nm (dilución 1/1500)		0,404 $\pm$ 0,016

12.2.1. Ensayos realizados

En primera instancia se trabajó con etanol como solvente de precipitación. Se evaluaron diferentes parámetros que pueden influir en el rendimiento de la separación.

- Precipitación con solventes a diferentes pH del extracto: Para realizar esta experiencia se trabajó con la extracción 1, utilizando etanol como solvente de precipitación. Previo al agregado del etanol, se ajustó el pH a distintos valores: original, pH=9, pH=7 y pH=5, utilizando ácido clorhídrico. Se centrifugó la muestra a 3000g durante 20 minutos, separando el precipitado obtenido y determinando el rendimiento de precipitación de acuerdo con los sólidos disueltos inicialmente en el licor. Al sobrenadante se agregó dos volúmenes de etanol con agitación (magnética) constante y agitó posteriormente por 30 minutos. Se dejó decantar el precipitado por 48 horas a 4 °C. Este procedimiento se realizó por duplicado.
- Relación de volumen de solvente a volumen de licor conteniendo las hemicelulosas: se trabajó con una relación de Etanol : licor entre 1:1 y 4:1, ajustando previamente el pH a 7. Se tomaron 4 matraces conteniendo 50 mL de licor y se ajustó el pH =7. Se centrifugó

la muestra durante 20 minutos a 3000g. Las distintas proporciones de etanol se agregaron con agitación magnética a cada matraz con el sobrenadante y se agitó durante 30 minutos más. Se dejó precipitar por 48 horas a 4°C y se centrifugó nuevamente por 20 minutos a 3000g. El precipitado se secó a 37 °C hasta peso constante.

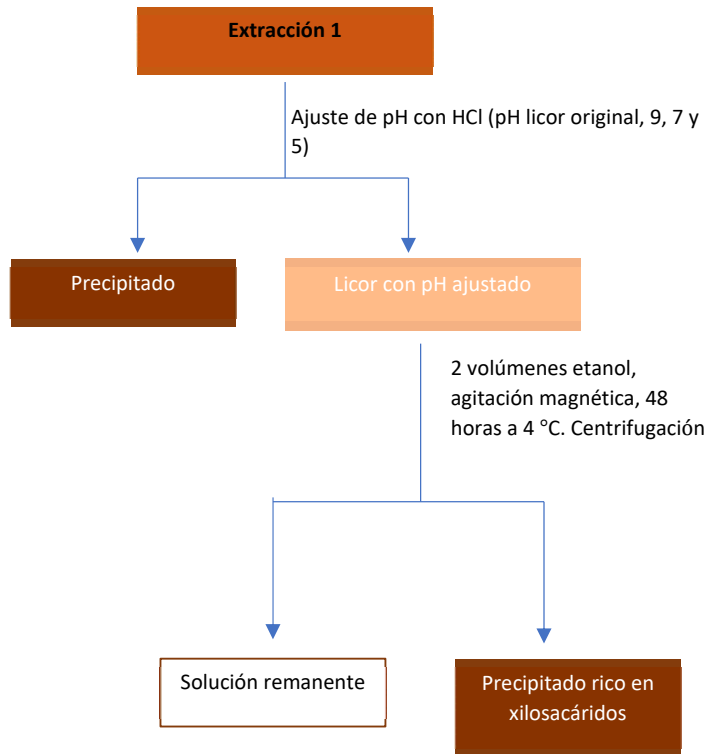
- c) Precipitación escalonada. Para analizar si hay variación en los rendimientos de precipitación, así como en las características de los precipitados formados, se analiza la precipitación escalonada. Esto se realiza agregando otra porción de etanol al sobrenadante de una precipitación anterior.
- d) Incidencia de la relación de xilosacáridos a lignina en el licor. Se repitió el procedimiento realizado en a) pero con un licor obtenido en diferentes condiciones de extracción y que presenta una mayor relación xilosacáridos a lignina. Se evaluó también la disolución del precipitado obtenido y su reprecipitación con etanol a los efectos de purificarlo.
- e) Precipitación con solventes a distintos pH, utilizando ácidos sulfúrico y acético para el ajuste de pH. Se ensayó la incidencia en la precipitación de la utilización de otros ácidos industrialmente disponibles para ajustar el pH previo al agregado de etanol.
- f) Precipitación con dioxano. Se estudiaron los efectos de utilizar dioxano en lugar de etanol como solvente de precipitación, agregando el solvente al licor a diferentes pH.

En la Figura 12-1 se muestra un esquema de los diferentes ensayos realizados.

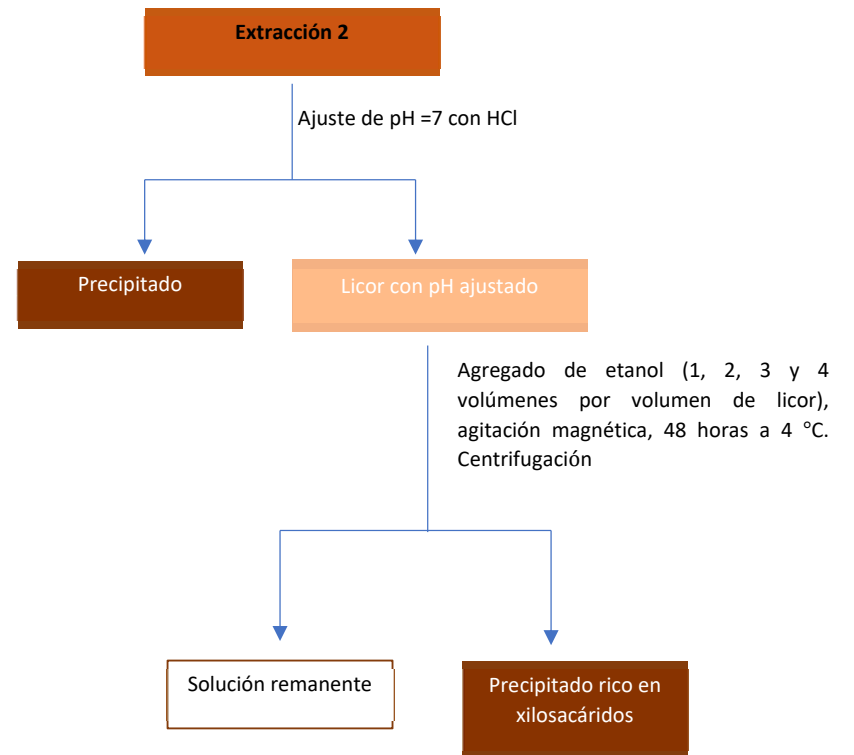
Análisis realizados:

- Se evaluó el rendimiento de precipitación de los precipitados obtenidos al ajustar el pH y al agregar solvente, utilizando la relación entre masa seca de precipitado y el contenido de sólidos disueltos del licor extraído.
- Se analizaron carbohidratos y ácidos orgánicos (acético y fórmico) y productos de degradación (HMF y furfural) por HPLC, de acuerdo con el procedimiento de NREL/TP-510-42623. Por otra parte, se midió la absorbancia a 280 nm de la muestra, como indicativo de la presencia de lignina o fragmentos de ésta.
- El precipitado obtenido luego del agregado de solvente se disolvió en NaOH 0,1 M y sobre esa solución se determinó el contenido de carbohidratos y ácidos orgánicos por HPLC y la absorbancia a 280 nm. Sobre algunas muestras seleccionadas se determinó la distribución de pesos moleculares y/o el contenido de cenizas. Estas determinaciones se realizaron de acuerdo con los procedimientos previamente descriptos.
- Los precipitados obtenidos fueron analizados por FTIR-ATR. Se usó el instrumento y estándares descriptos en el Capítulo precedente.

Ensayo a)



Ensayo b)



Ajuste de pH,
centrifugación



Agregado de 1V etanol,
agitación, sedimentación a
4°C, 48 horas. Centrifugación



**Sólido obtenido al
agregar 1V de etanol**



Agregado de 1V etanol,
agitación, sedimentación
a 4 °C, 48 horas.
Centrifugación



**Sólido obtenido al
agregar 1+1V de etanol**



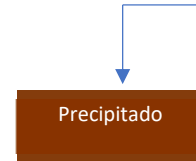
(n veces, $n=2-4$)

Agregado de 1V etanol,
agitación, sedimentación a 4 °C,
48 horas. Centrifugación

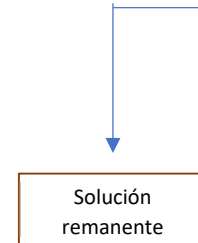


Extracción 3

Ajuste de pH con HCl
(pH licor original, 9, 7,5 y 2)

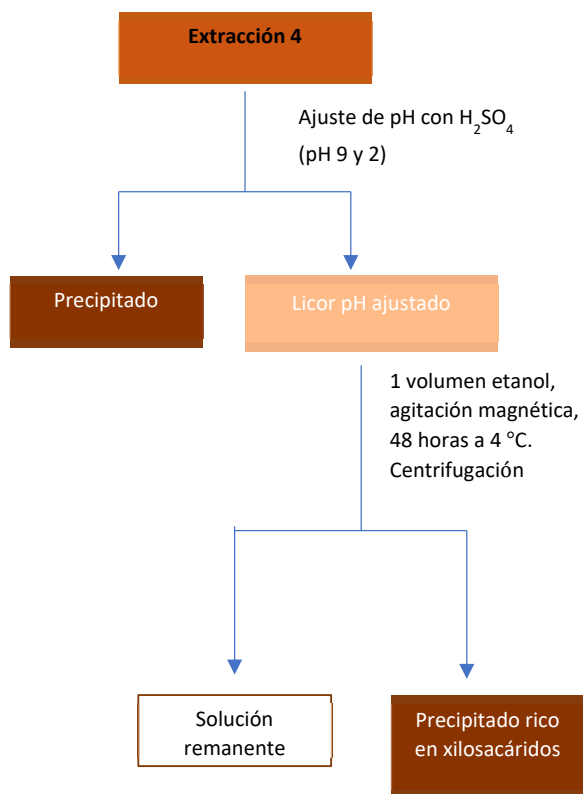


1 volumen etanol,
agitación magnética,
48 horas a 4 °C.
Centrifugación

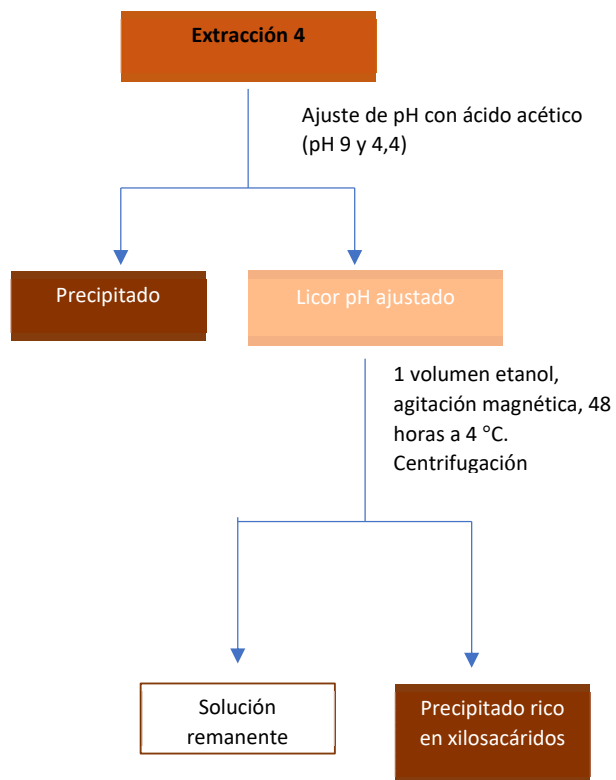


Precipitado rico
en xilosacáridos

Ensayo e1)



Ensayo e2)



Ensayo f)

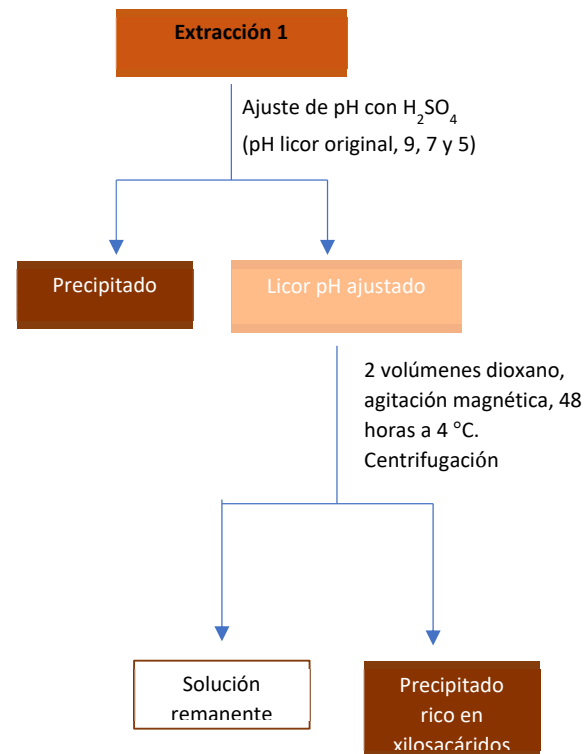


Figura 12-1. Ensayos realizados para evaluar la precipitación de las hemicelulosas extraídas con hidróxido de sodio.

12.3. Resultados y discusión

12.3.1. Precipitación con solventes a diferentes pH del extracto:

Se utilizó licor extraído a 155 °C, 45 minutos y 16,7 % de NaOH (Extracción 1), cuyas características se muestran en la Tabla 12-1.

La Figura 12-2 muestra la relación entre el peso seco del precipitado obtenido al ajustar el pH y centrifugar el licor, respecto al contenido de sólidos totales del licor extraído.

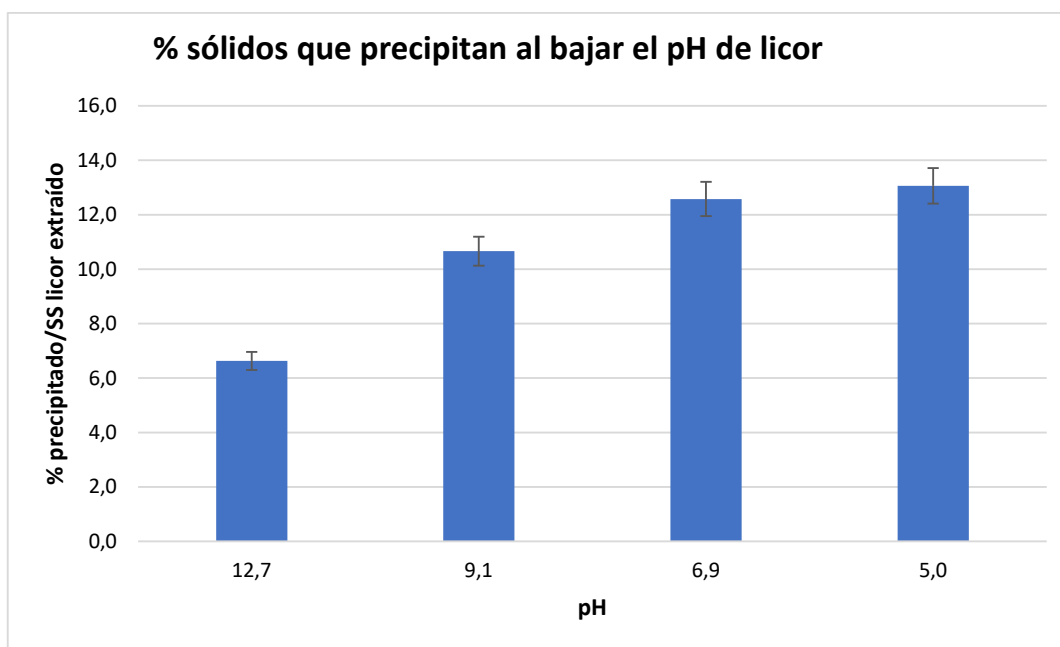


Figura 12-2. Sólidos precipitados al ajustar el pH del licor extraído. Corresponde al licor extraído a 155 °C, 45 minutos y 16,7 % de NaOH.

El porcentaje de material que precipitó aumentó al bajar el pH hasta pH =6,9; mientras que la porción que precipitó a pH=6,9 y pH=5,0 es estadísticamente igual para un $\alpha = 0,05$. El valor de absorbancia a 280 nm de la solución luego de ajustar el pH y separar el precipitado bajó un 15 % para pH=9,1 y pH=6,9 y un 25 % a pH=5,0, respecto al valor original del licor.

Al agregar etanol a la solución resultante y dejar sedimentar por dos días a 4 °C, se obtuvo un nuevo precipitado, el cual se centrifugó y secó en estufa a 37 °C para su análisis. Los precipitados obtenidos a los 4 pH trabajados presentaron características similares, siendo todos de color negro y no observándose diferencias a la vista entre ellos. En la Figura 12-3 se muestra el porcentaje de xilosacáridos que precipitaron al agregar etanol a la solución (respecto al que se encontraba presente en el licor previo al ajuste de pH). Se muestra también el porcentaje de xilosacáridos que componen los precipitados obtenidos.

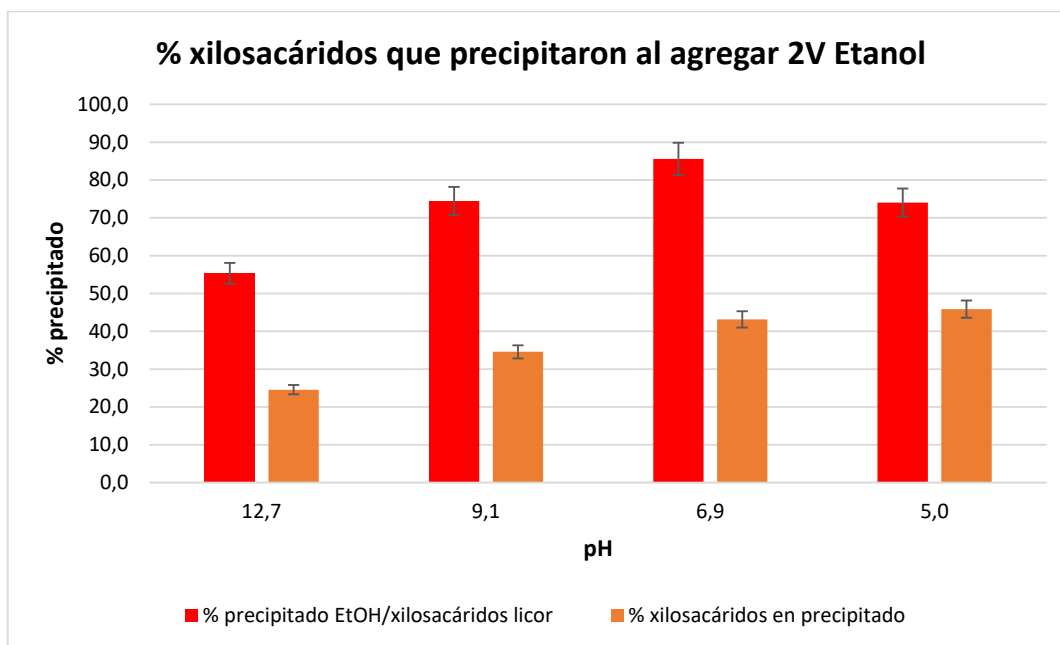


Figura 12-3. Precipitados obtenidos al precipitar con dos volúmenes de etanol a diferentes pH. Las barras naranjas muestran el porcentaje de xilosacáridos que forman parte del precipitado.

De acuerdo con la Figura 12-3, al bajar el pH hasta 6,9 se logró un aumento de la fracción que precipitó, hecho que no se constató al continuar bajando el pH. Del mismo modo, al agregar etanol al extracto a pH original, el $24,6 \pm 1,2$ % del precipitado está compuesto por xilosacáridos, mientras que llega a $43,1 \pm 2,2$ % y $45,9 \pm 2,3$ % para el caso de la precipitación a pH=6,9 y pH=5,0 respectivamente.

Como se mencionó en el Capítulo 11, existen muchos reportes en la literatura donde la precipitación se realiza luego de ajustar el pH a 5,5 – 6,5 con ácido acético o ácido clorhídrico (Brienzo, Siqueira and Milagres, 2009; Peng *et al.*, 2009; Bian *et al.*, 2010; Egüés *et al.*, 2012; Peng, 2012), pero no encontrándose en ninguno de ellos una explicación del motivo de selección de este pH. Ya en 1926, O'Dwyer (O'Dwyer, 1926) reportó la precipitación de hemicelulosas de un extracto alcalino de madera de haya luego “del agregado de una importante cantidad de ácido clorhídrico” y dos volúmenes de etanol. Según esta autora, una porción significativa de las hemicelulosas de alto peso molecular precipita al bajar el pH (las denominadas “Hemicelulosas A”). Con el agregado de dos volúmenes de etanol se obtuvo otro precipitado, en menor cantidad y de características diferentes (O'Dwyer, 1926).

Longue Jr. (Longue Jr. *et al.*, 2013) trabajaron con chips de *Eucalyptus globulus* y ensayaron dos concentraciones de soda (10 y 50 %) a 100 °C, durante 100 minutos, reportando una extracción de 3,3 y 5,2 % de xilosacáridos. Al agregar 1 V de etanol al pH del licor (12,7 y 13,2 respectivamente) indicaron que precipitaron 0,3 y 1,6 % de sólidos en base madera seca. El precipitado del licor extraído con 50 % de soda estaba constituido en un 53 % por xilosacáridos, 4,4 % de lignina y 23 % de cenizas. El precipitado del licor extraído con 10 % de soda estaba formado por 29 % de xilosacáridos, 12,5 % de lignina y 36 % de cenizas. Este valor de

xilosacáridos es similar al obtenido en este trabajo, aunque la temperatura de extracción en nuestro trabajo fue muy superior.

La distribución de pesos moleculares de los precipitados se presenta en la Tabla 12-2.

Tabla 12-2. Distribución de pesos moleculares de los precipitados obtenidos con 2V de etanol a diferentes pH. Licor extraído a 155 °C, 45 minutos y 16,7% de NaOH.

pH del licor	Distribución de pesos moleculares				
	#	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn	%
12,7	Total	4080	33243	3,58	
	1	143868	154141		14,8
	2	29864	30428		16,0
	3	11407	11982		42,5
	4	1325	1615		1,2
9,1	Total	8011	16873	1,2	
	1	16062	18433		90,7
	2	1358	1633		9,3
6,9	Total	5255	16147	1,4	
	1	30166	30559		30,5
	2	12204	12744		51,1
	3	1324	1553		18,3
5,1	Total	8310	18658	1,3	
	1	27146	28031		45,5
	2	11569	12574		46,0
	3	1338	1493		8,5

De acuerdo con los datos presentados en la Tabla 12-2, el peso molecular ponderado (Mw) es de 33243 Da para el precipitado obtenido al agregar etanol al pH original del extracto (12,7), y de alrededor de 16.000 a 18.000 Da para los otros pH estudiados. En el primero (pH 12,7), se observó un pico a 154.000 Da, que no se observa en los otros casos, factiblemente lignina que es removida al ajustar el pH a valores más bajos. Puede verse también (Figura 12-4) que la distribución de pesos moleculares de los precipitados a pH 6,9 y 5,1 es similar, mientras que a pH 9,1 no aparece resuelto un pico en el entorno de los 30.000 Da, que, si aparece en los pH inferiores, lo que genera una distribución diferente que a los pH más bajos analizados.

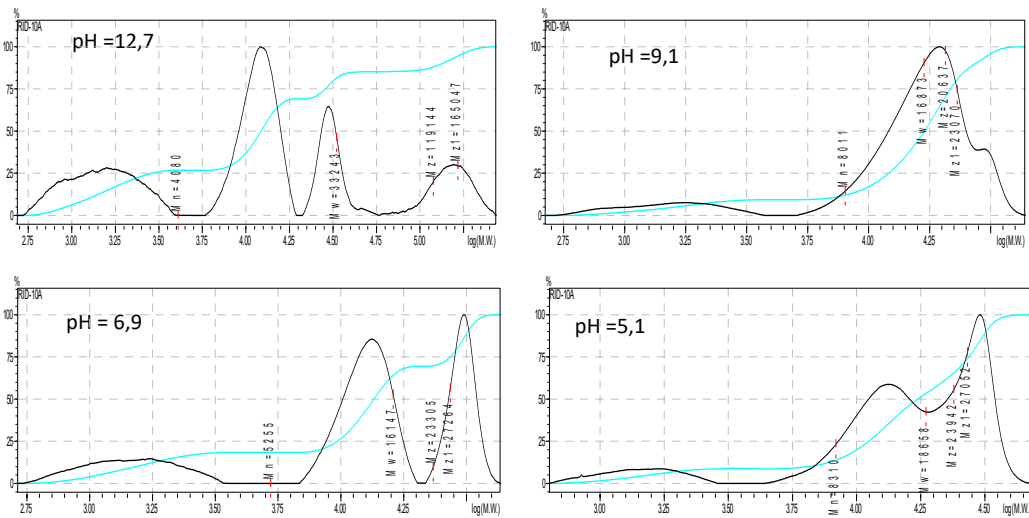


Figura 12-4. Distribución de pesos moleculares de los precipitados obtenidos con el agregado de 2 volúmenes de etanol a diferentes pH para el licor extraído a 155 °C, 45 minutos y 16,7% de NaOH.

Comparando con otros autores, el peso molecular ponderado del precipitado obtenido por el agregado de etanol sobre un extracto alcalino de madera de abedul, reportado por Costabel (Costabel, 2013) fue de 19.000 Da, del orden de los obtenidos en este trabajo en pH distintos al del licor original, aunque hay que tener presente que se están comprando dos tipos diferentes de maderas de frondosas.

En la Figura 12-5 se muestra el análisis de FTIR-ATR de los precipitados obtenidos al agregar etanol a los distintos pH de trabajo.

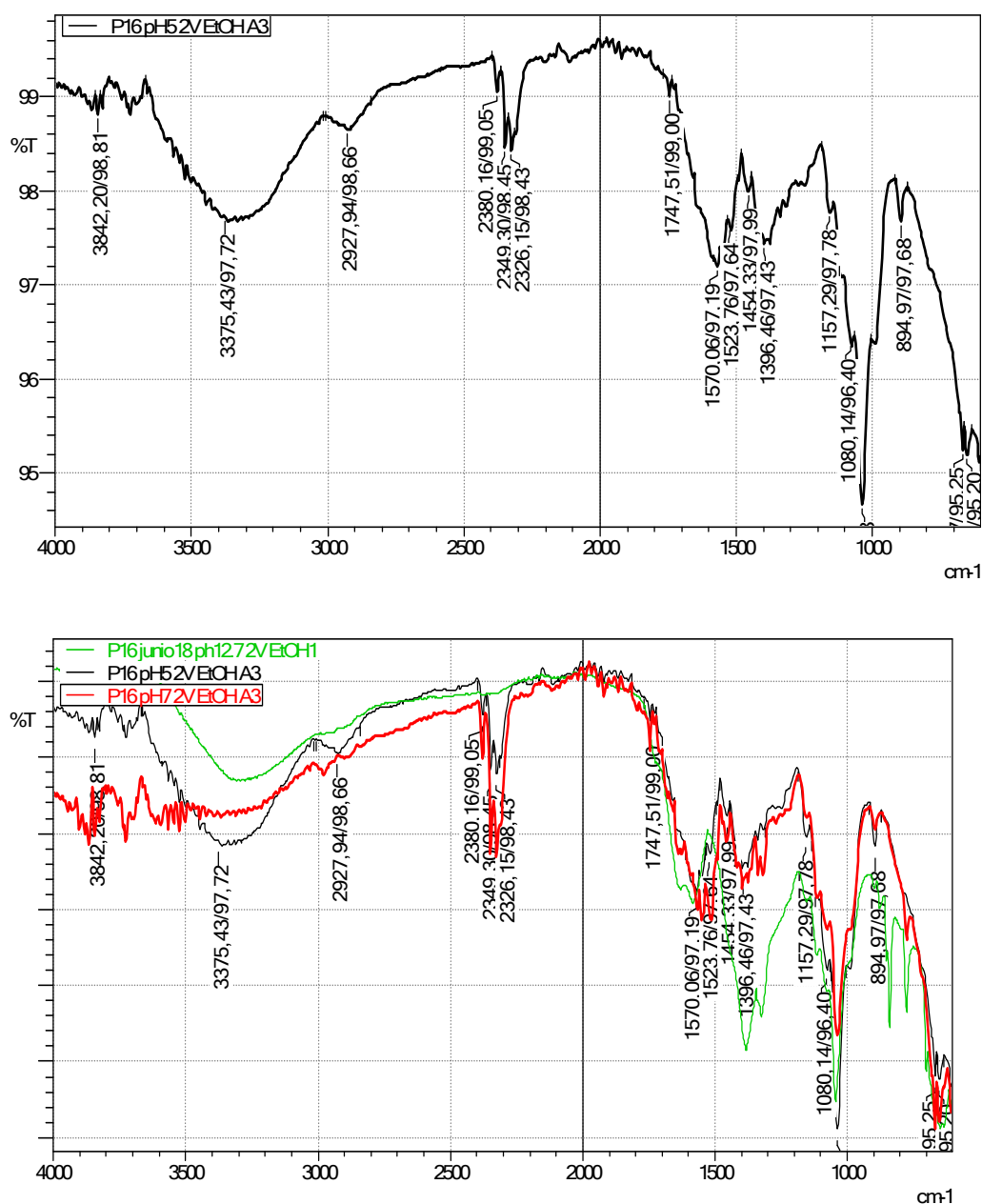


Figura 12-5. Espectros FTIR-ATR de los precipitados obtenidos por el agregado de 2V de etanol a distintos pH sobre el licor extraído a 155 °C, 135 minutos y 16,7 % NaOH. En la figura superior, espectro FTIR-ATR del precipitado obtenido al agregar etanol luego de ajustar el pH del licor a 5 (y remover el precipitado obtenido por el ajuste de pH). En la figura inferior, comparación de los precipitados obtenidos al agregar etanol a distintos pH del licor (verde: pH original del licor: 12,7; negro: pH=5 y rojo pH=7)

En todos los precipitados de la figura se pueden observar las bandas en el entorno de 1040 cm^{-1} , de las vibraciones de estiramiento de C-C y C-O y de rotación de C-OH, asignadas a los (1-4)- β -xilanos. También se observan las bandas en la zona de $1160\text{-}1130\text{ cm}^{-1}$ correspondientes al estiramiento C-O-C y asignadas al enlace glicosídico, así como el pico característico a 895 cm^{-1} , de rotación de C-H en el grupo furano, típico del enlace β -glicosídico. Estas bandas confirman la presencia de xilosacáridos en el precipitado. Se observa también, una banda ancha en la zona de $3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a las vibraciones de estiramiento de los grupos O-H.

En la región entre $1427\text{ y }1242\text{ cm}^{-1}$ se pueden ver las bandas provocadas por las vibraciones de estiramiento C=O y de C-O-R, correspondientes a los ácidos metilglucorónico y grupos acetilos del precipitado. Puede observarse que esta banda es mucho más intensa cuando se trabaja a $\text{pH}=12,7$, disminuyendo su intensidad en los precipitados a otros pH. Las vibraciones de estiramiento de C-H asignables a los grupos CH_3 , CH_2 y CH en la región de $2988\text{-}2862\text{ cm}^{-1}$ se ven claramente a $\text{pH}=5$ y no se aprecian en los otros pH de trabajo.

Las vibraciones del anillo aromático en la región de 1512 cm^{-1} , correspondientes a los compuestos fenólicos se aprecian claramente a $\text{pH}=5$ y $\text{pH}=7$, pero no se ven claramente a $\text{pH}=12,7$, factiblemente porque son enmascaradas por la banda ancha de los grupos metilglucorónico y acetilo en este espectro. Sin embargo, las intensidades de las bandas en la región entre $1600\text{ y }1730\text{ cm}^{-1}$, de las vibraciones de estiramiento de los grupos C=C y C-H asignables a fragmentos de lignina, son mucho más importantes a $\text{pH }12,7$. Factiblemente los polisacáridos extraídos estén formando parte de complejos lignina-carbohidratos (LCC), los que muchas veces presentan enlaces muy estables y por ello difíciles de romper. (Balakshin, Capanema and Berlin, 2014).

Los espectros obtenidos a $\text{pH}=7$ (verde) y $\text{pH}=5$ (rojo) son muy similares, así como el resto de las propiedades medidas. El precipitado obtenido a $\text{pH}=9,1$ presentó picos poco característicos de este tipo de muestra por lo que no se consideró para el análisis. Con estos resultados, en principio puede establecerse que el $\text{pH}=7$ es un valor adecuado para la remoción de lignina y precipitación de los xilosacáridos presentes, no lográndose mejoras al bajar más el pH (al menos hasta $\text{pH}=5$).

Los análisis de FTIR-ATR presentados son muy similares a los que se reportan en distintos trabajos de la literatura, observándose los mismos picos característicos, fundamentalmente en lo que corresponde a xilosacáridos. La discusión acerca de los picos que se asignan a compuestos de lignina es menos frecuente en la literatura, en algunos casos porque se trata de muestras que fueron tratadas con clorito de sodio previo a la extracción alcalina y en otros casos porque no se analizan estos picos (Bian *et al.*, 2010; Egüés *et al.*, 2012; Peng, 2012; Longue Jr. *et al.*, 2013; Vena *et al.*, 2013).

12.3.2. Relación de volumen de solvente a volumen de licor conteniendo las hemicelulosas.

Para determinar la relación de etanol necesaria para precipitar las hemicelulosas se trabajó a pH fijo y variando la relación de volúmenes de etanol desde 1 a 4. Se utilizó el licor correspondiente a la extracción 2 (condiciones de extracción: 155°C, 45 minutos, 16,7 % carga de NaOH).

El 58% de los sólidos disueltos totales precipitó luego del ajuste de pH=7 con ácido clorhídrico, y el 8 % de los xilosacáridos iniciales presentes fueron removidos en este precipitado.

En la Figura 12-6 se muestra una imagen de los precipitados obtenidos y en la Figura 12-7 se muestran los resultados obtenidos al agregar etanol en distintas relaciones de volúmenes.



Figura 12-6. Precipitados obtenidos al agregar distintas relaciones de volumen de etanol:licor, al licor extraído a 155°C, 25 minutos y 16,7 % de carga de soda (Extracción 2), previo ajuste de pH=7.

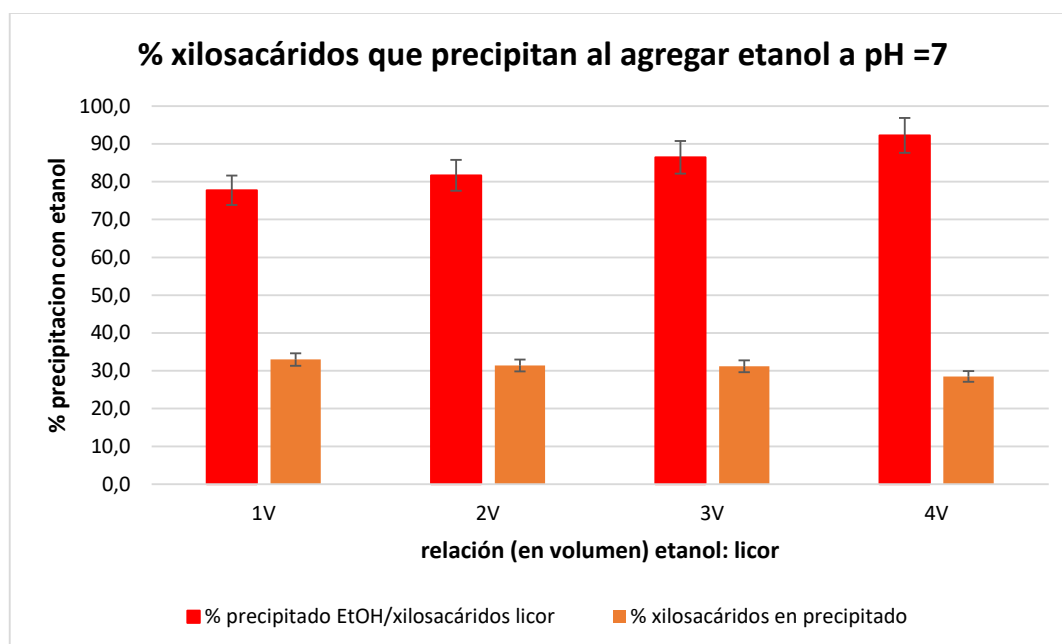


Figura 12-7. Precipitados obtenidos al precipitar con diferentes volúmenes de etanol a pH=7.

Como puede verse en la Figura 12-6, los precipitados obtenidos fueron de color negro, similares a los obtenidos en el ítem anterior. Trabajando con un volumen de etanol, precipitó el 78 % de los xilosacáridos presentes en el licor original, mientras que a medida que se aumenta el volumen de etanol el porcentaje que precipitó aumentó llegando a precipitar el 92 % de los xilosacáridos con 4 volúmenes de etanol. Respecto a la composición del precipitado, alrededor del 30 % del precipitado obtenido correspondió a xilosacáridos, bajando un poco este valor a medida que aumenta la relación de volúmenes (33 % a 28%).

En la revisión de literatura se ha encontrado el uso de diversas relaciones en el agregado de etanol para la precipitación de las hemicelulosas, desde relaciones menores a 1 V de etanol (Peng *et al.*, 2009; Peng, 2012), un volumen (Longue Jr. *et al.*, 2013), dos volúmenes (O'Dwyer, 1926; Stoklosa and Hodge, 2012), tres volúmenes (Puls and Saake, 2003; Brienzo, Siqueira and Milagres, 2009), etc., en ningún caso haciendo referencia al porqué de la elección de las condiciones.

Analizando la distribución de pesos moleculares que se presenta en la Tabla 12-3 se observa que para una relación de volumen de etanol: licor de 1 se obtuvo el mayor valor de peso molecular ponderado y que el mismo baja sucesivamente a medida que se aumenta la relación de volumen. Se observan dos picos, uno en la zona de aproximadamente 21000-26000 Da y otro alrededor de 1300-1400 Da. A medida que aumenta la relación de volúmenes el porcentaje de área del pico de menor peso molecular es más importante.

Tabla 12-3. Distribución de pesos moleculares de los precipitados obtenidos utilizando diferentes relaciones de volumen de etanol: volumen de licor a pH=7.

Rel Vol Etanol:licor		Distribución de pesos moleculares			
	#	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn	%
1:1	Total	4908	19340	3,9	
	1	21401	24798		76,3
	2	1407	1718		23,6
2:1	Total	2885	14838	5,1	
	1	21552	24436		58,0
	2	1315	1600		42,0
3:1	Total	2322	10894	4,7	
	1	26575	27582		34,1
	2	1577	2262		65,9
4:1	Total	2171	11167	5,1	
	1	23606	25559		39,6
	2	1361	1740		60,4

Estos resultados están alineados con los obtenidos por Bian *et al.* (Bian *et al.*, 2010), que trabajando con proporciones escalonadas de etanol en la solución (entre 10 y 90 %) concluyeron que las hemicelulosas menos ramificadas con peso molecular mayor fueron precipitados en porcentajes más bajos de etanol, mientras que con concentraciones crecientes de etanol, precipitaron las hemicelulosas más ramificadas, que presentaron pesos moleculares más bajos.

Analizando ahora el espectro FTIR-ATR del precipitado obtenido al agregar un volumen de etanol (Figura 12-8) se observan las bandas características a los xilosacáridos (banda a aproximadamente 1040 cm^{-1} asignadas a los (1-4)- β -xilanos, banda correspondiente al enlace β -glicosídico a 895 cm^{-1}), aunque no se observan bandas a $3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a los grupos OH. Se observan también las bandas correspondientes a los ácidos metilglucurónico y grupos acetilos a 1212 cm^{-1} y 1413 cm^{-1} . Los precipitados obtenidos por el agregado de dos y tres volúmenes de etanol presentaron un espectro FTIR-ATR con características similares al obtenido por el agregado de un volumen de etanol. Sin embargo, al agregar cuatro volúmenes de etanol, el espectro obtenido fue muy diferente, no reconociéndose las bandas características de los xilosacáridos.

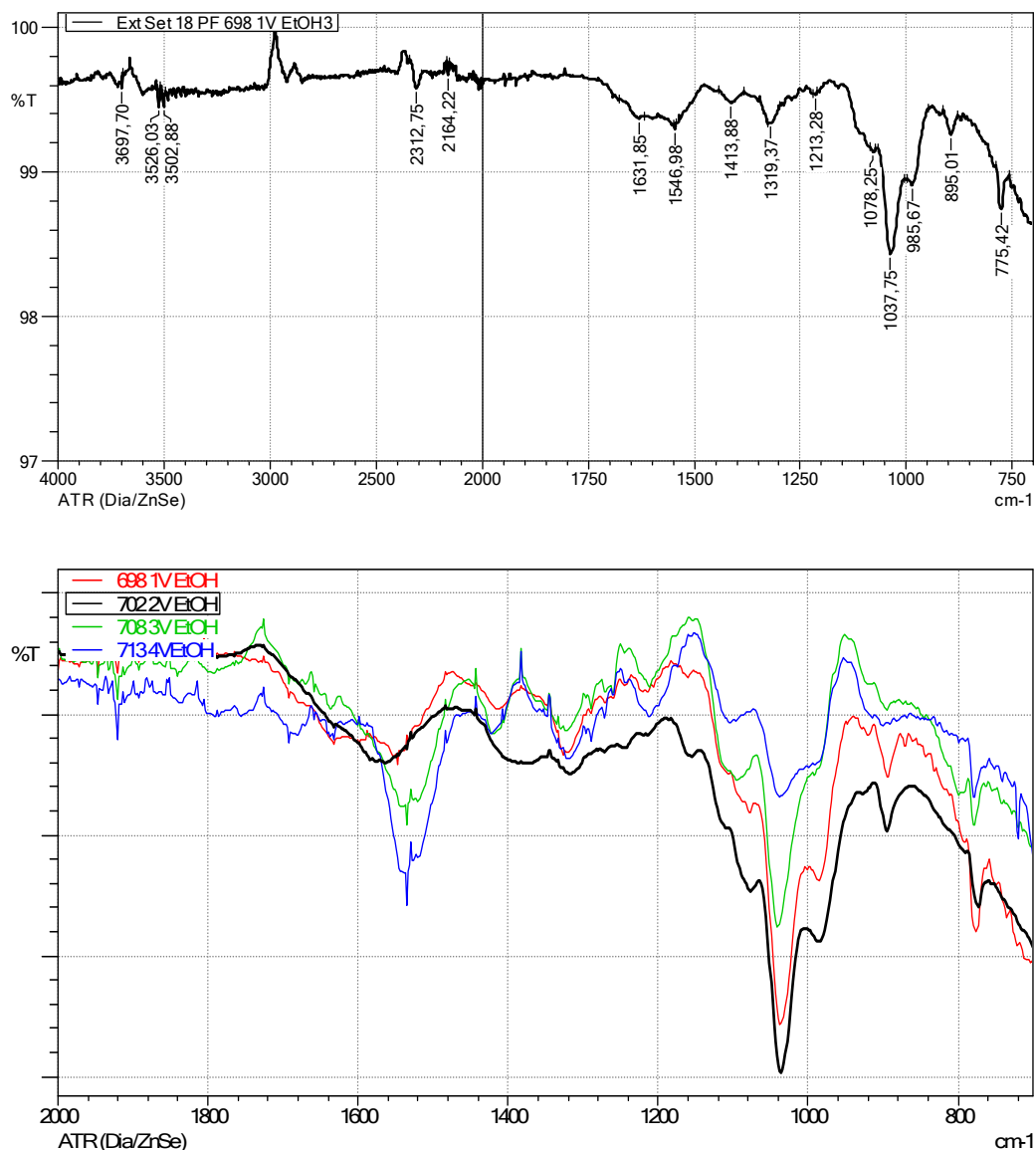


Figura 12-8. Espectros FTIR-ATR de los precipitados obtenidos utilizando diferentes relaciones de volumen de etanol: volumen de licor a pH=7. En la parte superior, precipitado obtenido al agregar un volumen de etanol, indicando el número de onda de los picos característicos. En la parte inferior, imagen comparativa de los precipitados obtenidos por el agregado de los distintos volúmenes utilizados (en este caso solo se muestra la región entre $2000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$). Rojo: 1 volumen de etanol, negro: 2 volúmenes, verde: 3 volúmenes, azul: 4 volúmenes.

Por lo antedicho se concluye que la mejor relación de volumen de trabajo es de 1:1, ya que si bien precipitó un porcentaje un poco menor de xilosacáridos (78 % frente a 92% utilizando una relación de 4:1), el porcentaje de estos en el precipitado obtenido al agregar 1V de etanol fue un poco mayor y el peso molecular del precipitado fue mayor. Además, la menor cantidad de etanol utilizada es otro factor importante que considerar.

12.3.3. Precipitación escalonada

Con el objetivo de evaluar si cambian los rendimientos de precipitación y las características de los precipitados obtenidos en cada agregado de etanol se realizó una precipitación escalonada, aumentando cada vez la relación volumen de etanol frente al volumen de licor. Se utilizó el licor correspondiente a la extracción 2 (condiciones de extracción: 155°C, 45 minutos, 16,7 % carga de NaOH). Se agregaron en total 4 volúmenes de etanol al licor.

El 58% de los sólidos disueltos totales precipitó luego del ajuste a pH=7, y 8% de los xilosacáridos iniciales presentes son removidos en este precipitado.

La Figura 12-9 indica el porcentaje de xilosacáridos que precipitó al agregar el etanol de forma escalonada, así como el porcentaje de xilosacáridos que compone cada uno de los precipitados obtenidos.

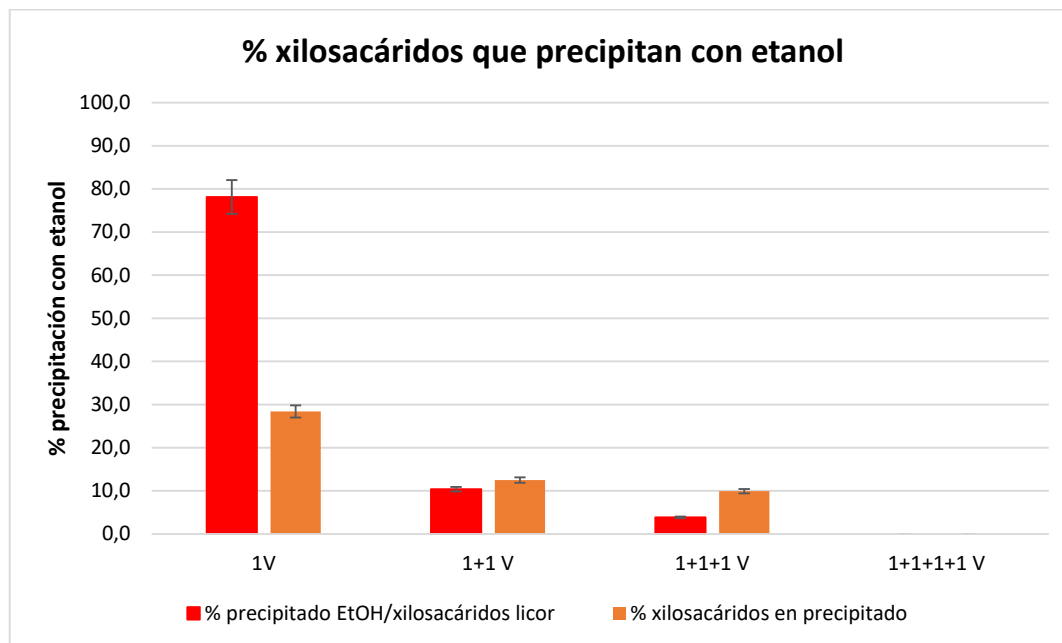


Figura 12-9. Precipitados obtenidos al agregar el etanol de forma escalonada.

Puede observarse que en el primer agregado de etanol precipitó casi el 80% de los xilosacáridos presentes en el licor original. Mientras que, por el agregado de una nueva fracción de etanol al

sobrenadante de la primera precipitación, se logra remover 10% más de los xilosacáridos originariamente presentes. El agregado de una nueva fracción de etanol removi6 menos de 4%, que, si se realiza un balance de masa, es la fracci6n de xilosacáridos que quedaba remanente en el licor. No se removieron xilosacáridos por el agregado de una nueva porci6n de etanol, como es de esperar de acuerdo con los resultados del balance de masa. Analizando la composici6n del precipitado, aproximadamente el 30% del precipitado obtenido correspondi6 a xilosacáridos luego del agregado de un volumen de etanol al licor. La fracci6n de xilosacáridos presentes en los restantes precipitados fue cada vez menor, como se observa en la Figura 12-9.

Tabla 12-4. Distribuci6n de pesos moleculares de los precipitados obtenidos utilizando diferentes relaciones de volumen de etanol: volumen de licor a pH=7.

Volumen de etanol agregado		Distribuci6n de pesos moleculares			
	#	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn	%
1	Total	18796	26028	1,4	
	1	23937	26550		76,8
	2	1733	2101		23,2
1+1	Total	2800	6362	2,3	
	1	28759	29053		0,9
	2	2572	4137		99,1
1+1+1	Total	3059	5446	1	
	1	3059	5446		100
1+1+1+1	Total	2580	3978	1	
	1	2580	3978		100

De la distribuci6n de pesos moleculares de los precipitados obtenidos, puede verse que para el caso del primer agregado de etanol se tiene un peso molecular ponderado de alrededor 26000 Da, formado por $\frac{3}{4}$ de un componente de peso molecular de 26550 y $\frac{1}{4}$ por un componente de bajo peso molecular. El precipitado obtenido al agregar otro volumen de etanol al sobrenadante presenta un peso molecular ponderado mucho m6s bajo (6362 Da), y como puede verse est6 pr6cticamente compuesto en su totalidad por un componente con un peso molecular de peso molecular de alrededor de 4000 Da. Al continuar agregando etanol a los l6quidos sobrenadantes, el peso molecular de los precipitados obtenidos contin6a descendiendo.

Existen varios trabajos en la literatura que realizan precipitaci6n escalonada sobre diversas materias primas lignocelul6sicas ((Peng *et al.*, 2009; Bian *et al.*, 2010; Peng, 2012; Sun *et al.*, 2013). En estos se trabaja con biomasa sin extractivos y previo a la separaci6n de las hemicelulosas se realiza un tratamiento con clorito de sodio en medio ácido de forma de remover lignina. La extracci6n de las hemicelulosas de la biomasa se realiza con KOH en cargas entre 10-50 % a temperatura ambiente por 16 – 24 horas. En todos los casos la precipitaci6n con etanol se realiza a pH 5,5 ajustado con ácido acético, no indicándose la raz6n de la elecci6n de ese pH. La precipitaci6n escalonada con etanol se reporta trabajando con concentraciones de etanol en la soluci6n entre 10 – 90 %. Los autores se ñalan que encuentran diferencias en las fracciones de las hemicelulosas precipitadas, fundamentalmente en la distribuci6n de pesos moleculares de las distintas fracciones. En el caso del presente trabajo, dada la baja cantidad de hemicelulosas que precipita (debido al bajo rendimiento de la extracci6n alcalina), se resolvi6 no separar las fracciones por debajo de un volumen de etanol agregado y por ello no se ensay6 esta alternativa.

La Figura 12-10 muestra los espectros FTIR-ATR de los precipitados obtenidos en este trabajo.

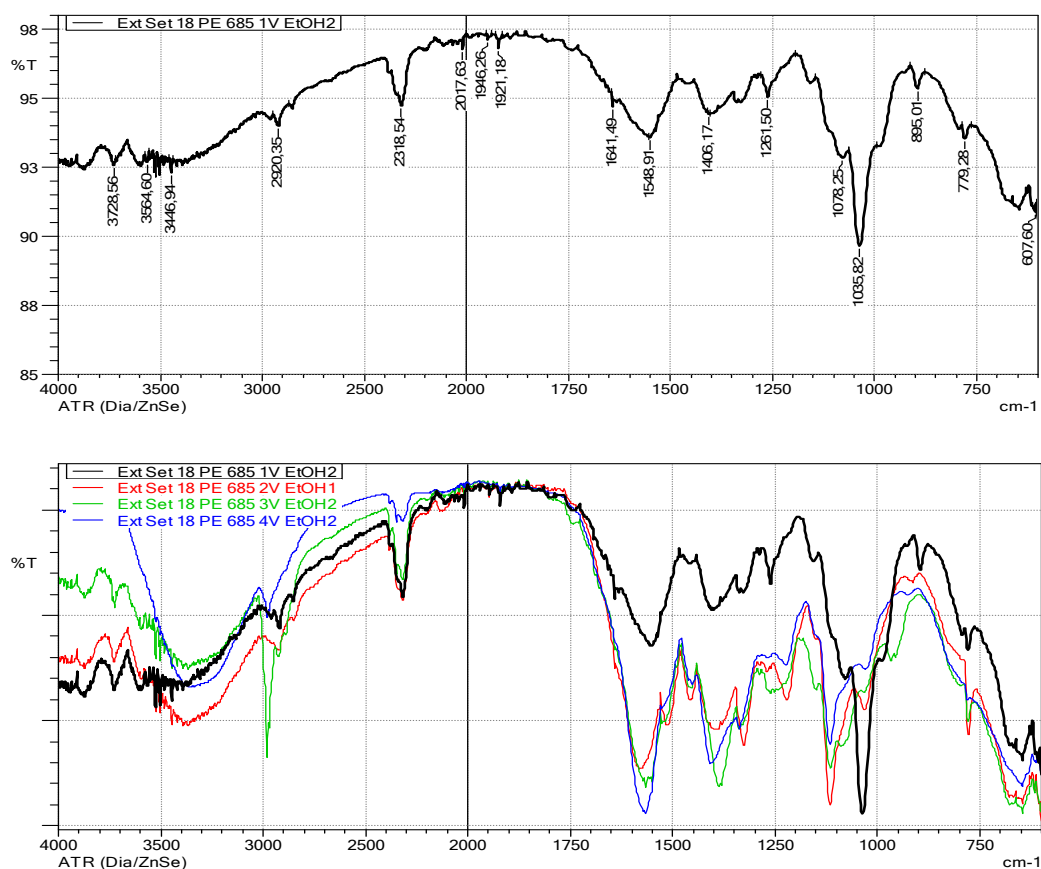


Figura 12-10. Espectros FTIR-ATR de los precipitados obtenidos por el agregado etanol de forma escalonada. En la parte superior, espectro del precipitado obtenido al agregar un volumen de etanol, indicando el número de onda de los picos característicos. En la parte inferior, imagen comparativa de los precipitados obtenidos por el agregado de etanol de forma escalonada (negro: 1 volumen etanol, rojo: 1+1 volúmenes etanol, verde: 1+1+1 volúmenes etanol, azul: 1+1+1+1 volúmenes etanol)

La parte superior de la Figura 12-10, corresponde al espectro FTIR-ATR del precipitado obtenido por el agregado del primer volumen de etanol al licor, cuyo pH fue ajustado previamente a 7, con ácido clorhídrico. Se observan las bandas características a los xilanos a alrededor de 1040 cm^{-1} , así como la banda característica del enlace glicosídico a 895 cm^{-1} . Se observan también las bandas en la zona de 1550 cm^{-1} asignadas a fragmentos de lignina. De acuerdo con esto y conjuntamente con los análisis de HPLC se puede decir que el precipitado está formado por xilosacáridos de alto peso molecular, unidos a fragmentos de lignina, como fue mencionado previamente. Al agregar sucesivamente etanol a los licores sobrenadantes, la banda a 1040 cm^{-1} , se vuelve cada vez menor. El pico a 895 cm^{-1} , no se aprecia, ya en el segundo agregado de etanol, lo que confirma que la fracción de xilosacáridos unida por enlace glicosídico es muy baja. No obstante, se intensifican las bandas en la zona de 1550 cm^{-1} , asignadas a los compuestos fenólicos.

Por lo visto en este ensayo, no resulta interesante separar las fracciones de xilosacáridos que precipitan por el agregado de etanol de forma escalonada, ya que con el primer volumen agregado precipita un alto porcentaje de los xilosacáridos de alto peso molecular presentes.

12.3.4. Evaluación del pH de agregado de solvente - Incidencia del contenido inicial de lignina.

A los efectos de analizar como varían los resultados obtenidos previamente si se trabaja con una muestra obtenida en diferentes condiciones, se repitió el procedimiento del apartado a) (precipitación con etanol a distintos pH), trabajando ahora con el licor extraído en condiciones menos severas de temperatura, donde fundamentalmente, el contenido de lignina, medido por la absorbancia de la solución a 280 nm, es menor. De esta forma se trabajó con el licor de la extracción 3 (condiciones de extracción: 105 °C, 45 minutos, 16,7 % carga de NaOH). En este análisis se incluyó la alternativa de precipitar a pH alrededor de 2. De acuerdo con los resultados precedentes, se utilizó 1 volumen de etanol para precipitar.

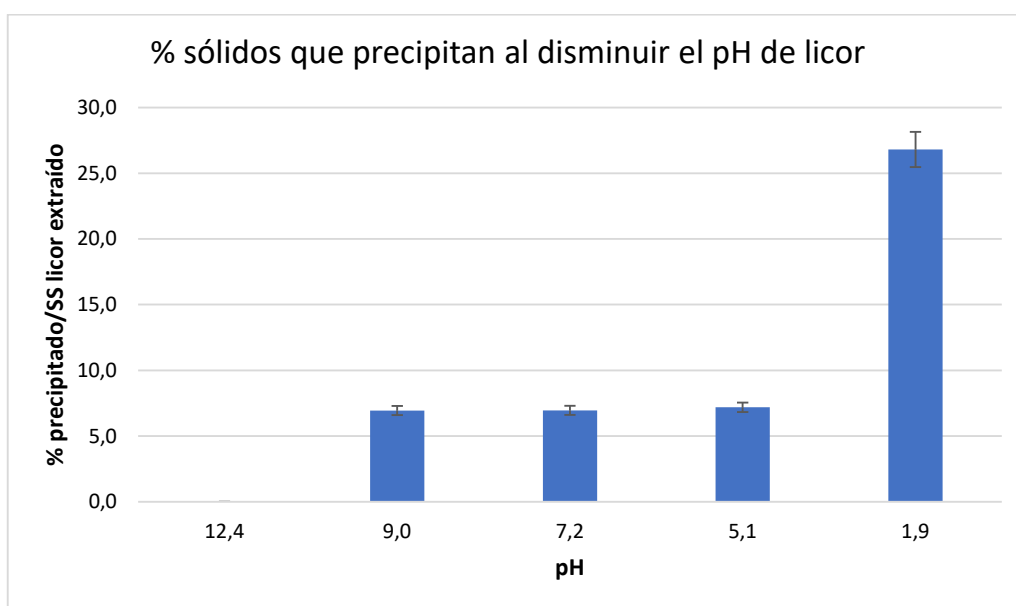


Figura 12-11. Sólidos precipitados al ajustar el pH del licor extraído. Corresponde al licor extraído a 105 °C, 45 minutos y 16,7 % de NaOH.

Nuevamente los precipitados obtenidos son de color negro. Como se puede apreciar en la Figura 12-11, el porcentaje de sólidos que precipitó entre el pH=9 y 5 es similar, alrededor de 7 % del contenido inicial de sólidos disueltos. Sin embargo, al bajar el pH a 2 este porcentaje aumenta sensiblemente, alcanzando el 27 %. La absorbancia a 280 nm del licor remanente (considerando una dilución 1 en 500) bajó un 15 % para los pH 9 y 7, un 20% para pH 5 y un 60 % a pH 2. En la Figura 12-12 se pueden observar las características de los licores a los distintos pH.



Figura 12-12. Licores obtenidos luego del ajuste de pH. De izquierda a derecha: licor obtenido a pH 9, 7, 5 y alrededor de 2.

Comparando estos valores con los obtenidos con el licor con mayor contenido de lignina (analizados en el ítem a), en ese caso precipitó una fracción un poco mayor de los sólidos disueltos iniciales (llegando hasta 13 % de los mismos), lo que se explicaría por el mayor porcentaje de lignina en la solución. Igualmente, la cantidad de sólidos precipitados aumentó al bajar el pH hasta 7 y luego se mantuvo estable (recordar que se disminuyó el pH solo hasta pH=5); a diferencia del caso analizado ahora, donde la remoción de sólidos entre pH=9 y pH=5 se mantuvo estadísticamente igual.

Analizando el contenido de xilosacáridos del licor luego del ajuste de pH, precipitaron alrededor del 35 % de los xilosacáridos a pH 9 y 7, aumentando este valor a aproximadamente 46 % a pH 5 y 2. Estos resultados se ajustan a los reportados por O'Dwyer (O'Dwyer, 1926) donde se menciona la precipitación de una fracción de las hemicelulosas presentes al bajar el pH.

Al agregar etanol a la solución resultante, los precipitados obtenidos en los pH trabajados entre 12,4 y 5,1 presentaron características similares, siendo todos de color pardo y no observándose diferencias a la vista entre ellos. Sin embargo, el precipitado obtenido a pH 1,9 (aproximadamente 2), presentó una coloración parda un poco más clara, principalmente visible en húmedo (Figura 12-13).



Figura 12-13. Precipitados obtenidos luego del agregado de etanol al licor con pH ajustado. Izquierda: pH ajustado en 5,1, a la derecha pH=1,9.

En la Figura 12-14 se muestra el porcentaje de xilosacáridos que precipitó al agregar etanol a la solución, con respecto al que se encontraba presente en el licor previo al ajuste de pH. Se muestra también el porcentaje de xilosacáridos en los precipitados obtenidos.

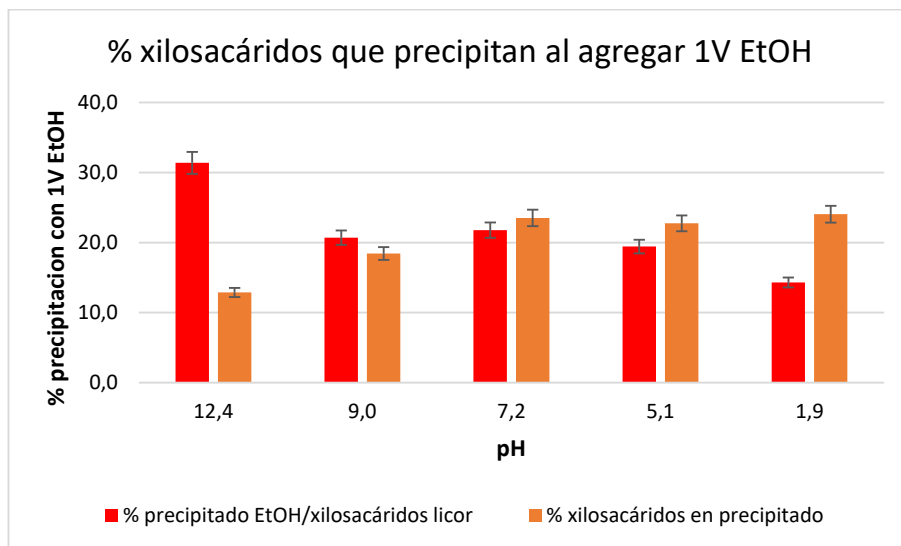


Figura 12-14. Precipitados obtenidos al precipitar con etanol a diferentes pH. Las barras naranjas muestran el porcentaje de xilosacáridos que forman parte del precipitado.

De acuerdo con la Figura 12-14, la mayor fracción de xilosacáridos precipitados se obtuvo al trabajar al pH original del licor (31%), descendiendo a alrededor de 20 % de los xilosacáridos iniciales presentes en el precipitado, cuando se trabajó entre pH 9 y 5. A pH 1,9 la fracción de xilosacáridos que precipita por el agregado de etanol es de alrededor de 15%. El contenido de xilosacáridos en el precipitado fue de 13% con pH original del licor y entre 18 y 24 % con los otros valores de pH ensayados, no observándose grandes cambios en las características del mismo.

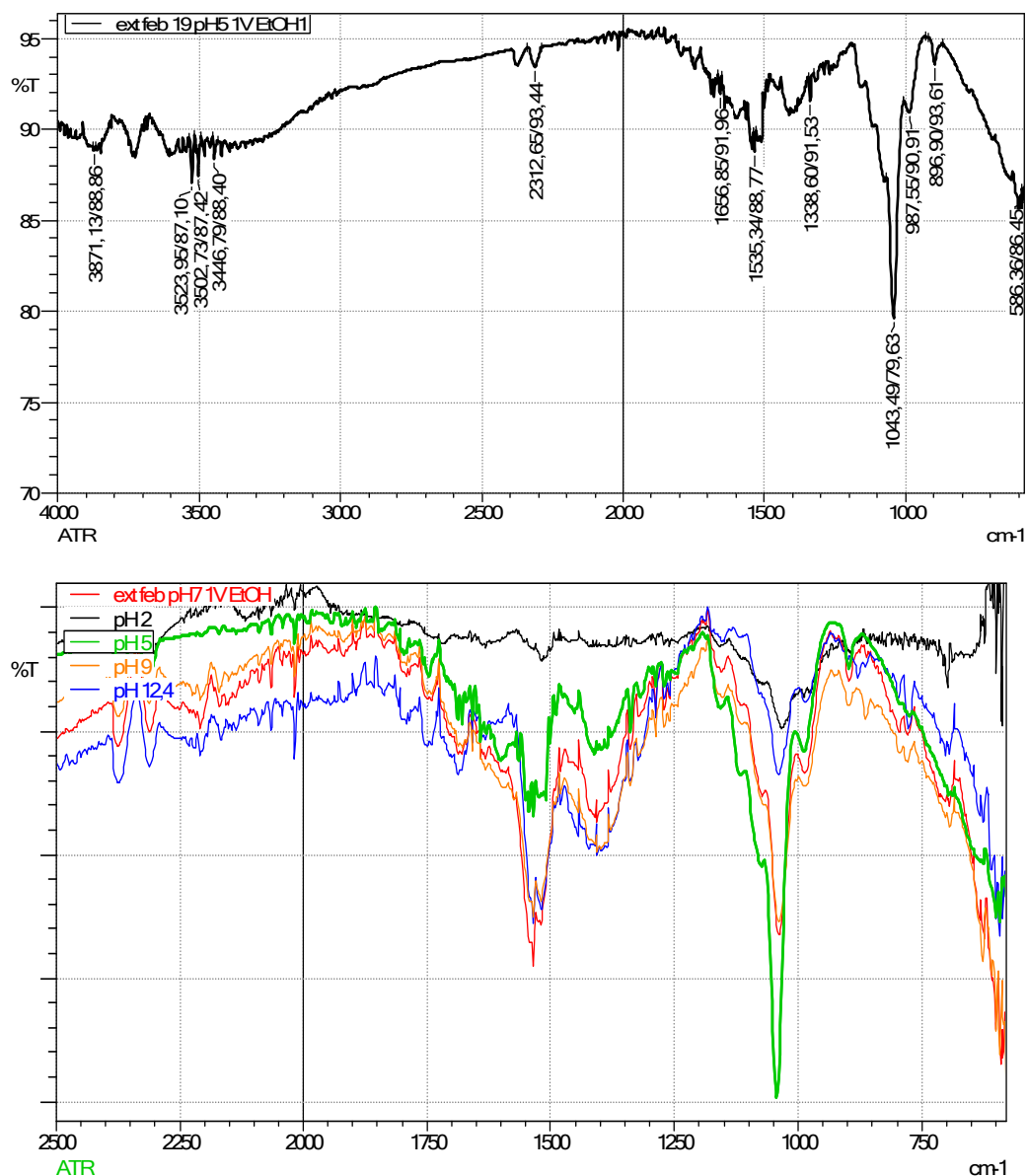


Figura 12-15. Espectros FTIR-ATR de los precipitados obtenidos precipitando con el licor a distintos pH. En la parte superior, espectro del precipitado obtenido al agregar un volumen de etanol a pH=5, indicando el número de onda de los picos característicos. En la parte inferior, imagen comparativa de los precipitados obtenidos por el agregado de etanol a los distintos pH ensayados (en este caso solo se muestra la región entre 2000-600 cm^{-1}) (azul: pH original del licor= 12,4; naranja: pH 9; rojo: pH 7; verde: pH 5 y negro pH 2) .

Analizando los espectros FTIR-ATR, en todos los espectros se pueden observar las bandas características a los (1-4)- β -xilanos y a los enlaces β -glicosídico que se discutieron en mayor profundidad en el ítem a) de esta sección. Se observan también las bandas en la región de 1510 cm^{-1} , asignadas a los compuestos fenólicos. Ambas observaciones vuelven a confirmar la presencia de xilosacáridos y fragmentos de lignina en el precipitado.

La distribución de pesos moleculares de los precipitados se presenta en la Tabla 12-5.

Tabla 12-5. Distribución de pesos moleculares de los precipitados obtenidos con 1V de etanol a diferentes pH. Licor extraído a 105 °C, 45 minutos y 16,7% de NaOH.

pH del licor	Distribución de pesos moleculares				
	#	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn	%
12,4	Total	1772	9870	5,85	
	1	22729	24350		36,5
	2	1159	1561		63,5
7,2	Total	3122	16860	5,40	
	1	42937	43899		10,0
	2	22815	24378		47,8
	3	1420	1930		42,2
5,1	Total	4310	22745	5,28	
	1	48801	52508		17,0
	2	21699	23660		56,5
	3	1309	1699		26,5
1,9	Total	21038	26569	1,26	
	1	44481	46150		17,2
	2	18960	22497		82,8

En estos casos, ha medida que se realizó la precipitación a pH menor se hizo cada vez más predominante el pico de interés en la región de 22.000 -24.000.

REDISOLUCION Y REPRECIPITACIÓN.

El precipitado obtenido a pH 7 y con el agregado de 1 volumen de etanol se redisolvió en agua destilada, produciéndose una solución oscura de pH 9,1 y con un contenido de sólidos disueltos de 4,6 g/L. Sobre esta se agregó etanol en una en relación 1:1. Se evaluó como cambia la conformación y características del precipitado al re-disolverlo y volver a agregar etanol.

Al agregar etanol en las condiciones mencionadas en los apartados anteriores, el rendimiento de precipitación fue del 6,6 %. Si bien el precipitado aún mantiene el color pardo, es de aspecto diferente a los anteriores. A diferencia de otros en que era particulado o de films quebradizos, en este caso se formó un film liviano, más resistente a la manipulación (Figura 12-16).

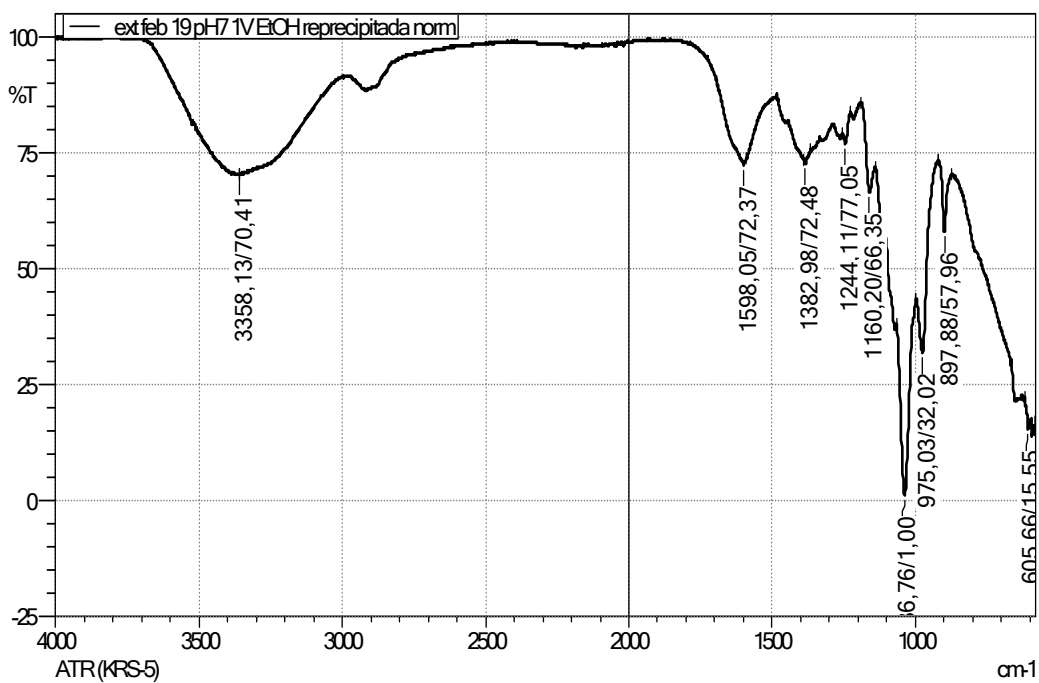
El análisis de carbohidratos, luego de disolverlo en hidróxido de sodio 0.1 M (a los efectos de mantener las mismas condiciones en que fueron medidos los demás precipitados), indicó un contenido de xilosacáridos del 36 %, mejorando frente al contenido del precipitado original, pero siendo todavía muy bajo, aún más si se considera el magro rendimiento de la reprecipitación. La absorbancia a 280 nm paso de 1,431 para el precipitado sin redissolver y reprecipitar a 0,076 (ambos considerando dilución de 1/50), lo que indica que se logró eliminar compuestos fenólicos en la reprecipitación.

Al realizar el cromatograma para el estudio del peso molecular de este compuesto, el mismo presentó un solo pico que corresponde a un peso molecular medio ponderado (Mw) de 36.370 ± 56 Da.



Figura 12-16. Precipitado obtenido al disolver el precipitado a pH 7 y un volumen etanol y volverlo a precipitar con etanol (1V).

El precipitado fue analizado por FTIR-ATR, obteniéndose el espectro que se muestra en la Figura 12-17 .



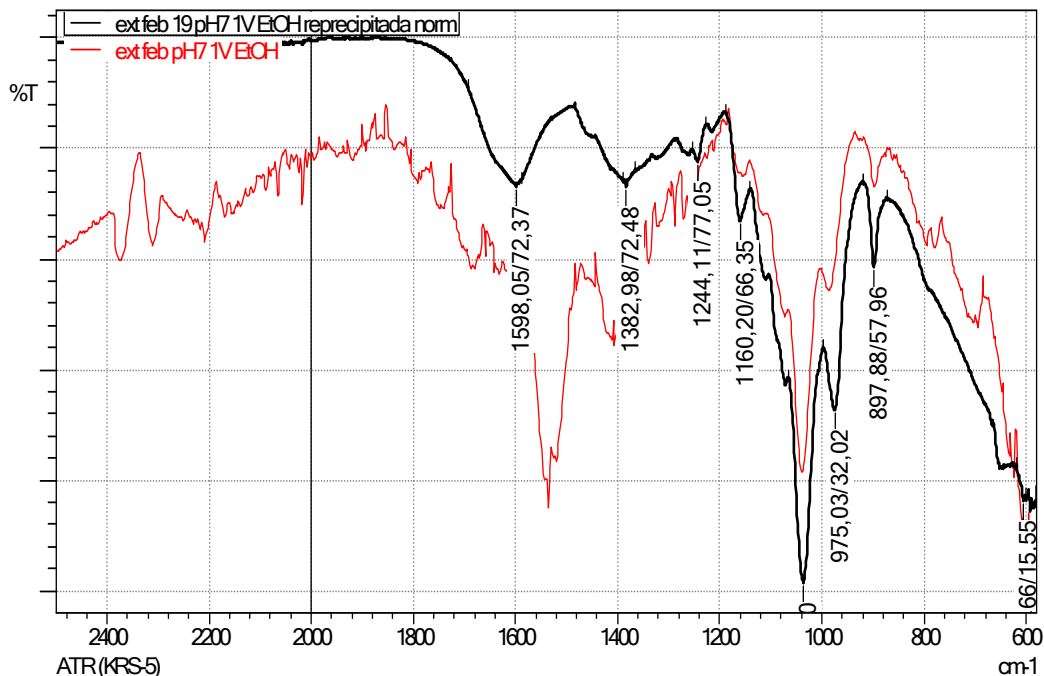


Figura 12-17. En la parte superior, espectro FTIR-ATR del precipitado obtenido luego de disolver y reprecipitar con etanol el precipitado a pH 7 y 1 volumen de etanol. En la parte inferior, imagen comparativa del precipitado obtenido a pH 7 y 1 volumen de etanol (rojo) y del precipitado obtenido luego de la redisolución del precipitado y reprecipitación (negro) (se muestra la región entre 2000-600 cm^{-1}).

Al redissolver y reprecipitar, el precipitado presenta señales muchos más “limpias”, observándose más intensamente las bandas correspondientes a los xilosacáridos y bajando mucho la intensidad de las bandas correspondientes a los compuestos fenólicos (región de 1500-1600 cm^{-1}). Posiblemente la reprecipitación con etanol, favoreció la remoción de compuestos fenólicos, aunque como se mencionó sólo se aumentó parcialmente el contenido de xilosacáridos presentes (36 % de la composición del precipitado). Por la baja cantidad del mismo no fue posible realizar ensayo de cenizas de forma de determinar si el resto de los sólidos disueltos pueden corresponder a sales inorgánicas, como un excedente de hidróxido de sodio, por ejemplo.

12.3.5. Precipitación con solventes a distintos pH, utilizando ácidos sulfúrico y acético para el ajuste de pH

AJUSTE DE PH CON ÁCIDO SULFÚRICO

Dado que el ácido clorhídrico tiene propiedades corrosivas, su uso industrial presenta ciertas desventajas. Se analizó el uso de otros ácidos normalmente utilizados a nivel industrial y reportados en la bibliografía de este tema (Wolfrom and Stuart Tipson, 1955; Peng *et al.*, 2012; Costabel, 2013). Para ello se ajustó el pH del licor a distintos valores, trabajando con ácido

sulfúrico o ácido acético. Para el caso de los ensayos con ácido sulfúrico se utilizó licor extraído a 155 °C, 135 min, 6.7% NaOH (Extracción 4). Se repitió el procedimiento realizado en a).

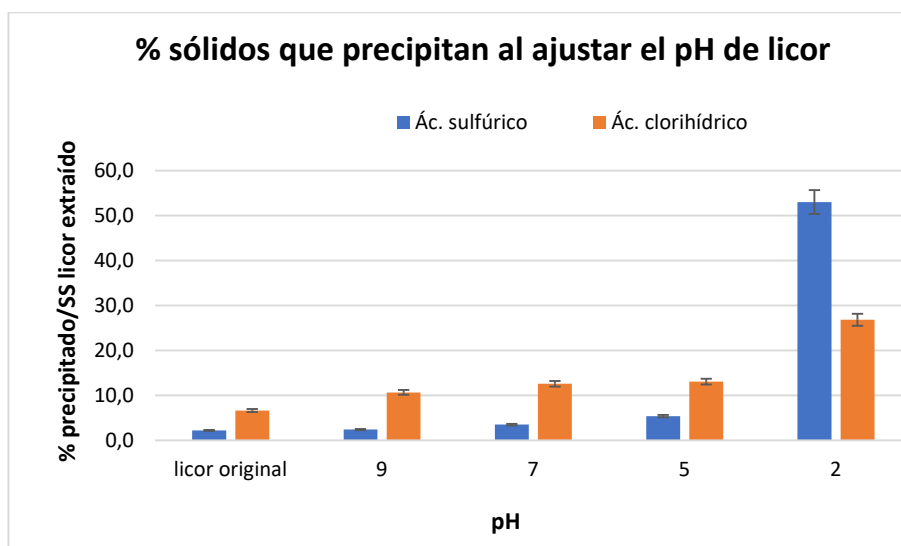


Figura 12-18. Sólidos precipitados al ajustar el pH del licor extraído con ácido sulfúrico y ácido clorhídrico. Los valores reportados para ácido clorhídrico son los valores previamente reportados en el ítem a).

Al igual que con el uso de ácido clorhídrico, el porcentaje de material que precipitó aumenta a medida que baja el pH (Figura 12-18). El valor de absorbancia a 280 nm de la solución luego de ajustar el pH y separar el precipitado bajó un 7,5 % para pH=9, un 11% para pH=7 y un 14 % a pH=5, respecto al valor original del licor. Estos porcentajes son menores a los obtenidos con el licor utilizado en a) (barras naranjas), dado que, por las condiciones de extracción, el contenido de lignina del licor original es menor en este caso. Sin embargo, al bajar el pH a 2, precipitó más del 50 % de los sólidos disueltos iniciales y la absorbancia bajó un 47 %.

Respecto a los xilosacáridos un $14,5 \pm 0,4$ % precipitó al ajustar el pH a 5; mientras que, para los pH mayores analizados, no se registraron pérdidas de xilosacáridos por el ajuste de pH. Sin embargo, al ajustar el pH en 2 se removieron un 68 % de los xilosacáridos presentes.

La Figura 12-19 muestra una imagen de las características de los sólidos obtenidos al bajar el pH (hasta pH 5) y luego del agregado de etanol. Al igual que en las condiciones anteriores, se obtuvieron precipitados pardo-negros.



Figura 12-19. En la parte superior, precipitados obtenidos al bajar el pH del extracto y centrifugar. En la parte inferior, luego del agregado de 2 volúmenes de etanol.

Por otro lado, al agregar un volumen de etanol al líquido remanente a pH 2 se obtuvo un precipitado de características diferentes a los anteriores, que presentó un color amarillento (Figura 12-20).

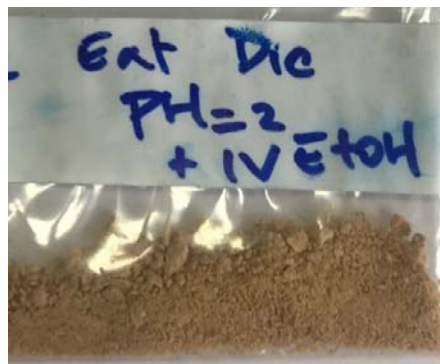


Figura 12-20. Precipitado obtenido al agregar 1 volumen de etanol a pH=2 ajustado con ácido sulfúrico.

Como puede verse en la Figura 12-21, al pH original, precipitaron el 44 % de los xilosacáridos presentes en el licor original, mientras que este valor aumenta a medida que baja el pH. A pH= 5,3 se logra precipitar el 84 % de los xilosacáridos iniciales presentes y se precipitan completamente los xilosacáridos remanentes al trabajar a pH 2. Estos valores son mayores a los obtenidos al precipitar con ácido clorhídrico. Respecto a la composición del precipitado, el 30 % del precipitado obtenido al agregar etanol a pH 5 correspondió a xilosacáridos, mientras que a pH= 9 este valor fue de 26 %. Sin embargo, solamente un 2% del precipitado obtenido a pH 2 corresponde a xilosacáridos. En este caso el contenido de cenizas fue de 52%. La composición de los precipitados en términos de xilosacáridos es un poco menor a los obtenidos ajustando el pH con ácido clorhídrico. Particularmente en el caso del precipitado obtenido a pH 2 el porcentaje de xilosacáridos en el precipitado es extremadamente bajo debido a la gran proporción de sólidos inorgánicos que precipitan.

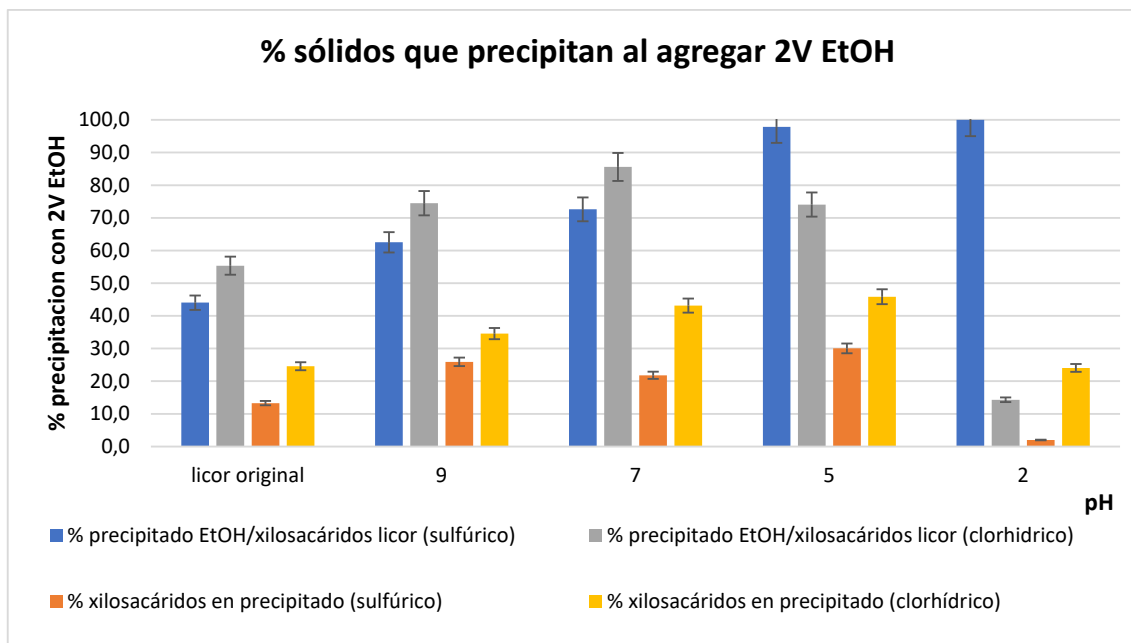


Figura 12-21. Precipitados obtenidos al precipitar con dos volúmenes de etanol a diferentes pH y utilizando ácido sulfúrico o ácido clorhídrico para el ajuste de pH a distintos valores. Las barras naranjas o amarillas muestran el porcentaje de xilosacáridos que forman parte del precipitado.

Tabla 12-6. Distribución de pesos moleculares de los precipitados obtenidos con 2V de etanol a diferentes pH. Licor extraído a 155 °C, 135 minutos y 6,7% de NaOH.

pH del licor	Distribución de pesos moleculares				
	#	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn	%
10,9 (licor original)	Total	1926	5682	2,95	
	1	27048	27682		13,3
	2	1686	2307		86,7
9	Total	1983	5720	2,88	
	1	28239	28678		11,9
	2	1762	2625		88,1
7	Total	1989	7895	3,97	
	1	27343	27945		22,6
	2	1565	2048		77,4
5	Total	4714	17773	3,77	
	1	22077	24567		69,8
	2	1671	2039		30,2

El peso molecular promedio de todos los precipitados indicados en la Tabla 12-6, a excepción del obtenido a pH=5 fue significativamente más bajo que los obtenidos en los ensayos de precipitación realizados en iguales condiciones pero con el licor de la Extracción 1 (Tabla 12-2). Esto puede deberse a la menor presencia de fragmentos de lignina, en este caso por utilizar una carga de soda más baja, o a la hidrólisis parcial de las hemicelulosas al trabajar a pH más bajo en la extracción. En el análisis de la distribución de pesos moleculares del precipitado en etanol obtenido a pH 2 no se detectaron picos (utilizando el RID como detector), lo que confirma el bajo contenido de xilosacáridos en el precipitado.

A partir del análisis de FTIR del precipitado (Figura 12-22) obtenido al pH original del licor, se observó una mayor presencia de lignina que a los otros pH, dada por la intensidad relativa de los picos en la zona de 1510 cm^{-1} y en la región entre 1600 y 1730 cm^{-1} . Por otro lado, se visualiza claramente la banda característica de las vibraciones de estiramiento y rotación de los (1-4)- β -xilanos alrededor de 1040 cm^{-1} . Al bajar el pH, es notoria la disminución de la intensidad de los picos que corresponden a fragmentos de lignina, pero comienza a enmascararse la banda de los xilanos mencionada, ya que aparece una banda alrededor de 1100 cm^{-1} que, mediante el software del instrumento, se asigna a sulfato de sodio. A pH = 5 esta banda aumenta mucho de intensidad, no permitiendo definir si existen la banda a 1040 cm^{-1} , característica de los xilanos. En estas condiciones, las características del precipitado obtenido al agregar etanol a pH= 7 y 9 fueron similares. Consultado el “Lange’s Handbook of Chemistry, 15th Ed.”, el sulfato de sodio es insoluble en etanol (solubilidad: 0,44 g / 100g solvente) por lo que se explica que los grupos sodio y sulfato presentes, precipiten al cambiar el solvente.

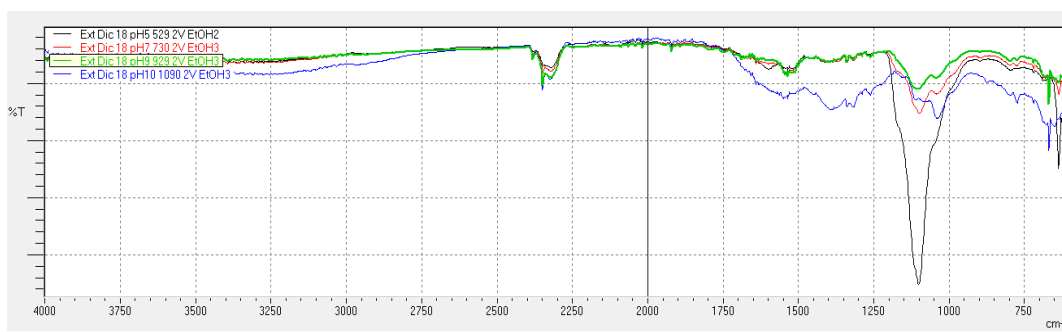


Figura 12-22. Espectros FTIR-ATR de los precipitados obtenidos por el agregado de 2V de etanol a distintos pH sobre el licor extraído a 155 °C, 135 minutos y 6,7 % NaOH (azul: licor original pH=10,9; verde: pH 9; rojo: pH 7; negro: pH 5.

Costabel (Costabel, 2013) trabajando con un extracto alcalino de abedul, evaluó la precipitación de xilanos por acidificación con ácido sulfúrico hasta pH 9,0, 7,3 y 4,5. En el sobrenadante agregó 1 volumen de etanol al pH original del licor extraído. No detalla el rendimiento de precipitación de los distintos precipitados, pero señala que, el 74-77% de los precipitados obtenidos por el agregado de ácido está formado por compuestos de xilosa, mientras que este valor corresponde al 42% en el caso del precipitado obtenido por el agregado de etanol. No se señala a qué corresponden los demás componentes de los precipitados, ni las características físicas de éstos.

AJUSTE DE PH CON ÁCIDO ACÉTICO

Dado que el ajuste de pH con ácido sulfúrico presentó los problemas de solubilidad del sulfato de sodio mencionados, en los ensayos siguientes se utilizó ácido acético glacial en lugar de ácido sulfúrico. En este caso se trabajó con el licor obtenido en la Extracción 3 (105 °C, 45 minutos y 16,7% NaOH). Se ajustó el pH a 9 y a 4,4 (ya que es cercano al valor de pKa del ácido acético y por ello no se logra bajar el pH más allá de este valor).

Al ajustar el pH precipitó el 45 % de los sólidos disueltos a pH=9 y el 58% a pH=4,4. El precipitado obtenido, una vez seco, presentó un aspecto de film gelificado, de color negro, posiblemente por la acetilación de la lignina que compone el precipitado. No fue posible determinar el

contenido de xilosacáridos del sobrenadante, ya que el pico correspondiente al ácido acético en el cromatograma enmascaró los demás picos de la región.

Existen referencias bibliográficas (Wolfrom and Stuart Tipson, 1955; Peng, 2012) donde ajustan el pH a 5,5 con ácido acético y obtienen un precipitado de las denominadas “Hemicelulosas A”. Pero en estos casos se realizó previamente una deslignificación del material con clorito de sodio, por lo que los resultados obtenidos no son comparables. Por otra parte (Lisboa *et al.*, 2005; Santiago and Pascoal Neto, 2008) trabajando con licor negro de *Eucalyptus globulus* y Costabel *et al.* (Costabel, 2013), trabajando con un licor alcalino de madera de abedul, ajustan el pH con ácido acético, pero posterior al agregado de dioxano, por lo que no se puede comparar con los resultados de este trabajo.

En la Figura 12-23 se pueden observar los precipitados obtenidos al agregar un volumen de etanol a las soluciones luego del ajuste de pH y remoción de los sólidos formados.



Figura 12-23. Precipitados obtenidos al agregar etanol a las soluciones con pH ajustado con ácido acético. A la izquierda, pH ajustado a 9; a la derecha pH ajustado a 4,4.

Los precipitados obtenidos al agregar etanol presentaron el mismo aspecto negruzco que los precipitados obtenidos al ajustar el pH con ácido clorhídrico. Particularmente el precipitado a pH 4,4 fue más heterogéneo, presentando zonas un poco más claras. Tanto a pH 9 como a pH 4,4, al agregar un volumen de etanol, precipitó el 20 % de los xilosacáridos presentes en el licor original. A pH 9, el 10 % del precipitado obtenido corresponde a xilosacáridos, mientras que a pH 4,4, el porcentaje de xilosacáridos en el precipitado es de 18%.

La distribución de pesos moleculares de los precipitados mostró un solo pico resultando en un Mw de 32865 Da para el precipitado a pH 9 y de 28345 Da para el precipitado de pH 4,4.

Del análisis de los espectros de FTIR-ATR obtenidos a partir de los sólidos precipitados con etanol a pH 9 y pH 4,4, se puede señalar que ambos espectros fueron muy similares, pero no se identifican los picos característicos de los xilosacáridos (Figura 12-24).

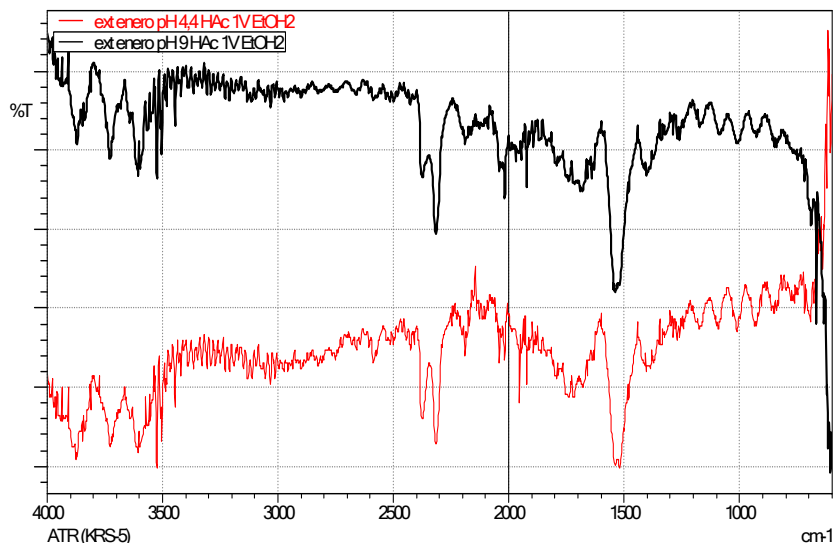


Figura 12-24. Espectros FTIR-ATR de los precipitados obtenidos luego del agregado de un volumen de etanol, luego del ajuste de pH a 9 y 4,4 con ácido acético.

Timell (Timell, 1964) señaló que en “en las primeras investigaciones sobre xilanos de madera de frondosas, a menudo se usaba hidróxido de potasio acuoso (en lugar de hidróxido de sodio), presumiblemente debido a la alta solubilidad del acetato de potasio”. Analizando la solubilidad del acetato de sodio la misma corresponde a 5,3 g/100 g etanol, por lo que se puede mencionar como poco soluble. Para el caso del acetato de potasio, no ha sido posible encontrar el valor de solubilidad en etanol, pero si la definición de “soluble” en este solvente (Winkler, no date).

12.3.6. Precipitación a diferentes pH utilizando dioxano como solvente.

A los efectos de evaluar que sucede con la precipitación de las hemicelulosas con el agregado de un solvente distinto al etanol y de acuerdo con la revisión bibliográfica, se decidió utilizar dioxano como solvente de precipitación. Se trabajó para ello con licor obtenido en la Extracción 4 (155°C, 135 minutos y 6,7% de carga de soda). Se agregaron dos volúmenes de dioxano a cada fracción de licor a analizar, trabajando al pH original del licor y ajustando el pH a valores de 9, 7 y 5 con ácido sulfúrico.

Se removió entre 6,6 y 13,2 % de los sólidos iniciales disueltos al regular el pH a los valores indicados y centrifugar.

Al agregar 2 volúmenes de dioxano se logró la mayor precipitación de xilosacáridos trabajando al pH original del licor, donde precipitó el 57% de los xilosacáridos originales presentes, mientras que, a pH menores, precipitó entre 33% de los xilosacáridos originales a pH 9 y en el entorno de 45% a pH menores (Figura 12-25). No se encontró una justificación para el apartamiento de la tendencia a pH 9, asignándose a factores experimentales. A diferencia de la precipitación con etanol, donde a menor pH precipita un porcentaje mayor de xilosacáridos, para el dioxano, se remueven más xilosacáridos a mayor pH de trabajo. Los precipitados obtenidos con dioxano también son de color negro. El precipitado a pH 5 fue heterogéneo, con zonas de color negro y

zonas más cristalinas de color blanquecino, lo que es indicativo de la precipitación de alguna sal inorgánica.

Respecto a la composición de los precipitados, al pH original (11,0), el 21% del precipitado obtenido correspondió a xilosacáridos. A los otros pH analizados, solo el 10% o menos del precipitado estuvo compuesto por xilosacáridos (Figura 12-25).

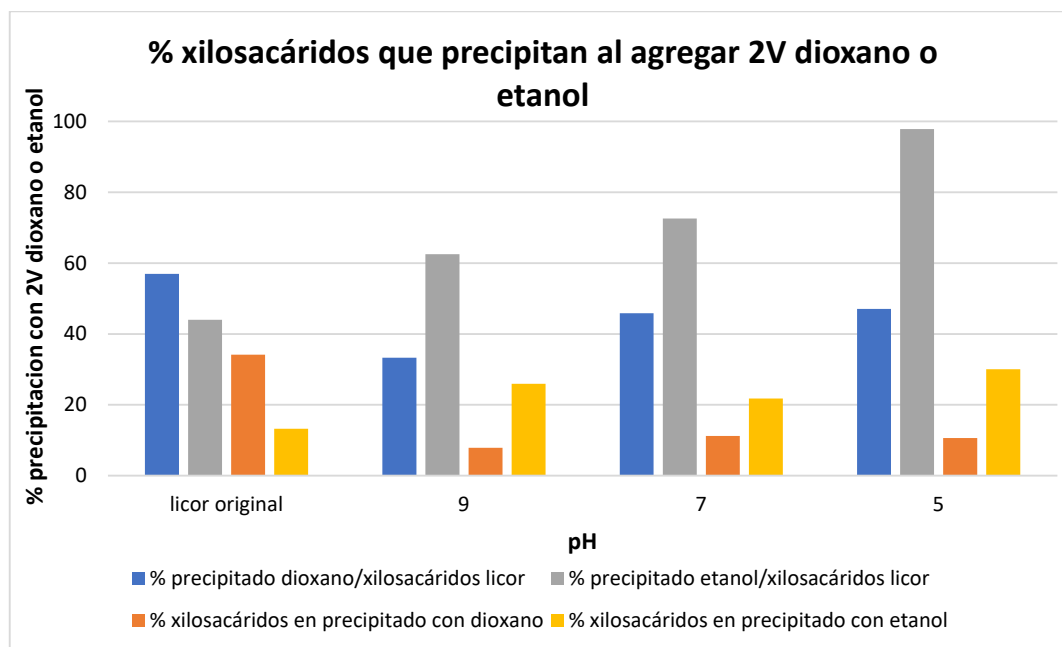


Figura 12-25. Precipitados obtenidos al precipitar con dos volúmenes de dioxano a diferentes pH y su comparación para la precipitación con etanol en las mismas condiciones.

Santiago y Pascoal Neto (Santiago and Pascoal Neto, 2008) utilizaron licor negro proveniente de pulpeo Kraft de *Eucalyptus globulus*. Realizaron la precipitación con dos volúmenes de dioxano y posteriormente al agregado de éste, ajustaron el pH a 5 con ácido acético. Destacaron que el 78-84% de los polisacáridos del precipitado son xilosacáridos, pero no mencionan la composición completa del precipitado ni el aspecto de este. Por otro lado, Costabel (Costabel, 2013) utilizando licor de abedul extraído a 95 °C, 60 minutos y 2,5 M NaOH, y precipitando con dos volúmenes de dioxano con posterior ajuste del pH a 5 con ácido acético, reportó que el 63 % del precipitado obtenido estaba compuesto por xilosacáridos, mientras que el 23% correspondía a lignina. No se menciona el aspecto del precipitado obtenido.

La distribución de pesos moleculares de los distintos precipitados se muestra en la Tabla 12-7.

Tabla 12-7. Distribución de pesos moleculares de los precipitados obtenidos con 2V de etanol a diferentes pH. Licor extraído a 155 °C, 135 minutos y 6,7% de NaOH.

Distribución de pesos moleculares					
Rel Vol etanol:licor					
	#	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn	%
11,0	Total	2300	6750	2,93	
	1	28924	29314		15,0
	2	1980	2780		85,0
9,1	Total	2110	9566	2,50	
	1	25168	26428		30,9
	2	1496	2019		69,1
7,1	Total	2974	10494	2,07	
	1	21670	23407		37,8
	2	1952	2658		62,2
5,1	Total	3688	4110	1,11	
	1	3688	4110		100

Comparando la distribución de pesos moleculares de los precipitados con dioxano frente a los que presentan los precipitados con etanol del mismo licor (Tabla 12-6), se observa que, para los precipitados a pH de 11, 9 y 7, el Mw fue similar, estando compuesto éste por dos picos, uno alrededor de 27000 Da y otro en orden de 2000 Da. En todos los casos, la fracción de peso molecular mayor fue siempre un poco superior para los precipitados con etanol que para los precipitados con dioxano. A pH 5, para el caso de la precipitación con dioxano, solo se encontró un pico correspondiente a Mw 4110 Da, mientras que en el caso de etanol mantuvo la tendencia de los otros pH de dos picos en el entorno descrito. Este comportamiento factiblemente sea por las diferencias de la estabilidad de las soluciones de los distintos solventes a diferentes pH, pero como no fue medida la constante dieléctrica, potencial zeta u otra condición de los solventes, no se puede discutir en más profundidad este comportamiento. El peso molecular ponderado de estos precipitados, al igual que los obtenidos al precipitar el mismo licor con etanol, están muy por debajo del peso molecular obtenido cuando se utiliza una mayor carga de soda, de acuerdo a lo que se discutió en el ítem b) de este apartado.

Costabel reportó un peso molecular ponderado de 20.000 Da para el precipitado obtenido con chips de abedul previamente mencionado (Costabel, 2013). Santiago y Pascoal Neto (Santiago and Pascoal Neto, 2008) en el estudio con licor negro Kraft de eucalipto previamente mencionado, reportaron un peso molecular de 28.000 Da para el precipitado obtenido al final de la fase de impregnación (120 °C, 45 minutos, álcali activo 14 % Na₂O), bajando este a 15.000 - 17.000 Da a 160 °C. Al finalizar la etapa de pulpeo (80 minutos a 160 °C) el peso molecular del precipitado obtenido vuelve a subir, alcanzando 22.000 Da; los autores no explican este comportamiento, aunque se puede atribuir a la contaminación con lignina del precipitado obtenido. Estos valores son significativamente mayores a los obtenidos en la precipitación con dioxano en este trabajo, aunque es muy similar a los obtenidos al precipitar con etanol la extracción 1 (155°C, 45 minutos y 16,7 % NaOH), como se describió en el ítem a) de este apartado.

El espectro FTIR-ATR de los precipitados obtenidos a los diferentes pH, se muestra en la Figura 12-26.

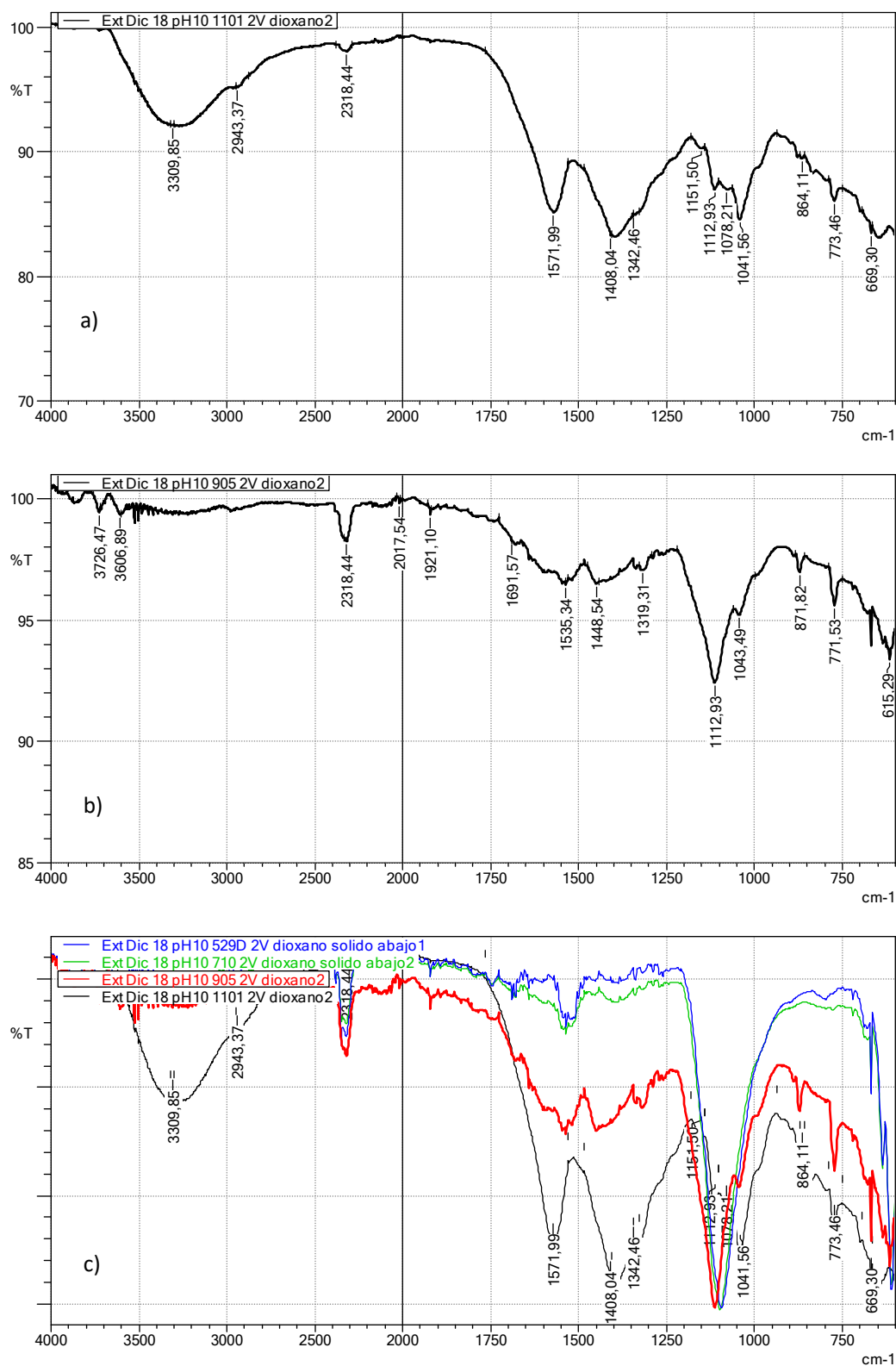


Figura 12-26. Espectros FTIR-ATR de los precipitados obtenidos utilizando 2V de dioxano a distintos pH. a) Espectro obtenido a pH original del licor extraído, identificándose los picos característicos. b) espectro a pH =9 con la identificación de picos característicos. c) comparación de espectros a los 4 pH utilizados.

En la Figura 12-26 se observa que al pH original del licor se ven los picos característicos de los xilosacáridos, así como algunos picos correspondientes a los fragmentos de lignina. Sin embargo, al bajar el pH a 9, es notable el pico a 1100 cm^{-1} que corresponde el sulfato de sodio, pico que enmascara los picos de los xilosacáridos a pH menores. La presencia de sulfato de sodio en el precipitado no puede evitarse por el cambio de solvente de etanol a dioxano.

Posteriormente se repitió la precipitación utilizando dos volúmenes de dioxano, sobre el licor de la Extracción 3 (105 °C, 45 minutos y 16,7 % NaOH) y trabajando a dos pH, el original del licor (12,6) y el pH ajustado a 7 con ácido clorhídrico. Al ajustar el pH precipitaron el 7 % de los sólidos disueltos del licor original y el 35 % de los xilosacáridos presentes. Con el agregado de dioxano precipitó el 30% de los xilosacáridos presentes en el licor original a pH 12,4 y 21 % de los éstos a pH 7. El contenido de xilosacáridos en los precipitados fue del entorno de 49 % en ambos casos. Los valores obtenidos son similares a los encontrados utilizando etanol para el mismo licor. Dado que el dioxano es un solvente más costoso y ambientalmente menos amigable que el etanol, no se considera ventajoso utilizarlo.

12.4. Conclusiones

Se estudiaron diferentes condiciones de precipitación con solventes de xilosacáridos provenientes de extractos alcalinos. Se confirma que el etanol es un buen solvente para precipitar las hemicelulosas provenientes de una extracción alcalina.

Bajar el pH antes del agregado de etanol permite la separación de una fracción de fragmentos de lignina, que de lo contrario precipitaría con el agregado de etanol. Los mayores rendimientos de precipitación de xilosacáridos y proporción de xilosacáridos se logran ajustando el pH a 7. A pH 9 se logran rendimientos un poco más bajos, pero se debe considerar que el agregado de ácido para ajustar el pH es menor. Al continuar bajando el pH a 5, si bien el contenido de xilosacáridos en el precipitado es mayor, el rendimiento en conjunto baja, ya que existen pérdidas de xilosacáridos por el ajuste de pH. Trabajando a pH 2, existe una pérdida de xilosacáridos por ajuste de pH que no lo hace aceptable.

Trabajar con altas concentraciones de licor en la extracción permitió obtener precipitados de alto peso molecular, en el orden de 18000 Da.

Los espectros FTIR-ATR de las condiciones seleccionadas, presentaron los picos característicos de la presencia de xilosacáridos en el precipitado, aunque se observan también picos asignables a grupos fenólicos, que corresponden a fragmentos de lignina. En algunos casos la presencia de sulfato de sodio enmascaró algunos picos característicos de los xilosacáridos.

Referente a la cantidad de etanol a agregar, se encontró que trabajar con el agregado de 1 volumen de etanol, se obtienen rendimientos de precipitación alto, los que aumentan levemente al agregar una mayor cantidad del solvente. Sin embargo, dado lo relativo del aumento, no se justifica utilizar más solvente y se considera como óptimo el agregado de un volumen de etanol. Los precipitados obtenidos presentan todas características similares.

En las condiciones analizadas, no se consideró relevante realizar una precipitación escalonada de las hemicelulosas presentes.

Se utilizó ácido clorhídrico para el ajuste de pH en la mayoría de los casos, salvo los mencionados explícitamente. Cambiar este ácido por ácido sulfúrico o acético, no arrojó buenos resultados, ya que al agregar el etanol se produce la precipitación de las correspondientes sales de sodio.

De acuerdo con los resultados obtenidos, no se encontró que el dioxano sea un mejor solvente que el etanol para precipitar las hemicelulosas. Más aún si se considera el costo y disponibilidad del etanol frente al dioxano como solvente precipitante.

13. ENSAYOS DE PURIFICACION Y CONCENTRACIÓN: RESINAS DE INTERCAMBIO

Este trabajo fue parte de dos proyectos de investigación:

La purificación del licor de 180 °C, 10 minutos que se utilizó para purificar los xilosacáridos presentes es parte del Proyecto de Investigación “DOC.CB2G.2018_01. Pretratamiento de impregnación alcalina y explosión con vapor para la producción de etanol con separación de hemicelulosas y lignina” financiado por el CIDEB.

La purificación del licor de 200 °C, 10 minutos, con el objetivo de producir jarabe de xilosa fue parte del proyecto ANII-FSE_1_2016_1_131996- “Producción y recuperación in situ de biobutanol combustible a partir de eucalipto”. Del trabajo realizado en este proyecto surgió una publicación en revista referada:

CEBREIROS F.; RISSO F.; CAGNO M.; CABRERA M.N.; ROCHON E.; JAUREGUI G.; BOIX E.; BÖTHIG S.; FERRARI M.D.; LAREO C.; (2020); “Enhanced production of butanol and xylosaccharides from *Eucalyptus grandis* wood using steam explosion in a semi-continuous pre-pilot reactor”; *Fuel*; doi: 10.1016/j.fuel.2020.119818.

*En ambos casos se utilizaron licores provenientes del tratamiento de explosión a vapor sobre aserrín industrial o pequeñas fracciones de *Eucalyptus Grandis*.*

13.1. Objetivos específicos

- Analizar la utilización de resinas de intercambio iónico y/o de adsorción como método de purificación y concentración de los xilosacáridos obtenidos en el tratamiento de Explosión de vapor.
- Determinar las mejores secuencias de resina a emplear para la purificación de xilooligosacáridos (XOS) y xilosa provenientes del tratamiento de explosión a vapor.
- Comparar los resultados obtenidos en el objetivo anterior, al utilizar un licor con mayor concentración de xilosacáridos y de compuestos a remover.

13.2. Procedimiento

13.2.1. Licores utilizados

La utilización de una mezcla de xilooligosacáridos de bajo peso molecular y xilosa se puede comercializar a los productores de xilitol. Se fijó como objetivo de purificación un 85% mínimo de xilosacáridos en el contenido total de sólidos disueltos en el producto final. Este valor se determinó por conversaciones con el Dr. James Biasca, de Stora Enso, quien está trabajando en la planta demostrativa de producción de jarabe de xilosa a partir de bagazo de caña en Raceland, Louisiana, Estados Unidos.

Para determinar las mejores condiciones de purificación de xilosacáridos se utilizó licor obtenido por el prensado de la biomasa obtenida al realizar la explosión a vapor a 180 °C, 10 minutos. El equipo utilizado para los ensayos de explosión a vapor, así como la operativa de trabajo es el mismo que el descrito en el Capítulo 8.

En este caso se utilizó aserrín industrial de una empresa de fabricación de tableros de madera de *Eucalyptus Grandis*. El aserrín utilizado provino del aserrado para la producción de las tablas, previo a su secado (aserrín “verde”). El mismo se secó a 40 °C y se conservó para su uso. La Tabla 13-1 muestra la caracterización química del material de partida y la Figura 13-1 su distribución de tamaño.

Tabla 13-1. Composición química de la biomasa utilizada (n=4). A la izquierda imagen del aserrín industrial utilizado.

	Componente	% ± σ
	Extractivos (etanol/agua)	3,6 ± 0,8
	Cenizas	0,3 ± 0,1
	Lignina soluble en ácido	2,5 ± 0,1
	Lignina insoluble en ácido	28,0 ± 0,1
	Glucanos	43,6 ± 2,1
	Xilanos	11,1 ± 0,5
	Arabinanos	0,05 ± 0,01
	Grupos acetilos	3,0 ± 0,2

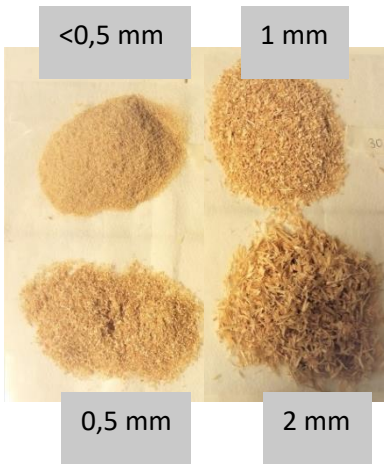
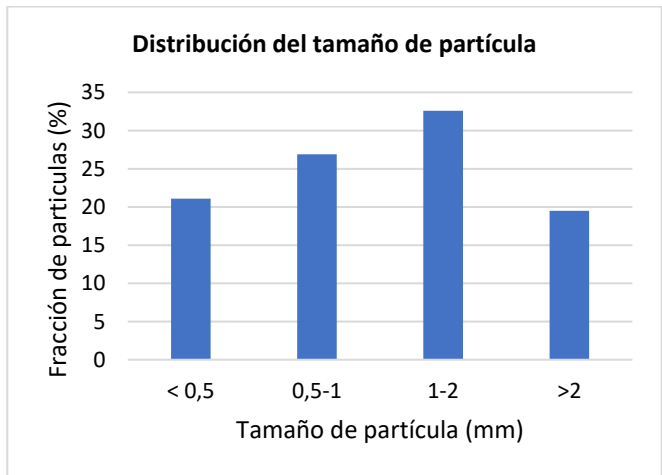


Figura 13-1. Distribución del tamaño de partícula de la biomasa de eucalipto utilizada.

La composición del licor utilizado para la producción de una corriente rica en XOS y xilosa se muestra en la Tabla 13-2.

Tabla 13-2. Composición del licor obtenido por la explosión de vapor a 180 °C y 10 minutos.

Licor 180°C, 10 minutos (g/L)			
pH	3,39 ± 0,02	Sólidos disueltos (g/L)	36,3 ± 0,1
Glucosa (g/L)	0,5 ± 0,1	Glucosacáridos (g/L)	1,2 ± 0,1
Xilosa (g/L)	12,5 ± 0,1	Xilosacáridos (g/L)	24,7 ± 0,5
Ác. acético	9,3 ± 0,2	Ác. fórmico	0,8 ± 0,1
Furfural	0,05 ± 0,01	Absorbancia a 280 nm (dil 1:100)	0,923 ± 0,002
Peso molecular- Mw (Da)	312 ± 4		

El componente mayoritario en el licor fueron los xilosacáridos, encontrándose estos prácticamente el 50 % como xilosa y el 50 % xilooligosacáridos con bajo índice de polimerización, lo que queda demostrado por el peso molecular ponderado del extracto y la distribución relativa de las áreas en el cromatograma de determinación de peso molecular (graficadas en la Figura 13-2, Licor 1).

La baja concentración de furfural y ácido acético del licor se debe a que el mismo se encontraba mayoritariamente en la fracción correspondiente al condensado del equipo de explosión de vapor. La absorbancia a 280 nm indica la presencia de fenoles posiblemente provenientes de los extractivos y de la lignina fácilmente removible de la madera. El bajo contenido de glucosacáridos en el licor, factiblemente provenientes de la fracción de hemicelulosas, indica bajo o nulo ataque de la fracción de celulosa con el tratamiento realizado.

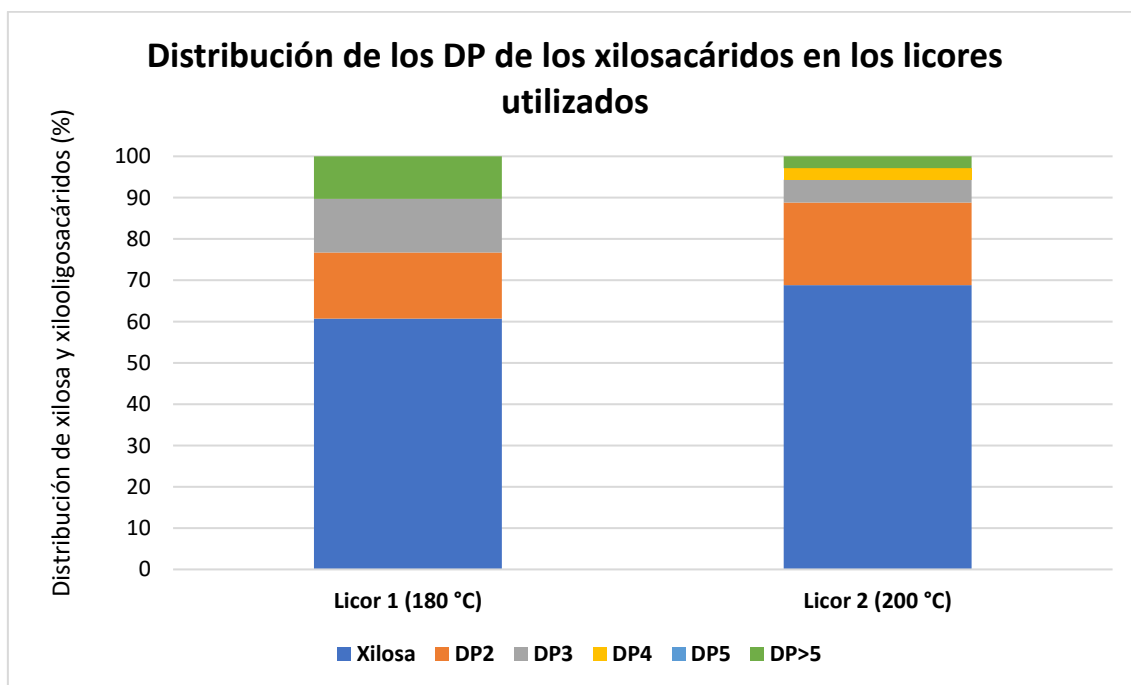


Figura 13-2. Distribución del nivel de polimerización (DP) de los xilosacáridos presentes en los licores obtenidos.

Considerando el contenido de xilosacáridos ($24,7 \pm 0,5$ g/L) y el de sólidos disueltos ($36,3 \pm 0,1$ g/L) presentes en el licor, se establece que el 68 % de los sólidos disueltos en el licor de partida son xilosacáridos (xilosa y XOS).

Por otro lado, para comparar con un licor con mayor concentración, se utilizó el licor obtenido a 200 °C y 10 minutos, del tratamiento de explosión a vapor que se discutió en el Capítulo 8. En la Tabla 13-3 se muestran las características del licor mientras que en la Figura 13-2 se muestra la distribución de los niveles de polimerización de los xilosacáridos presentes en este licor (Licor 2 en el gráfico).

Tabla 13-3. Composición del licor obtenido por la explosión de vapor a 200 °C y 10 minutos.

Licor 200°C, 10 minutos (g/L)			
pH	$2,49 \pm 0,02$	Sólidos disueltos (g/L)	$86,9 \pm 1,2$
Glucosa (g/L)	$1,8 \pm 0,2$	Glucosacáridos (g/L)	$5,4 \pm 0,2$
Xilosa (g/L)	$32,2 \pm 0,4$	Xilosacáridos (g/L)	$47,7 \pm 0,5$
Ác. acético	$14,5 \pm 0,2$	Ác. fórmico	$5,9 \pm 0,2$
Furfural	$1,4 \pm 0,1$	Absorbancia a 280 nm (dil 1:500)	1,022
Peso molecular – Mw (Da)	236 ± 3		

13.2.2. Ensayos con resinas.

Los ensayos se realizaron con la resina en columna y de forma secuencial utilizando para ello dos tipos de resinas diferentes, de acuerdo con el esquema que se presenta en la Figura 13-3. En los ensayos realizados con el licor obtenido a 180 °C, 10 minutos, se trabajó con un exceso de resina, 10 gramos por cada 50 mL de licor, de forma de que, en esta instancia, el agotamiento de la resina no ocasionara una disminución en el rendimiento. En los ensayos realizados con el licor obtenido a 200 °C, 10 minutos se trabajó con 30 mL de licor y 10 g de resina salvo que se exprese otra cosa en el análisis de los datos.

El procedimiento fue el siguiente: Un volumen determinado de licor (N en la figura) se pasó por la columna con la Resina 1. Se agitó la resina con una varilla durante 1 minuto de forma que el licor entre en contacto con la resina y se dejó en reposo durante 10 minutos. Posteriormente se eluyó el licor (N') a una velocidad de 1 mL/min. El licor eluído se colocó en la columna con la Resina 2 y se repitió el procedimiento realizado con la columna 1.

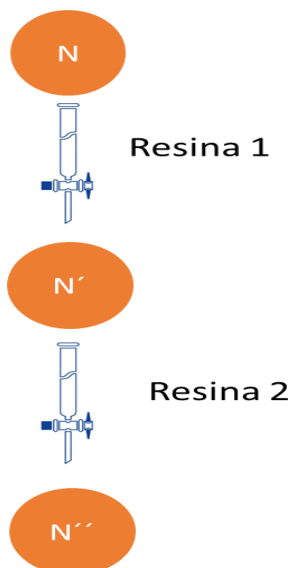


Figura 13-3. Esquema de elución del licor por dos columnas en serie.

Para recuperar las porciones de xilosacáridos que pudieren haber quedado ocluidas en la resina, se enjuagó esta con dos porciones de 20 mL de agua destilada, eluyendo a 1 mL/min. Las aguas de lavado fueron recolectadas y analizadas de igual manera que los licores eluidos. En las primeras etapas de trabajo se enjuago varias veces más, pero dado que se recolectó una cantidad apreciable de xilosacáridos sólo hasta en el segundo lavado, se estableció el procedimiento de lavar dos veces. La Figura 13-4 muestra el esquema de trabajo realizado con cada columna.

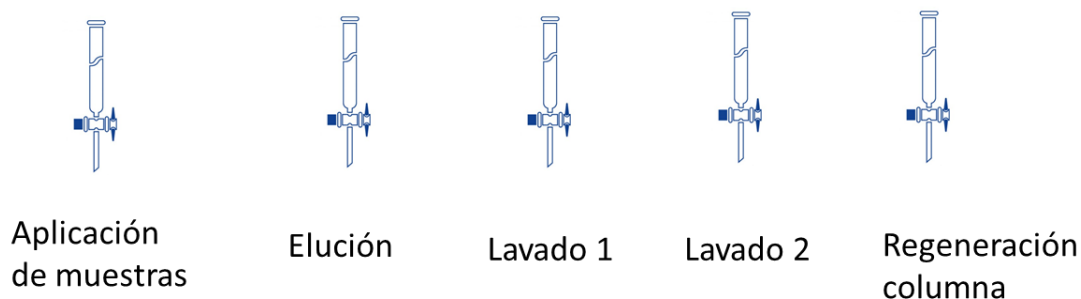


Figura 13-4. Esquema de trabajo para la recuperación de compuestos ocluidos en las columnas.

La Tabla 13-4 muestra las resinas utilizadas y sus características fundamentales.

Tabla 13-4. Resinas utilizadas, descripción y uso recomendado del fabricante. La información fue tomada de las fichas técnicas de las resinas.

Resina	Descripción	Uso recomendado	pH
Amberlite® XAD	Resinas macroreticulares no iónicas que adsorben y liberan especies iónicas a través de interacciones hidrofóbicas y polares; Usualmente utilizadas bajo condiciones isocráticas.	Las resinas no polares XAD se usan generalmente para la adsorción de sustancias orgánicas de sistemas acuosos y disolventes polares.	0 - 14
Amberlite® XAD-4	Matriz de estireno-divinilbenceno (DVB)	Para pesos moleculares relativamente bajos	
Amberlite® XAD-16N		Para pesos moleculares medios, hasta 40.000 Da	
Dowex™ Marathon™-11	Resina de intercambio aniónico base fuerte. Matriz de estireno-divinilbenceno (DVB) Grupo funcional: amina cuaternaria	Desmineralización de aguas con alto contenido orgánico y como depurador orgánico. (Donada por UPM Fray Bentos)	0 - 14
Dowex™ 66	Resina de intercambio aniónico débilmente básica. Grupo funcional: poliamina	Para el pulido en lecho mixto de jarabes de maíz con alto contenido de fructosa.	0 - 7
Purolite A503	Resina aniónica fuerte. Matriz de estireno-divinilbenceno (DVB) Grupo funcional: amina cuaternaria	Desmineralización y decoloración de azúcares en la industria azucarera y de producción de bioetanol de primera generación (Donada por Alur- Planta de Paysandú)	No hay datos

Previo a su uso las resinas se enjuagaron de acuerdo con la recomendación del fabricante y luego de su uso se regeneraron siguiendo los lineamientos del fabricante. Particularmente las resinas del tipo XAD, donde el fabricante ofrece una gama amplia de regenerantes, las mismas fueron regeneradas utilizando acetona 75 % v/v de acuerdo con Schwartz y Lawoko (Schwartz and Lawoko, 2010).

La Tabla 13-5 muestra los ensayos realizados con el licor producido en el tratamiento de explosión a vapor a 180 °C, 10 minutos.

Tabla 13-5. Ensayos realizados con resinas en columna sobre el licor de explosión a vapor para purificar los xilosacáridos utilizando el licor de explosión a vapor obtenido a 180°C y 10 minutos.

Ensayo	Agregado de H ₂ SO ₄ 95% hasta pH =1	Resina 1	Resina 2
1.1	NO	XAD-4	Marathon 11
1.2	SI	XAD-4	Marathon 11
2	NO	Marathon 11	XAD-4
3.1	SI	Marathon 11	
3.2	SI	Dowex 66	
4.1	NO	XAD-4	Dowex 66
4.2	NO	Dowex 66	XAD-4
5.1	NO	XAD-16N	Dowex 66
5.2	NO	Dowex 66	XAD-16N

La Tabla 13-6 muestra los ensayos que se realizaron sobre el licor obtenido a 200 °C y 10 minutos de tiempo de residencia en el reactor de explosión de vapor.

Tabla 13-6. Ensayos realizados con resinas en columna sobre el licor de explosión a vapor para purificar los xilosacáridos utilizando el licor de explosión a vapor obtenido a 200°C y 10 minutos.

Ensayo	pH	Resina 1	Resina 2
6.1	3,2 (Original licor)	XAD-4	Purolite A 503
6.2	1	XAD-4	Purolite A 503
7	3,2 (Original licor)	Purolite A 503	XAD-4
8.1	3,2 (Original licor)	Dowex 66	XAD-4
8.2	3,2 (Original licor)	Dowex 66 (mayor relación resina:licor que en 8.1)	

13.2.3. Análisis realizados.

Las fracciones eluídas (licores y aguas de lavado) fueron caracterizadas en términos de pH, sólidos disueltos, contenido de carbohidratos y ácidos orgánicos (acético y fórmico) y productos de degradación (HMF y furfural) por HPLC, de acuerdo con el procedimiento de NREL/TP-510-42623. Por otra parte, se midió la absorbancia a 280 nm de la muestra, ajustando el pH a 6 (pH del agua destilada), como indicativo de la presencia de lignina o fragmentos de ésta. Sobre el o los ensayos que presentaron las mejores condiciones de separación se analizó la distribución de pesos moleculares del eluído y lavados realizados. Para ello se realizó la técnica de HPLC-SEC con detector RID, utilizando una columna Bio-Rad Aminex HPX-42A, agua como fase móvil y trabajando a 60 °C de temperatura y un flujo de 0,6 mL/min. La curva de calibración se realizó utilizando como estándares: xilosa (Sigma Aldrich) y xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa y xilopentosa (Megazymes, Irlanda).

13.3. Resultados y discusión.

13.3.1. Ensayos 1.1 y 1.2.

En los ensayos 1.1 y 1.2 se colocaron una resina de adsorción (XAD-4) y a continuación una resina aniónica fuerte. El objetivo fue con la resina de adsorción retener los compuestos fenólicos y furfural, mientras que con la resina aniónica se buscaba retener los grupos acetilos, urónicos, fórmico etc. Considerando que el acetato, formiato etc., son base conjugadas de ácidos débiles, pero con una constante de disociación relativamente alta (K_a ácido fórmico = $1,8 \times 10^{-4}$ y K_a ácido acético = $1,8 \times 10^{-5}$), se consideró que podría ser factible que quedaran retenidos en una resina aniónica fuerte. Por disponibilidad, al momento de realizar el ensayo se utilizó una resina aniónica fuerte, ya que es una resina ampliamente disponible comercialmente y con un costo muy inferior que las resinas más específicas que las de pulido de carbohidratos como la Dowex 66, etc.

Se trabajó inicialmente con la resina XAD-4 en dos condiciones diferenciales entre un ensayo y otro. En el caso del ensayo 1.1 se agregó el licor al pH original del licor ($2,49 \pm 0,02$) y para el ensayo 1.2, se ajustó el pH previamente en 1,0 y se eliminó el precipitado formado. Esta

condición de pH fue tomada del trabajo de Schwartz y Lawoko (Schwartz and Lawoko, 2010), donde optimizaron la remoción de furfural y compuestos fenólicos a diferentes pH, a partir de extractos de tratamiento hidrotérmico y de licor verde sobre una mezcla de chips de madera de latifoliadas de climas fríos.

En la Figura 13-5 se muestra la fracción de xilosacáridos, ácidos alifáticos (acético, fórmico y levunílico) y compuestos fenólicos (Absorbancia a 280 nm) que se recuperaron (y por diferencia los que quedaron retenidos) en la columna XAD-4 en las condiciones del ensayo 1.1. Particularmente se quiere señalar que sólo eluyendo el volumen que corresponde a licor, quedaron retenidos el 85 % de los compuestos fenólicos y el 54 % de los ácidos alifáticos, pero solo se recuperaron en el licor eluído el 66 % de los xilosacáridos presentes, lo cual baja en forma importante la producción del producto de interés. Sin embargo, al realizar un “lavado” de la resina con agua destilada, se recuperaron los xilosacáridos que no se encontraban unidos a la resina sino ocluidos en el lecho y luego del segundo lavado, solo un 9% de los mismos se perdieron en el tratamiento. Un tercer lavado no removió más carbohidratos. Con los lavados también eluyen ácidos alifáticos y compuestos fenólicos, estos últimos en mucho menor porcentaje.

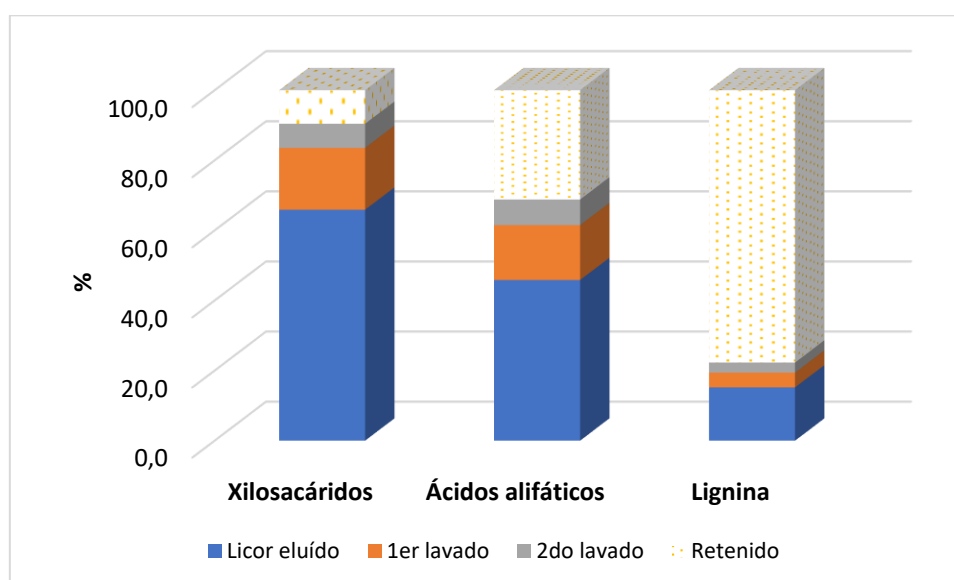


Figura 13-5. Retención de xilosacáridos, ácidos alifáticos (acético, fórmico y levunílico) y compuestos fenólicos en la resina XAD-4 en las condiciones del ensayo 1.1. Se indica como incide recuperar los xilosacáridos en las aguas de lavado frente a recuperar sólo el licor eluído.

Para evitar la dilución del licor conviene no mezclar estas aguas de lavado con el licor, y pensar en una configuración industrial con una recirculación de las aguas de lavado hasta enriquecerlas en xilosacáridos, o eventualmente su uso en otra parte del proceso.

A partir de aquí, los gráficos de retención y/o recuperación de compuestos incluirán no sólo la recuperación del licor sino también las fracciones de compuestos que estaban presentes en las aguas de lavado, ya que el comportamiento mostrado para la resina XAD-4 se repite para las otras resinas utilizadas.

En la Figura 13-6 se muestran los resultados obtenidos trabajando con la resina XAD-4 colocando el licor a pH original y a pH ajustado a 1. Los valores de remoción del ensayo 1.2 incluyen la fracción que se eliminó con el precipitado obtenido al ajustar el pH y que se separó por centrifugación, y la fracción que efectivamente quedó retenida en la columna.

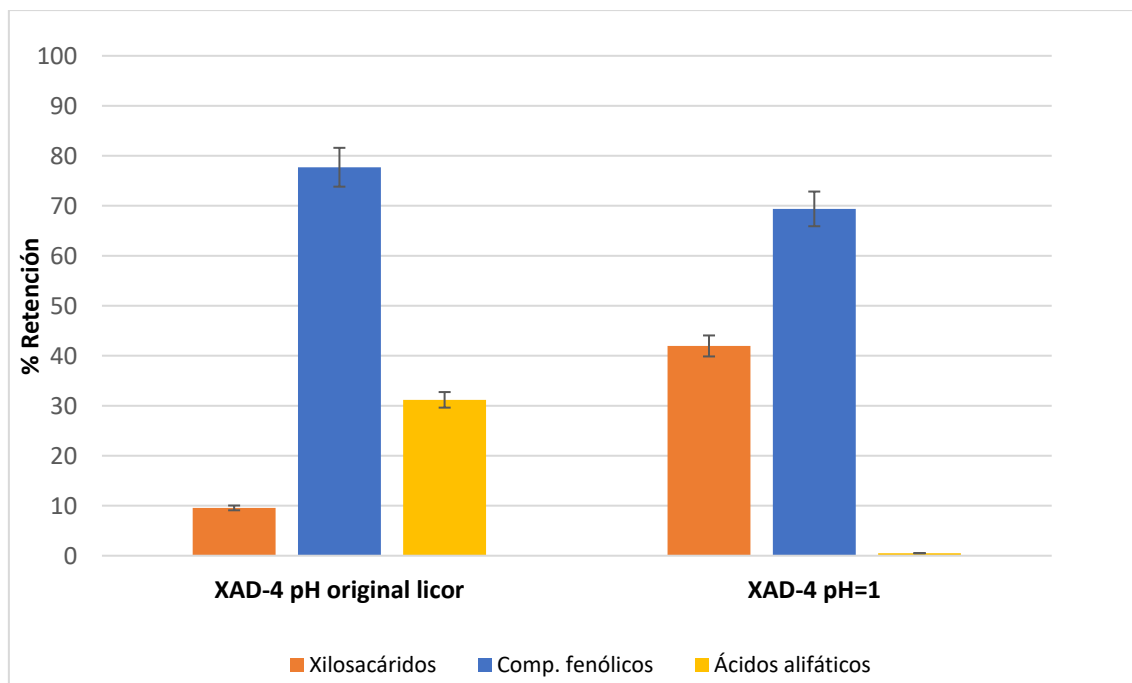


Figura 13-6. Ensayos con la resina XAD-4 en dos condiciones de pH del licor, pH original (3,39) y pH=1,12.

Se confirma la retención de compuestos fenólicos con la resina Amberlite XAD-4. Trabajando al pH original del licor, la retención fue del $77,7 \pm 3,3$ % de los compuestos fenólicos inicialmente presentes en el licor, quedando retenidos también un $31,2 \pm 1,7$ % de los ácidos alifáticos presentes. Si bien no es objetivo con esta resina la remoción de estos ácidos es ventajoso para el proceso que una fracción de estos quede retenida. Como desventaja, se removieron $9,6 \pm 1,4$ % de los xilosacáridos presentes en el licor. La remoción de furfural del licor fue completa, pero cabe señalar que la concentración de furfural en el licor era baja, ya que la mayor parte estaba presente en el condensado del sistema de explosión a vapor. Al bajar el pH ocurrió una remoción de $19,7 \pm 0,6$ % de los compuestos fenólicos por precipitación, mientras que un 50% adicional quedó retenido en la resina. La remoción total de compuestos fenólicos en este caso fue de $69,4 \pm 3,4$ %, menor que la conseguida trabajando al pH original del licor, siendo además mayor la retención de xilosacáridos trabajando a pH = 1. De esta forma se concluye que no es conveniente bajar el pH previo a pasar el licor por la resina XAD-4.

La capacidad de adsorción de la resina XAD-4 para compuestos fenólicos es atribuida a la interacción hidrofóbica entre su matriz de estireno-DVB y los anillos fenólicos (interacción π - π de los anillos aromáticos de la matriz y los fenoles) (Weil *et al.*, 2002; Yu and Christopher, 2017).

Schwartz & Lawoko (Schwartz and Lawoko, 2010), quienes sugieren trabajar con la resina a pH=1 para una remoción más eficiente, reportaron una remoción del 100 % de furfural y de 88 % de lignina soluble en ácidos, mientras que la retención de xilosacáridos en la resina fue de 4%.

Reportaron también una retención del 20 % del ácido acético presente. Estos autores trabajaron con el licor proveniente del tratamiento hidrotérmico a $H=600$ sobre una mezcla de chips de maderas de latifoliadas de climas fríos. Comparando con nuestro trabajo, estos autores lograron una remoción un poco superior de los compuestos fenólicos con una pérdida de carbohidratos un poco menor. Su concentración mayor de lignina y menor de carbohidratos en el licor que la que se utilizó en nuestro trabajo podría justificar las diferencias obtenidas. La importancia en la retención selectiva de compuestos fenólicos y carbohidratos fue discutida en el trabajo de Yu & Christopher (Yu and Christopher, 2017), quienes estudiaron las isothermas de adsorción de lignina soluble en ácidos (ASL) y de la mezcla de xilosacáridos (xilosa y xilooligosacáridos) presentes en la solución obtenida, trabajando con licor proveniente de tratamiento hidrotérmico de álamo. Encontraron que las capacidades de adsorción de XAD-4 para xilosa y XOS se correlacionaron negativamente con la relación licor : resina, lo que indica que la resina XAD-4 tenía una mayor afinidad por los compuestos fenólicos que por los xilosacáridos. A una mayor carga de resina (mayor relación resina / ASL o xilosacáridos en el licor), los sitios de adsorción en XAD-4 son abundantes para la adsorción de ambos compuestos. Con una carga de resina más baja, la competencia por la adsorción de los sitios se vuelve más fuerte, lo que lleva a la reducción de la adsorción de los xilosacáridos. El desplazamiento es común en la adsorción de una mezcla de compuestos que tienen diferente hidrofiliicidad y concentraciones en la solución.

Walton (Walton, 2009) utilizó la resina XAD-4 para purificar el licor obtenido por tratamiento hidrotérmico ($H=600$) de una mezcla de chips de maderas del sur de Estados Unidos. Previo a ser colocado en la resina, el licor fue hidrolizado a $pH=1$ en autoclave, para la conversión de los carbohidratos (mayormente xilosacáridos) en sus monómeros. La autora indica que si bien la adsorción en la resina fue altamente efectiva para eliminar la lignina fenólica y el furfural (no indica los porcentajes de retención), resultó en una pérdida significativa de monosacáridos. Sólo el 53 % de los monosacáridos presentes fue recuperado en el licor eluído. Este valor es similar al que obtenemos en nuestro trabajo, si sólo se considera la recuperación por la elución del licor (66 %) y no se recolectan las aguas de lavado.

Por su parte Lehto & Alén (Lehto and Alén, 2012), trabajando con licores provenientes del tratamiento hidrotérmico ($130 - 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30-120 minutos) de chips de abedul, utilizaron la resina XAD-4 para la remoción de los compuestos no azúcares. Trabajaron al pH obtenido luego de regenerar la resina con NH_4OH y a pH neutro, no justificando el motivo de la elección de estos pH . El tratamiento con resina eliminó aproximadamente un tercio de la lignina inicial disuelta y casi el 90% del furfural, mientras que no hubo remoción significativa de los carbohidratos, ni en su forma de monómeros ni de oligómeros. Indicó también que no encontró diferencias trabajando con el pH original del licor o a pH neutro. El contenido de carbohidratos en los licores utilizados no alcanza a 6 g/L y el de lignina soluble es menor a 5 g/L.

Nitzsche *et al.* (Nitzsche, Gröngroft and Kraume, 2019) modelaron las isothermas de adsorción de compuestos fenólicos, primero en soluciones binarias con fenol y xilosa y luego en un licor extraído por tratamiento “organosolv” (etanol- agua) de residuos de haya. Para el caso de las soluciones binarias conteniendo fenol y xilosa, reportaron una retención de fenol del 90 % y 5 % de la xilosa presente en la resina XAD-4 (para una relación resina: solución de 5 g/mL), igual a la usada en nuestro trabajo). Trabajando con el licor extraído, se retienen alrededor del 80 % de la lignina presente y alrededor de 8 – 9 % de los xilosacáridos presentes, valores muy similares a los obtenidos en nuestro trabajo.

Para continuar con la purificación de los licores obtenidos, el licor eluído de la resina 1 (en este caso XAD-4), fue alimentado a la segunda columna, que contenía la resina aniónica fuerte Dowex Marathon 11. Como se mencionó previamente, el fin principal fue remover los ácidos alifáticos presentes. En la Figura 13-7 se muestra la retención de los compuestos de interés en ambas resinas colocadas en serie.

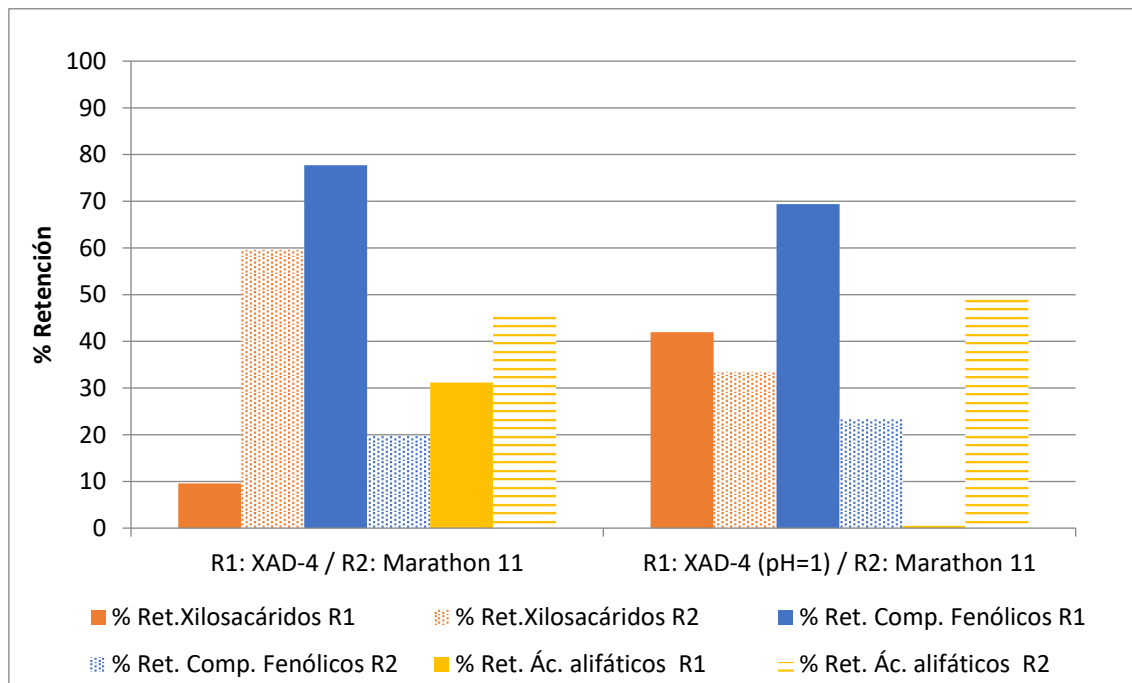


Figura 13-7. % de retención utilizando la resina XAD-4 en dos condiciones de pH del licor, pH original (3,39) y pH=1,12 en serie con la resina Marathon 11.

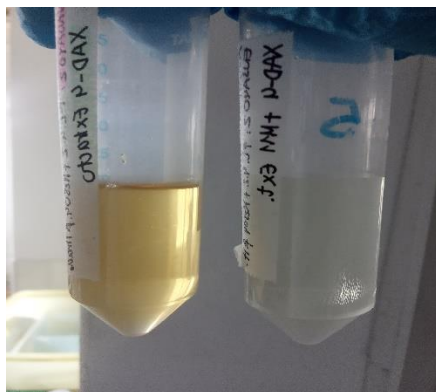


Figura 13-8. Ensayo 1.1. Eluído de la resina XAD-4 (a la izquierda) y de la resina Marathon 11 (derecha).

Como puede observarse, la resina aniónica fuerte retuvo los ácidos alifáticos un $46,1 \pm 1,2$ % cuando se trabajó al pH original del licor y $49,1 \pm 1,2$ % a pH=1. En el caso del ensayo 1.1, donde se había retenido un $31,2 \pm 1,7$ % de los ácidos alifáticos en la resina XAD-4, se logró una remoción de $77,3 \pm 1,7$ % con ambas resinas en serie, la cual, en principio se puede considerar aceptable. Sin embargo, el $59,6 \pm 2,1$ de los xilosacáridos quedó retenido en la columna aniónica, lo cual es inaceptable para el objetivo de su purificación y concentración. Para el caso del ensayo 1.2, la remoción de xilosacáridos en la resina 2 fue de $33,5 \pm 1,8$ %, y la remoción total de

xilosacáridos con las dos resinas en serie fue de $75,5 \pm 2,1$ %. Por ello se descartó este procedimiento de purificación.

13.3.2. Ensayo 2

El ensayo 2 fue similar al ensayo 1.1 pero cambiando el orden de la resina. Se puede observar en la Figura 13-9 la retención de los distintos componentes analizados en ambas columnas en serie. Se indica también el ensayo 1.1 para poder realizar la comparación más directamente.

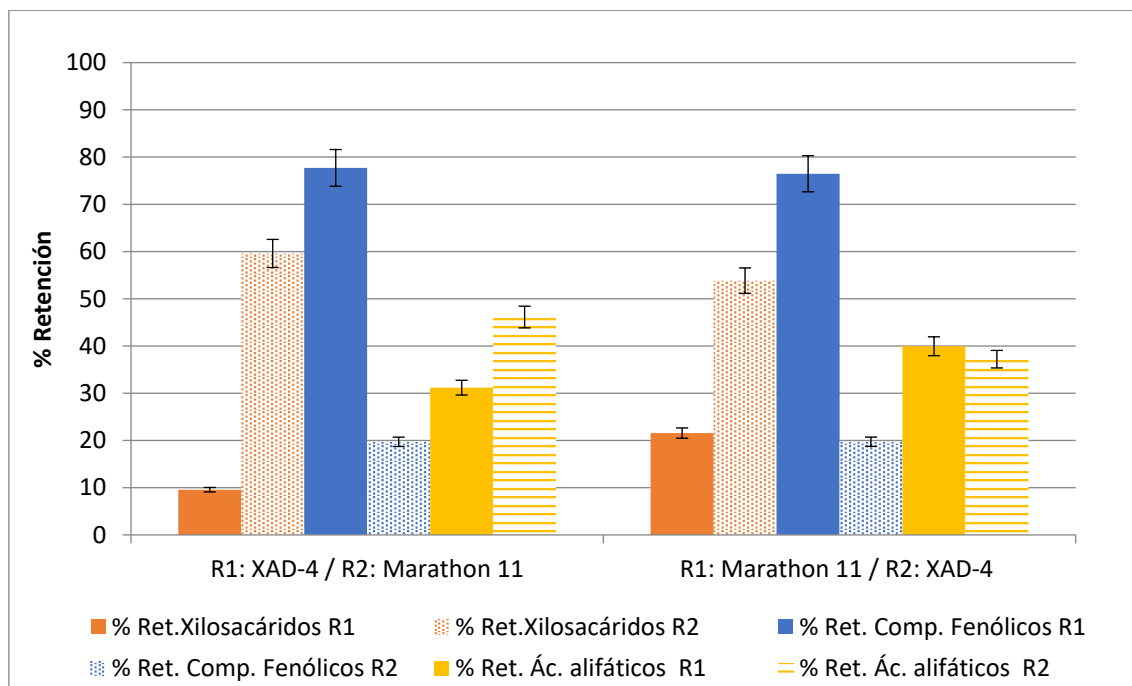


Figura 13-9. % de retención utilizando la resina Marathon 11 en serie con la resina XAD-4. R1 y R2 refieren al orden de la serie en que fue tratado el licor,

La resina aniónica fuerte tuvo un comportamiento inesperado en cuanto a su retención de ácidos orgánicos, ya que retuvo una proporción mayor cuando fue colocada como segunda en la serie que cuando se colocó al comienzo. Una posible explicación es que los ácidos húmicos, factiblemente presentes en el licor y que forman uniones irreversibles con las resinas aniónicas, hayan quedado retenidos en la resina XAD-4 en el ensayo 1.1 y en la resina aniónica en el ensayo 2, sacando capacidad de intercambio a la resina aniónica. Sin embargo, dado que se agregó resina en exceso, no debería verse este tipo de interferencias.

Por otro lado, el porcentaje de retención con ambas resinas en serie fue prácticamente el mismo (77,1 y 77,3 %), sin importar el orden de las resinas. Lo mismo sucedió con los compuestos fenólicos, el porcentaje de retención fue de alrededor 77 % para la resina que se ponga en primera instancia y de 20 % para la resina puesta en segunda instancia, ya sea la resina de adsorción o la aniónica fuerte. En el trabajo de Zeitoun *et al.* (Zeitoun *et al.*, 2010) se menciona que este tipo de resinas aniónicas combinan los mecanismos de retención por intercambio aniónico y adsorción, lo cual justificaría el comportamiento similar respecto a la remoción de compuestos fenólicos y ácidos alifáticos; sin embargo no se ha podido confirmar esta información en los reportes técnicos de la resina. Sobre la retención de xilosacáridos, se pierde

21,6% de los mismos en la resina aniónica y alrededor de 75% entre las dos resinas, lo cual es inaceptable para los objetivos de purificación y producción de azúcares.

Las resinas aniónicas fuertes han sido ensayadas, desde hace varios años, para la detoxificación de hidrolizados lignocelulósicos, previo a la hidrólisis enzimática o fermentación, fundamentalmente luego de tratamientos ácidos (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Huang *et al.*, 2008). Estos tratamientos se han enfocado en la eliminación de inhibidores de hidrólisis o fermentación y en los niveles de recuperación de celulosa o glucosa. Hay menos reportes de la recuperación de xilosa luego del tratamiento. Nilvebrant *et al.* (Nilvebrant *et al.*, 2001) utilizaron una resina aniónica fuerte (Biorad AG 1-X8) en base OH⁻ sobre el extracto producido por tratamiento con vapor sobre chips de abeto, previamente impregnados con ácido sulfúrico. El rendimiento de etanol en el hidrolizado obtenido luego de utilizar esta resina a pH 10 fue mayor que la obtenida al utilizar la resina de adsorción XAD-8 (similar a XAD-4) al mismo pH, lo que indicaría una mayor eficiencia en la remoción de inhibidores de la resina aniónica. Sin embargo, luego del tratamiento con la resina aniónica se recupera solo el 25 % de la glucosa inicialmente presente. No se reportan los valores de xilosa. Ya en 1953, Phillips y Pollard (Phillips and Pollard, 1953), trabajando con jugo de manzana y sidra, indicaron que los carbohidratos eran extensamente degradados por las resinas aniónicas fuertes en su forma OH⁻, produciéndose ácidos orgánicos (identificados cualitativamente por cromatografía en papel).

Por su parte, Yu & Christopher (Yu and Christopher, 2017), trabajando con licor hidrotérmico de álamo, indicaron una alta remoción de lignina soluble en ácido (mayor al 90%) y una pérdida de xilosacáridos menor al 20%, utilizando una resina aniónica fuerte en su forma OH⁻ (resina Amberlite IRA 400).

Hay diversos trabajos reportados sobre la remoción de inhibidores previo a la producción de xilitol por fermentación utilizando hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (Villarreal *et al.*, 2006; Viñals Verde *et al.*, 2006; de Arruda *et al.*, 2011). Sin embargo, en ellos se utiliza una secuencia de resinas de intercambio iónico en serie (aniónicas fuerte y débil y catiónicas) pero no se detallan las características de los eluidos a la salida de cada etapa. Estos trabajos reportan una eficiente remoción de compuestos fenólicos y ácidos con bajas pérdidas de azúcares.

Maciel de Mancilha y Karim, trabajando con hidrolizado de rastrojo de maíz, reportaron una nula remoción de ácido acético y una alta remoción de furfural y HMF, así como una alta recuperación de xilosa utilizando resinas aniónicas fuertes en forma Cl⁻ (Maciel de Mancilha and Karim, 2003).

Kumar *et al.* (Kumar *et al.*, 2018) utilizaron mazorcas de maíz para la producción de xilitol y analizaron la detoxificación del hidrolizado con resina catiónica fuerte (para la eliminación de los cationes de las sales formadas) y aniónica fuerte en serie, previo a su fermentación. Posterior a la resina aniónica reportaron una recuperación de 96.2 ± 4.80 de la xilosa y de 78.0 ± 3.90 de ácido acético. A pesar de que la recuperación de xilosa fue alta, la remoción de ácidos fue baja, por lo que el uso de la resina, en las condiciones utilizadas, no fue adecuado para el objetivo.

De esta forma, se puede concluir que los resultados obtenidos utilizando resinas aniónicas fuertes para la remoción de ácidos alifáticos y compuestos fenólicos son dispares, así como la recuperación reportada de los carbohidratos de interés. Factiblemente, las condiciones de utilización y las propiedades del licor son determinantes para el éxito, y no están completamente señalados en la literatura.

13.3.3. Ensayos 3.1 y 3.2

En los ensayos 3.1 y 3.2 se evaluó si la precipitación de compuestos al bajar el pH = 1 (con ácido sulfúrico) era adecuada para la eliminación de derivados de lignina, evitándose de esta forma la resina XAD-4, por lo que, la solución resultante luego de separar el precipitado formado a pH=1 se pasó únicamente por la resina aniónica. En el caso del ensayo 3.1 se utilizó la resina aniónica fuerte Marathon 11 y en el caso del ensayo 3.2 se utilizó la resina aniónica débil Dowex 66 (Figura 13-11 y 13-11).



Figura 13-10. A la izquierda: Precipitados obtenidos al agregar ácido sulfúrico hasta pH = 1 y el sobrenadante obtenido previo a ser colocado en las resinas aniónicas. A la derecha: eluido de las resinas aniónicas.

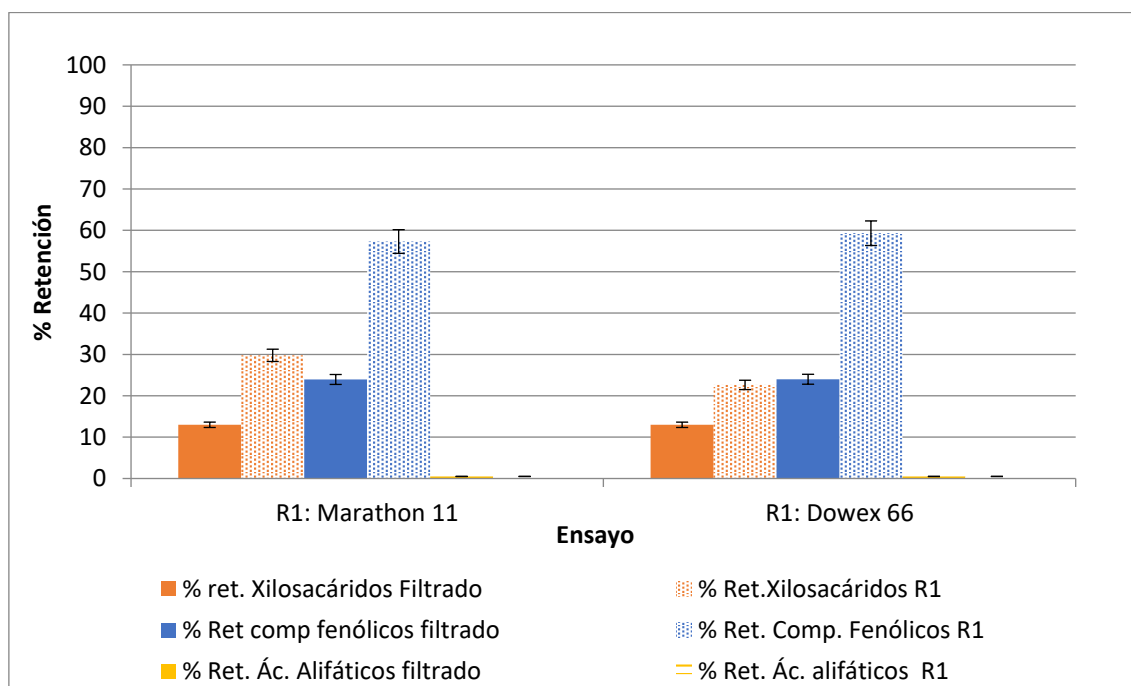


Figura 13-11. % de retención en el precipitado obtenido al llevar el licor a pH=1 y posterior a las resinas aniónicas. En el ensayo 3.1 se utilizó la resina Marathon 11 (aniónica fuerte) y en el 3.2 la resina Dowex 66 (aniónica débil).

Al bajar el pH a 1 con ácido sulfúrico se formó un precipitado negro que contiene principalmente los derivados de lignina (Figura 13-10). Como se observa en la Figura 13-11, se logró una remoción de los compuestos fenólicos del $24 \pm 1,6$ % con el precipitado. No obstante, se perdieron $13,0 \pm 1,2$ de los xilosacáridos presentes. Al pasar los líquidos obtenidos luego de

separar el precipitado por las resinas aniónicas, se logró una remoción de compuestos fenólicos de alrededor del 60 % (respecto al contenido del licor de explosión de vapor), pero no se removieron los ácidos alifáticos. El color de los licores eluidos se condice con la remoción de los compuestos fenólicos (Figura 13-10). Analizando las causas de este comportamiento, se concluye que esto es predecible, ya que la solución tenía un exceso de aniones sulfato provenientes del ácido sulfúrico utilizado para disminuir el pH. El orden de selectividad de las resinas aniónicas fuertes es $\text{OH}^- < \text{CH}_3\text{COO}^- < \text{Cl}^- < \text{HSO}_3^- < \text{HSO}_4^-$ y para las resinas aniónicas débiles es $\text{HCCl}_3^- < \text{CH}_3\text{COO}^- < \text{Cl}^- < \text{HSO}_4^- < \text{citrato} < \text{OH}^-$ (Paul Chen *et al.*, 2006). Por lo cual, el ion sulfato ácido tiene una afinidad mucho mayor por los sitios activos de las resinas aniónicas que el ion acetato.

Takahashi *et al.* (Takahashi *et al.*, 2013), procuraron remover ácido acético de los licores de pulpeo del proceso al sulfito, para luego utilizar la xilosa en la producción de etanol. Reportaron que con el licor sin ningún tratamiento previo, no fue posible la remoción de ácido acético del licor. Esta conclusión es coincidente a la de nuestro trabajo y se justifica por lo expresado en el párrafo anterior.

Se podría considerar precipitar el exceso de iones sulfato con carbonato de calcio, evitando subir el pH a un valor superior de 7, ya que las resinas aniónicas débiles, al tener como grupo funcional una amina terciaria, necesitan estar protonadas para poder actuar como sitio activo (Alexandratos, 2009). Si bien esta opción se tuvo en cuenta, se descartó ya que por un lado existe una precipitación de carbohidratos que coprecipitan con el sulfato de calcio formado (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Huang *et al.*, 2008; Mateo *et al.*, 2013), a lo que deben sumarse los carbohidratos que quedan retenidos en la resina y los que se pierden al bajar el pH a 1. Se concluyó que una alternativa que requiera dos etapas de precipitación por cambio de pH para eliminar los compuestos fenólicos y la introducción de reactivos químicos (que aumentan el contenido de sólidos disueltos en la solución que luego hay que remover), no es atractiva de analizar.

13.3.4. Ensayo 4.1 y 4.2

En el ensayo 4.1. se trabajó con la resina XAD-4 en primera instancia y para la remoción de los ácidos alifáticos se ensayó la resina Dowex 66. Esta última, además de ser una resina aniónica débil, está desarrollada para la purificación de soluciones ricas en azúcares. En el ensayo 4.2 se invirtió el orden de las resinas.



Figura 13-12. De izquierda a derecha: Licor de la explosión de vapor, eluido de la resina XAD-4 y eluido de la resina DOWEX 66

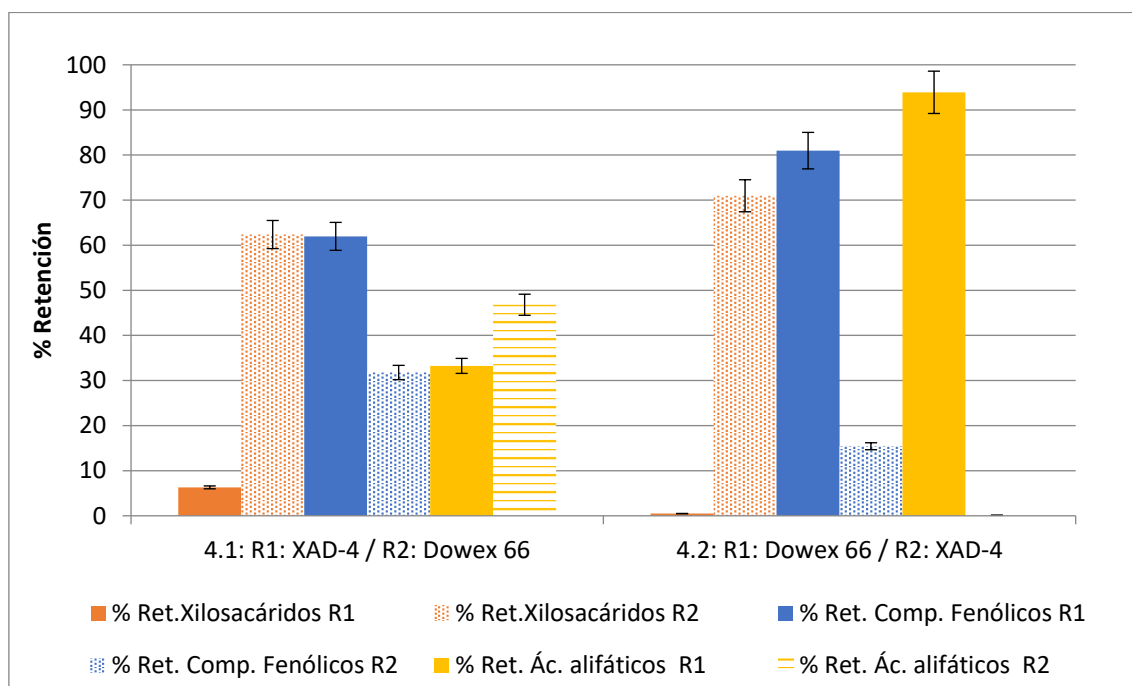


Figura 13-13. % de retención utilizando la resina XAD-4 y Dowex 66. 4.1: XAD-4 + Dowex 66; 4.2: Dowex 66 + XAD-4

La remoción colocando la resina XAD-4 en primera instancia se discutió en el Ensayo 1.1. En este caso se removió un porcentaje un poco menor de los componentes analizados que en el ensayo 1.1, lo que se puede atribuir a variaciones experimentales de los ensayos o a la pérdida de eficiencia de la resina por haber sido regenerada varias veces. En este ensayo, al pasar el eluido de la resina XAD-4 por la resina Dowex 66, se logró una muy buena remoción de los compuestos fenólicos (casi 94 % sumando lo removido por ambas resinas) y de ácidos débiles (80 %). La Figura 13-12 muestra el aspecto de los licores obtenidos antes y después de pasar por las resinas, evidenciando la pérdida de coloración de la solución por la remoción de los compuestos fenólicos. Pese a ello, la fracción retenida de los xilosacáridos en la resina aniónica es cercana al 70 %, lo cual es inaceptable para el objetivo buscado.

En el ensayo 4.2, como se mencionó, se colocó la resina Dowex 66 en primera instancia. Los resultados obtenidos con esta resina son alentadores ya que no hubo retención de xilosacáridos en la misma. Asimismo, se logró una remoción del $81,0 \pm 2,2$ % de los compuestos fenólicos y del $93,7 \pm 2,0$ % de los ácidos alifáticos. La Figura 13-14 muestra las diferencias visuales entre el licor original utilizado y el eluido de la columna con la resina Dowex 66. La misma es una resina aniónica débil por lo que la remoción de ácidos alifáticos era esperable. Esta resina está desarrollada para soluciones ricas en carbohidratos, por lo que también debería ser esperable la no retención de carbohidratos. No obstante, no se esperaba la importante remoción de compuestos fenólicos con la resina.

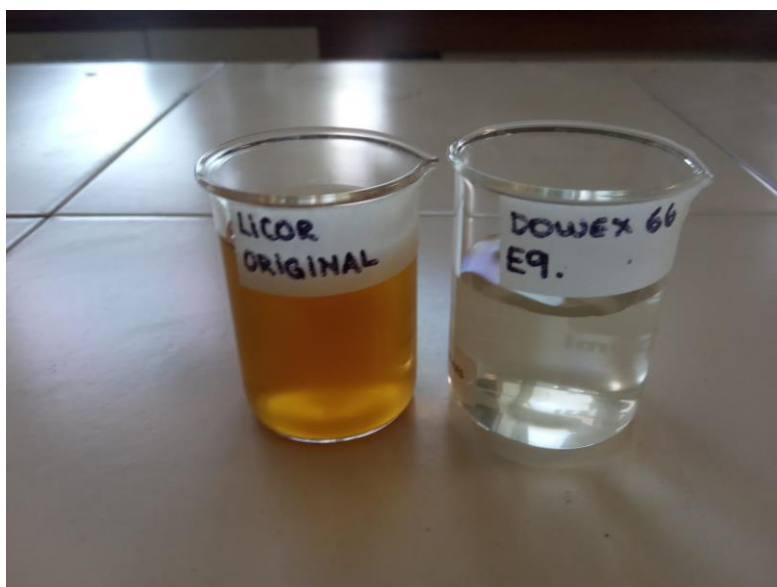


Figura 13-14. Licor obtenido en la explosión de vapor y eluido de la resina Dowex 66.

La purificación de soluciones de xilosacáridos con resinas aniónicas débiles ha sido previamente reportada. Carvalheiro *et al* (Carvalheiro *et al.*, 2005) analizaron varios métodos para la detoxificación del hidrolizado (luego de extracción por tratamiento hidrotérmico) de granos residuales de producción de cerveza. De los diferentes métodos de detoxificación ensayados (resina aniónica, catiónica, carbón activado, encalado), la mayor remoción de ácido acético se consiguió con las resinas aniónicas. Particularmente se removieron 48 % del ácido acético inicial trabajando con una resina aniónica débil (Dowex-MWA1) a pH 0,77, y de 27 % cuando se ajustó el pH del hidrolizado a 5,5 previo a pasarlo por la resina. Se observó una reducción del contenido de xilosa del 7% en ambos casos. Asimismo, mencionan que todos los métodos de desintoxicación aplicados permitieron una reducción del contenido de compuestos fenólicos. Sin embargo, la reducción más importante (83%) se obtuvo después del tratamiento con resinas de intercambio aniónico a pH 5.5 o 0.77.

Por su parte, Vallejos *et al.* (Vallejos *et al.*, 2016) evaluaron diferentes estrategias de detoxificación en serie para la producción de xilitol. Utilizaron licores provenientes del tratamiento hidrotérmico de bagazo de caña de azúcar. Para la remoción de ácido acético utilizaron una resina aniónica débil, Amberlite IRA-67. Este procedimiento fue efectuado luego de etapas de encalado, remoción de calcio con resinas catiónicas y uso de carbón activado. Reportaron una remoción de 80-85 % del ácido acético presente. Como los demás inhibidores fueron eliminados en etapas previas, no se reportó su eliminación en el intercambio aniónico.

Maciel de Mancilha y Karim (Maciel de Mancilha and Karim, 2003), en su trabajo con bagazo de caña de azúcar previamente mencionado, utilizaron una resina aniónica débil desarrollada para la industria azucarera (Purolite A 103S). Con ella lograron la remoción completa del ácido acético y HMF y 95 % de la remoción de furfural en un hidrolizado de rastrojos de maíz. La recuperación de xilosa en ese caso fue del 94 %. No se reportó la remoción de compuestos fenólicos en este caso. En el trabajo de de Carvalho *et al.* (de Carvalho *et al.*, 2004) sobre hidrolizados de bagazo de caña de azúcar también se utiliza la resina Purolite A 103S, con una remoción de 75% de furfural, 55 % de HMF y lignina soluble en ácidos, pero nula remoción de ácido acético.

Luego, al pasar el eluido de la resina Dowex 66 por la resina XAD-4 se logra remover un 15,4 % más de los compuestos fenólicos, logrando entonces una remoción con las dos resinas mayor a

95%. Sin embargo, nuevamente existe una importante retención de xilosacáridos en la resina que se coloca en segunda instancia, lo que es una gran desventaja para el sistema. No se encuentra una explicación razonable para este fenómeno.

13.3.5. Ensayo 5.1 y 5.2

Estos ensayos son similares a los 4.1 y 4.2, utilizándose una resina de adsorción y una resina aniónica débil. En este caso, como resina de adsorción se utiliza la resina XAD-16, la cual es aplicable para adsorber moléculas hidrófobas de solventes polares, como sustancias orgánicas de peso molecular relativamente bajo a medio (Koivula *et al.*, 2013). Se ensayó esta resina ya que se ha reportado que tiene alto rendimiento en la remoción de compuestos fenólicos (Koivula *et al.*, 2013; Heinonen *et al.*, 2017). Se utiliza la resina aniónica débil Dowex 66 en serie con la resina de adsorción.

La Figura 13-15 muestra la retención de los distintos componentes analizados en ambas columnas en serie. Se indica también el ensayo 4.1 para comparar la retención utilizando la resina XAD-4 frente a la XAD-16.

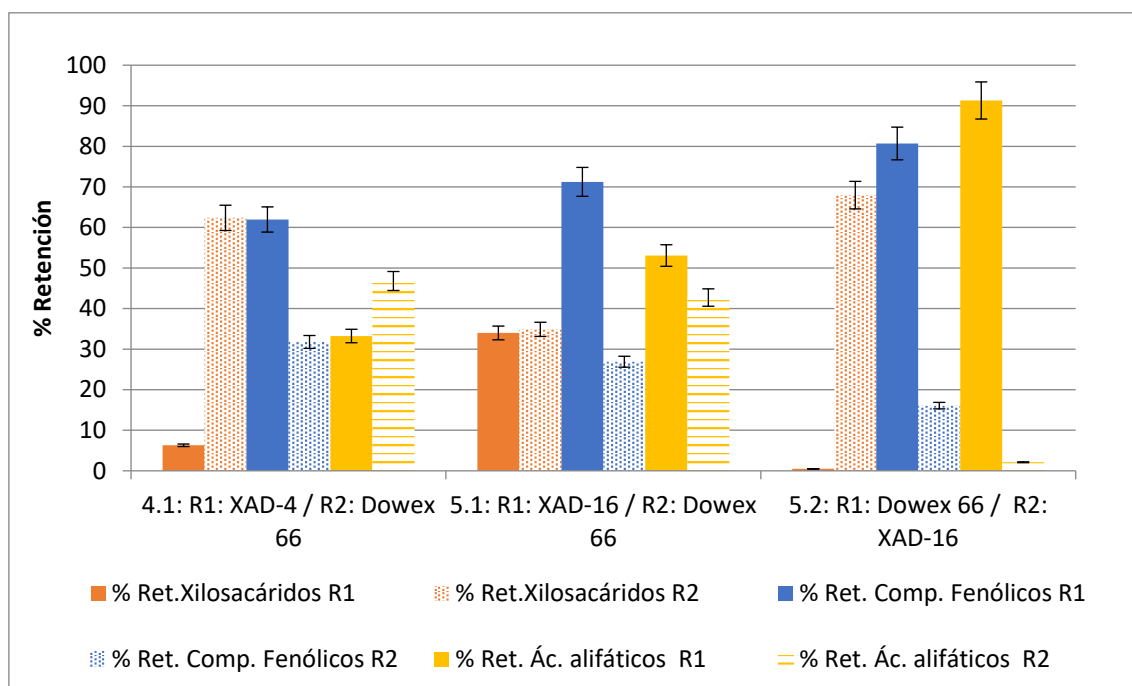


Figura 13-15. % de retención utilizando la resina XAD-16 y Dowex 66. 5.1: XAD-16 + Dowex 66; 5.2: Dowex 66 + XAD-16. Se incluye el ensayo 4.1 para comparar.

Analizando los porcentajes de retención en la resina XAD-16 se observó una remoción del $71,2 \pm 2,1$ % de los compuestos fenólicos y una remoción del $53,1 \pm 1,8$ % de los ácidos alifáticos, lo cual es superior a las remociones logradas con la resina XAD-4 en iguales condiciones de trabajo. Sin embargo, la retención de xilosacáridos en la resina XAD-16 fue del $34,0 \pm 1,6$ %, lo cual es muy superior a la retención que se tuvo en la resina XAD-4.

Koivula *et al.* (Koivula *et al.*, 2013) obtuvieron resultados similares trabajando con licor de pino/eucalipto proveniente de un tratamiento hidrotérmico. Utilizando la resina XAD-16 con una relación de licor/resina de 6,7, reportaron una remoción de alrededor el 65 % de los

compuestos fenólicos (medidos por la absorbancia UV a 280 nm) y una pérdida de las hemicelulosas de alrededor del 50 %. Realizando el mismo tratamiento con licor de abedul, los autores reportaron una retención de casi el 75 % de los compuestos fenólicos y 45 % de las hemicelulosas presentes en el hidrolizado.

Gottumukkala *et al.* (Gottumukkala *et al.*, 2014) compararon la performance de las resinas XAD-4, XAD-7 y XAD-16 en su capacidad de remoción de inhibidores para la producción de butanol a partir del hidrolizado producido por pretratamiento con ácido sulfúrico débil sobre paja de arroz. Para la remoción de ácido acético y ácido fórmico en diversas concentraciones (entre 3,7 y 7,2 g/L de ácido fórmico y entre 1,2 y 3,5 g/L de ácido acético), la performance de la resina XAD-16 fue mejor, logrando retener entre el 50-60 % del ácido fórmico (frente a 20-48 % de la resina XAD-4) y entre el 60-75% del ácido acético, frente a 25-55 % en la resina XAD-4. Los rangos se deben a las distintas concentraciones de ácidos reportadas por los autores. Indicaron una retención similar de azúcares, no especifican cuales, de aproximadamente 11% en ambos casos. En este trabajo no se indicó la remoción de compuestos fenólicos.

Nitzsche *et al.* (Nitzsche, Gröngroft and Kraume, 2019), quienes usaron licor hidrotérmico de madera de haya, reportaron aproximadamente la misma remoción de compuestos fenólicos con la resina XAD-4 y XAD-16, aproximadamente el 80 % del contenido original del licor (3,1 g/L), y una retención de xilosacáridos un poco menor al 10 % en ambas (para un contenido inicial de 4,2 g/L). La resina XAD-4 tuvo una mayor eficiencia en la remoción de furfural, de 85%, frente a 75 % removido con la otra resina. En este caso trabajaron a pH =6 y con una relación de resina/licor = 1/5, igual a la que usamos en nuestro trabajo.

You *et al.* (You *et al.*, 2019) utilizaron la resina XAD-16 para purificar un extracto alcalino de bagazo de caña. Ensayaron diferentes relaciones de resina en función del contenido de lignina en el extracto, aunque no se reportó su contenido inicial. A medida que aumentó la relación resina / lignina de 1:1 a 10:1, el rendimiento en la remoción de la lignina aumentó desde un 48% a casi un 90%. No obstante, la recuperación de xilosa bajó de 1,6 g/L para una relación 1:1 a 1,1 g/L para una relación 1:10 (no se indicó el valor de xilosa en el licor original).

Cao *et al.* (Cao *et al.*, 2020) analizaron las isotermas de adsorción de la decoloración de una solución rica en XOS y con compuestos fenólicos a los que denominó pigmentos. Trabajaron con el licor proveniente de una hidrólisis ácida (con ácido acético) de mazorcas de maíz y utilizaron la resina XAD-16. Los autores no informaron la composición del licor obtenido. Lograron una decoloración del 89 % (determinada por la reducción de la absorbancia a 280 nm), con una recuperación del 96 % de los XOS, trabajando a pH 3,0 y con una relación resina-licor de 0,76. Concluyen que la adsorción de los compuestos fenólicos en la resina XAD-16 es un proceso endotérmico y espontáneo. En los primeros minutos de la adsorción ocurre la transferencia de masa externa y posteriormente se dan los mecanismos de transferencia de masa intraparticular (interna)(Cao *et al.*, 2020).

Como se puede ver de los trabajos precedentes, la remoción de un elevado porcentaje de compuestos fenólicos y ácidos alifáticos es posible y tanto el rendimiento de remoción como la retención indeseada de xilosacáridos, es dependiente de su concentración en el licor y de la relación resina : licor que se use.

Considerando ahora las dos resinas en serie usadas en esta etapa del trabajo, se puede ver en la Figura 13-15, que la remoción de los compuestos fenólicos y ácidos alifáticos fue superior al 95 %. Sin embargo, la retención de xilosacáridos en la resina Dowex 66 fue de 35% cuando se colocó luego de la XAD, lo cual hace que la pérdida de xilosacáridos con las dos resinas en serie

sea de casi el 70 %, inaceptable para el objetivo de recuperación de estos carbohidratos. Al igual que cuando se utilizó la resina Dowex 66 luego de la resina XAD-4, la retención de carbohidratos en la resina aumentó muchísimo en comparación con el uso de la resina Dowex 66 en primer lugar, no encontrándose una explicación para este comportamiento.

En el ensayo 5.2, donde se colocó la resina Dowex 66 en primera instancia, se obtuvo una alta remoción de ácidos alifáticos y compuestos fenólicos y baja retención de xilosacáridos, como se discutió en el caso del ensayo 4.2. Al colocar la resina XAD-16 en segunda instancia, la remoción de compuestos fenólicos fue, al igual que en el ensayo 5.1, mayor al 95 %, aunque la retención de xilosacáridos en esta resina fue aún mayor que cuando se coloca en primera instancia, llegando a casi el 70 %.

Dados los buenos resultados obtenidos al utilizar únicamente la resina Dowex 66, se analizó la distribución de pesos moleculares del eluido y los lavados en esta resina. En la Tabla 13-7 se observa la distribución de pesos moleculares indicando en primera instancia el peso molecular promedio (Mn) y promedio ponderado (Mw) y el peso molecular de cada pico del cromatograma, así como el porcentaje de área ponderada de estos en el cromatograma. Gráficamente se pueden ver estos valores en la Figura 13-16.

Tabla 13-7. Distribución de pesos moleculares del licor original y del eluido de la columna.

	#	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn	%
Licor original	total	147	310	3,01	
	1	1623	1653		8,9
	2	525	540		4,5
	3	351	355		6,9
	4	232	236		13,9
	5	130	134		52,8
	6	72	76		13,0
Eluido	total	147	178	1,28	
	1	484	490		3,9
	2	331	335		9,5
	3	219	222		18,9
	4	129	132		59,9
	5	82	83		7,8

Como puede observarse en la Figura 13-16, el eluido no presenta el pico de peso molecular mayor (1623 Da) que sí se observa en el licor original, lo que indica que los xilosacáridos de mayor peso molecular quedarían retenidos en la resina. Si se observan comparativamente las señales del detector UV a 280 nm que se encontraba en serie con el detector RID durante la determinación de peso molecular, se pueden ver las señales correspondientes a fragmentos de lignina u otros compuestos fenólicos (Figura 13-17). Particularmente, en la zona posterior al tiempo muerto (alrededor de 7 minutos), se pueden observar varios picos en el cromatograma del licor original, los que disminuyen su área relativa al pico de los azúcares (alrededor de 18 minutos, este detector no permite separar los azúcares en sus respectivos oligómeros) en el cromatograma del eluido de la resina. Esto confirma entonces, que los compuestos fenólicos, de mayor peso molecular, quedaron retenidos en la resina, lo cual ya se había constatado en la medición directa de la absorbancia de la solución a 280 nm. De esta forma, los oligómeros de mayor peso molecular quedan retenidos en la resina, posiblemente porque los mismos se encuentran aún enlazados a compuestos fenólicos provenientes de la lignina.

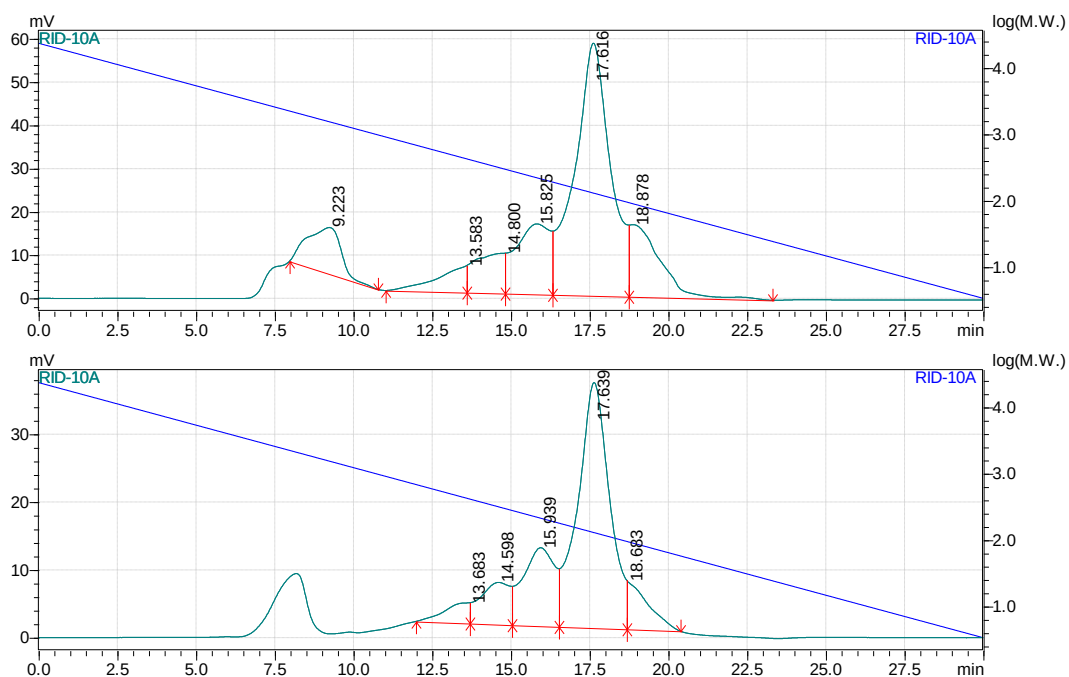


Figura 13-16. Cromatograma de la distribución de pesos moleculares obtenidos en el licor original (arriba) y el eluido de la resina Dowex 66 (abajo) utilizando detector de índice de refracción (RID).

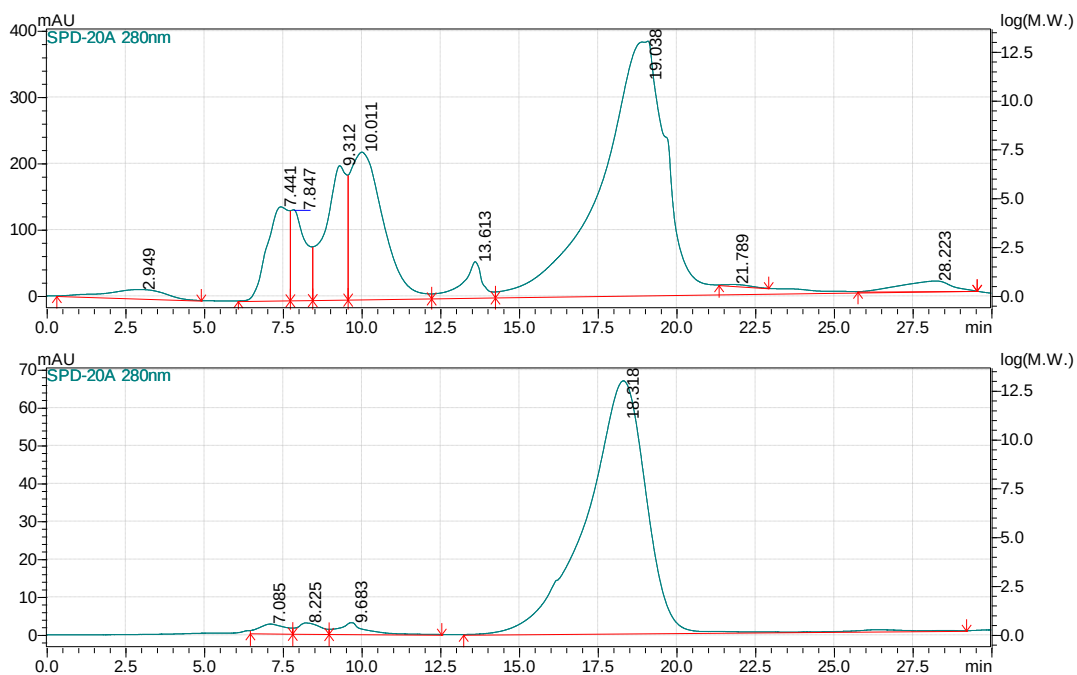


Figura 13-17. Cromatograma de la distribución de pesos moleculares obtenidos en el licor original (arriba) y el eluido de la resina Dowex 66 (abajo) utilizando detector UV.

Como se señaló al principio del apartado, uno de los objetivos de este trabajo era aumentar la pureza de los xilosacáridos en la solución. En el licor original un 68 % de los sólidos disueltos correspondieron a xilosacáridos. Al eliminar los compuestos fenólicos, furfural y ácidos alifáticos de la solución, se supone en primera instancia que la pureza de los xilosacáridos debe aumentar.

Sin embargo, al realizar la determinación de sólidos disueltos en el eluido de la resina Dowex 66, el contenido de xilosacáridos es de un 65 % de los sólidos disueltos de la solución. No fue determinado, pero factiblemente el resto de los sólidos disueltos corresponda en buena medida a los iones intercambiados por la resina, aunque la misma es regenerada con una solución de NaOH al 4 %. Para procurar purificar esta corriente obtenida, se ensayó el eluido de la resina Dowex 66 con membranas de ultrafiltración. Los resultados obtenidos en este ensayo se indican en el apartado 2.4.4.

13.3.6. Ensayos 6.1 y 6.2.

Los ensayos que se describen de acá en más, a diferencia de los anteriores, fueron realizados con el licor de explosión a vapor obtenido a 200 °C y 10 minutos de tiempo de residencia. Como puede verse en las Tablas 13-2 y 13-3, este licor es mucho más concentrado en carbohidratos, ácidos alifáticos, furfural y compuestos fenólicos que el licor utilizado en los ensayos anteriores. Las razones de esta gran diferencia en concentración se pueden explicar en parte por el volumen diferente obtenido en un ensayo y otro. Para el caso de la explosión a 180 °C se obtuvieron 0,56 L de licor por kg de material pretratado (sólido + licor) a la salida del reactor, mientras que, con el material utilizado a 200 °C, se obtuvieron 0,41 L por kg de material pretratado. Por otro lado, la granulometría y el origen del material son distintos por lo que puede tener diferente comportamiento en el reactor. Además, estos tratamientos se realizaron con diferencia de 2 años, donde se hicieron cambios en la configuración de la zona de formación del “tapón de biomasa” en el reactor, lo cual también puede tener incidencia.

Los ensayos que siguen se realizaron a los efectos de evaluar el comportamiento de las resinas con una solución más concentrada en carbohidratos y compuestos a eliminar.

Como se mencionó en la Tabla 13-6, en los ensayos 6.1 y 6.2 se utilizaron las resinas XAD-4, ya discutidas. Como segunda resina en serie se usó la resina Purolite A 503, una resina aniónica fuerte desarrollada para la decoloración y remoción de cenizas en la industria azucarera y de bioetanol. Esta resina fue donada por Alur Paysandú y es la resina que usan habitualmente para la purificación de los azúcares en la producción de bioetanol de primera generación. En el ensayo 6.1 se usó la resina XAD-4 a pH original del licor y en el ensayo 6.2 se bajó el pH a 1. Los porcentajes de retención obtenidos se muestran en la Figura 13-18. Se incluye la remoción de furfural, ya que en esta solución se encuentra en mayor concentración y es relevante analizar su comportamiento.

En los dos casos analizados la remoción de compuestos fenólicos y furfural en la resina XAD-4 fue importante, siendo mayor al trabajar a pH=1. El porcentaje de remoción de la resina 1 en el ensayo 6.2 está referido a la concentración del compuesto de interés sobre su concentración en el licor extraído, es decir, incluye la fracción que precipitó al bajar el pH. Trabajando a pH 1 se logró una remoción mayor de los compuestos fenólicos (casi 90%) y furfural (alrededor de 80 %).

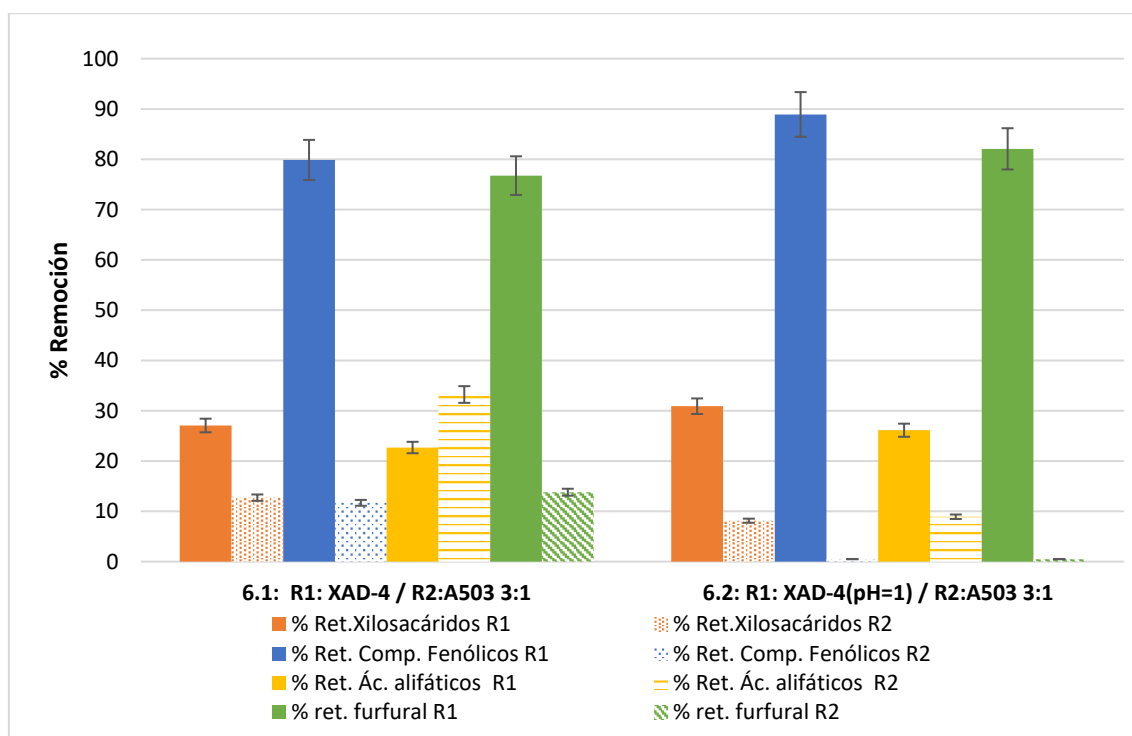


Figura 13-18. % de retención utilizando la resina XAD-4 y Purolite A503. 6.1: XAD-4 a pH original del licor; 6.2: XAD-4 a pH 1 y eliminación del precipitado formado.

La retención de xilosacáridos en la resina fue importante en los dos ensayos, del orden del 30 %, siendo un poco inferior en el ensayo a pH original del licor.

Para el caso del ensayo 6.1, la remoción de compuestos fenólicos es del orden a la obtenida en el ensayo 1.1, aunque la remoción de ácidos es un poco menor. No obstante, se observó una retención de xilosacáridos bastante mayor que en el ensayo 1.1. Este comportamiento no es previsto, ya que si se considera que la resina tiene mayor afinidad por los compuestos fenólicos (Weil *et al.*, 2002; Yu and Christopher, 2017), la retención de carbohidratos en la resina, al existir más compuestos fenólicos presentes, debería ser menor (en ambos ensayos la relación volumen de licor/masa de resina es la misma). Comparando el contenido de compuestos fenólicos y xilosacáridos entre el licor original a 180 °C, 10 minutos (ensayo 1.1) y el licor a 200 °C, 10 minutos, la relación compuestos fenólicos/xilosacáridos para el primero es de 0,17 y de 0,45 en el segundo, por lo cual no se puede decir que en el caso del ensayo 6.2 sea desfavorable la concentración de los compuestos fenólicos frente a los xilosacáridos. Dado que el licor analizado tiene una concentración mayor de los distintos componentes, y se usó la misma cantidad de resina, ya que esta se cuantificó por volumen de licor a agregar y no por la concentración de los compuestos, se sospecha que lo que sucedió en este caso es que no fue suficiente el tiempo de contacto del licor con la resina. De esta forma, no se llegaron a dar completamente el desplazamiento de sitios activos que pudieren estar ocupando los xilosacáridos (que están en mayor concentración, pero tienen menor afinidad por la resina) por los compuestos fenólicos y por ello la menor recuperación de xilosacáridos en el ensayo.

Al pasar el eluido por la segunda columna, se logró la remoción casi completa de los compuestos fenólicos y furfural. La retención de xilosacáridos entre las dos columnas fue de 40 %, lo cual no es aceptable. Trabajando al pH original del licor, la remoción de los ácidos alifáticos en la segunda columna (Purolite A 503) fue un poco menor que cuando se utilizó la resina Marathon

11, en el ensayo 1.1. Sin embargo, como se está evaluando la performance de dos resinas similares, pero no iguales, con dos licores diferentes, no se considera válido compararlas. Cuando se bajó el pH a 1, la remoción en la resina aniónica fue menor que trabajando al pH original. Esto se explica por lo ya discutido en el ensayo 3.1.

13.3.7. Ensayo 7

Este ensayo es similar al ensayo 6.1 pero cambiando el orden de las resinas.

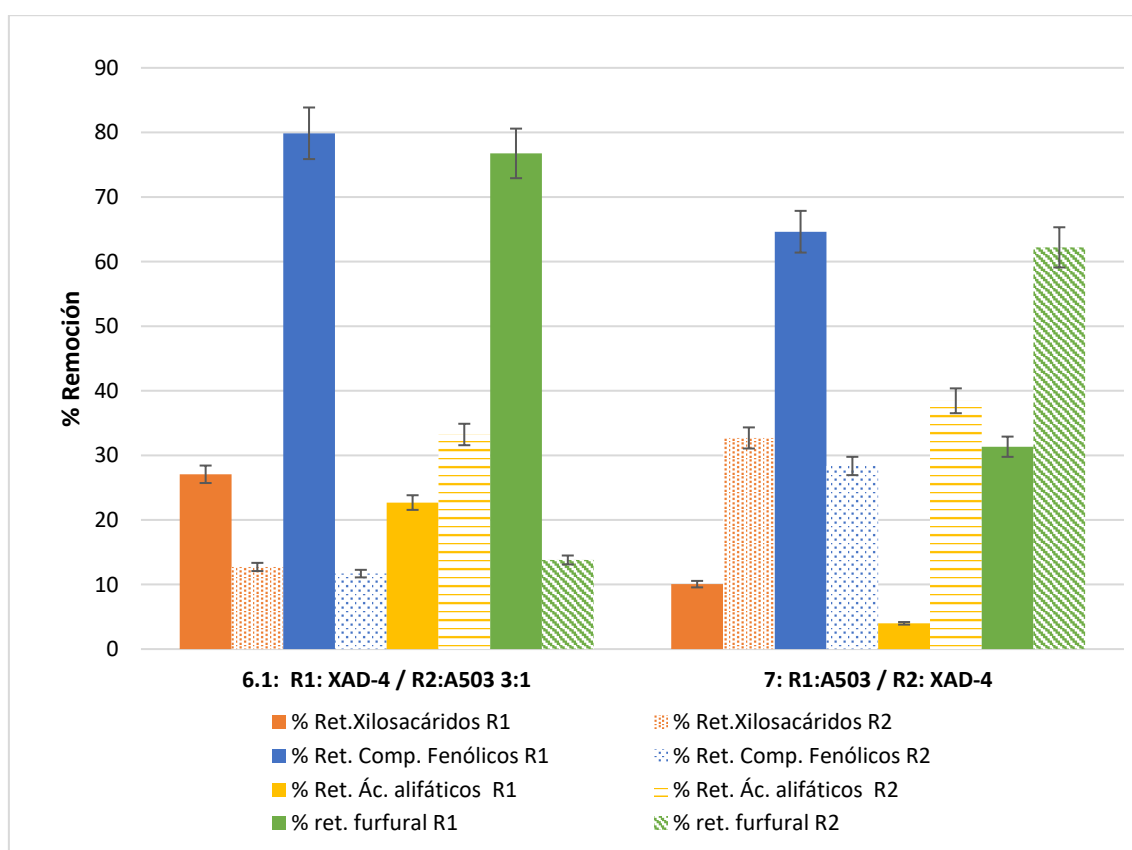


Figura 13-19. % de retención utilizando la resina XAD-4 y Purolite A503. 6.1: XAD-4 y luego resina Purolite A503; 7: Purolite A503 y luego XAD-4.

Colocar la resina aniónica fuerte en primer lugar no aportó mejoras en la remoción de los compuestos no deseados, removiéndose con las dos resinas aproximadamente el mismo porcentaje, no importa el orden que se coloquen. Lo mismo sucedió con la retención de carbohidratos, fue del orden del 40 % de los xilosacáridos presentes en el licor original. Como se mencionó previamente, la pérdida del componente que se busca purificar es elevada, por lo que no se considera aceptable esta combinación de resinas.

13.3.8. Ensayo 8

Vistos los buenos resultados obtenidos con la resina Dowex 66 con el licor de explosión a 180°C, se resolvió ensayar el licor a 200 °C con la misma resina, más concentrado tanto en xilosacáridos como en los compuestos a remover. Dada la mayor concentración de compuestos a remover, se resolvió trabajar a dos relaciones diferentes de licor: resina. De esta forma se utilizó la misma relación de 3 que se venía utilizando en los ensayos previos y se trabajó también a una relación licor: resina = 1 : 1. En la Figura 13-20 se puede observar los resultados obtenidos y en la Figura 13-21 las coloraciones de los eluídos obtenidos frente a la del licor original.

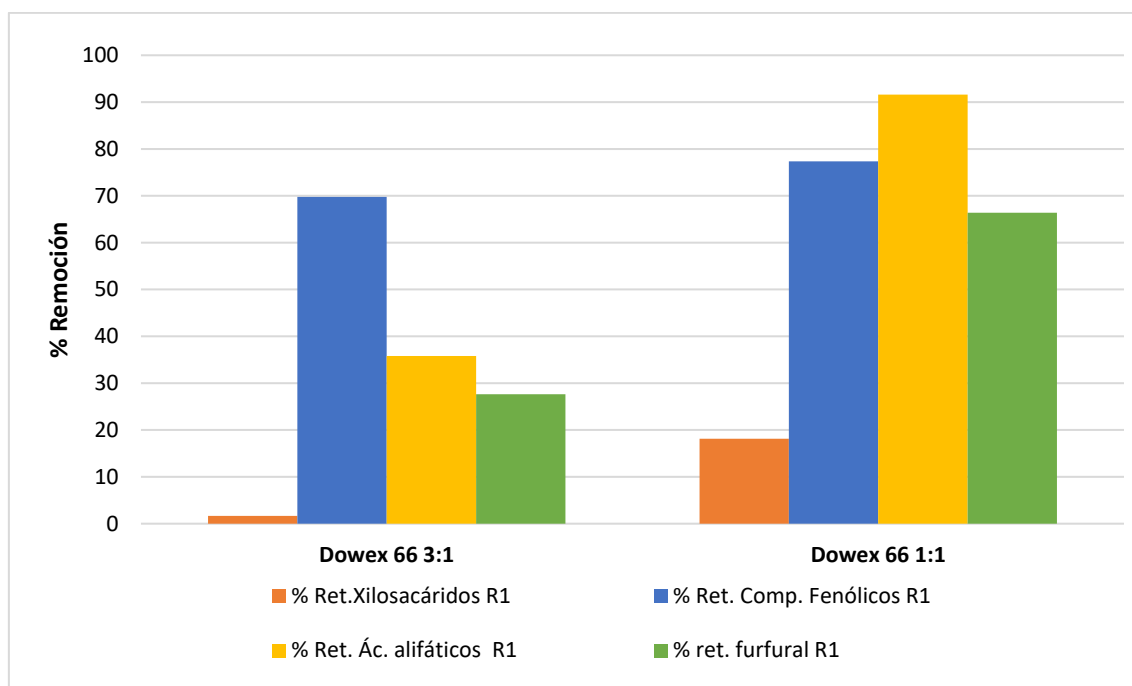


Figura 13-20. % de retención utilizando la resina Dowex D66 con distintas relaciones licor : resina.



Figura 13-21. A la izquierda, coloración del licor original y del eluido trabajando en relación licor: resina de 3 :1, A la derecha coloración de eluido trabajando a relación licor: resina de 1: 1.

Trabajando con una relación de licor: resina de 3:1 se logra una muy alta recuperación de xilosacáridos (> 98 %) y una remoción del 70 % de los compuestos fenólicos. Sin embargo, la remoción de ácidos alifáticos (compuestos específicos a remover por este tipo de resinas) y de furfural, es sensiblemente más baja. Al aumentar la cantidad de resina (trabajando con relación licor : resina = 1 : 1) la remoción de ácidos alifáticos se incrementa sensiblemente (de 35 % a más de 90 %), así como la remoción de furfural, que alcanza el 65 %. La remoción de compuestos fenólicos, sube de 70 a casi 80 %. Sin embargo, la retención de xilosacáridos, que era mínima en el ensayo donde la relación de licor :resina fue igual a 3:1, aumentó a casi el 20 % al aumentar la cantidad de resina. De todas formas, se considera una pérdida aceptable, frente a la buena remoción de los compuestos indeseables, que se logra en estas condiciones.

13.4. Conclusiones

Se ensayaron diferentes resinas de intercambio aniónico y de adsorción para la purificación de los xilosacáridos presentes en dos licores obtenidos por tratamiento por explosión de vapor.

Se confirma una buena retención de compuestos fenólicos y furfural con las resinas de adsorción (XAD) con una baja retención de xilosacáridos (menor a 10 %). Sin embargo, la retención de ácidos alifáticos con estas resinas es baja.

Trabajar a pH del licor ajustado a 1 no mejoró los rendimientos, incorporando incluso contraiones a la solución que aumentan la cantidad de sólidos disueltos a separar.

Las resinas aniónicas fuertes, como era de esperar, no arrojaron buenos resultados de retención selectiva de los ácidos alifáticos.

La resina aniónica débil utilizada (Dowex 66) logró una muy buena retención de los ácidos alifáticos así como compuestos fenólicos y furfural. Trabajando con una relación de licor: resina de 3 a 1 se logró una pérdida mínima de xilosacáridos en el ensayo.

Al trabajar con un licor más concentrado, las conclusiones obtenidas son similares. Particularmente con la resina aniónica Dowex 66 disminuye la muy buena remoción de ácidos alifáticos y furfural obtenida previamente. Al cambiar la relación licor: resina de 3:1 a 1:1, se logra mejorar la remoción de estos compuestos, aunque aumenta la pérdida de xilosacáridos, pero siendo menor a 20 %.

Por lo antes dicho, se considera que trabajar con resinas aniónicas débiles (en este caso particular Dowex 66) permite una separación exitosa de los compuestos fenólicos, furfural y ácidos alifáticos, con pérdidas aceptables de los xilosacáridos.

14. ENSAYOS DE PURIFICACION Y CONCENTRACIÓN: ENSAYOS CON MEMBRANAS DE FILTRACIÓN

14.1. Objetivos específicos

- Analizar la tecnología de filtración con membranas de ultra y microfiltración como método de purificación y concentración de los xilooligosacáridos y xilosa obtenidos por tratamiento de explosión de vapor.
- Analizar la tecnología de filtración con membranas de ultra y microfiltración como método de purificación y concentración de los xilopolisacáridos obtenidos por tratamiento con hidróxido de sodio.

14.2. Metodología

14.2.1. Descripción del equipamiento utilizado.

Los diferentes ensayos fueron realizados en el sistema de separación de membranas que se muestra en la Figura 14-1. El mismo consiste en un sistema de tipo “filtración de flujo directo” (dead-end) de la marca Sterlitech, modelo HP4750. Está compuesto por una celda de acero inoxidable agitada de 47 mm de diámetro, donde se coloca el disco de membrana en la parte inferior. Se coloca también un agitador magnético propio del sistema y se ubica el conjunto sobre una placa de agitación magnética. Se introduce la solución con los componentes a separar en el interior de la celda, que tiene una capacidad máxima de 300 mL y se cierra el sistema mediante bridas y bulones. Se ejerce la presión adecuada aplicando nitrógeno gas, como se muestra en el esquema. Si bien la celda soporta hasta 69 bar de presión, por cuestiones relativas a la seguridad de los demás componentes del sistema, no se utilizaron presiones mayores a 8 bar. El líquido que permea la membrana (el “permeado”) egresa del sistema por un tubo fino sobre un costado del equipo y es colectado en un recipiente graduado (probeta) a los efectos de tener lecturas de volumen. Una vez finalizado el tiempo (o la relación de volúmenes) deseado para el ensayo, se colectan las fases líquidas de “permeado” y “retenido” (el líquido que no atravesó la membrana y queda en la celda). Mediante un cronómetro se monitorea el tiempo de descarga de permeado a lo largo de las experiencias, para establecer los flujos de permeados y demás parámetros característicos.

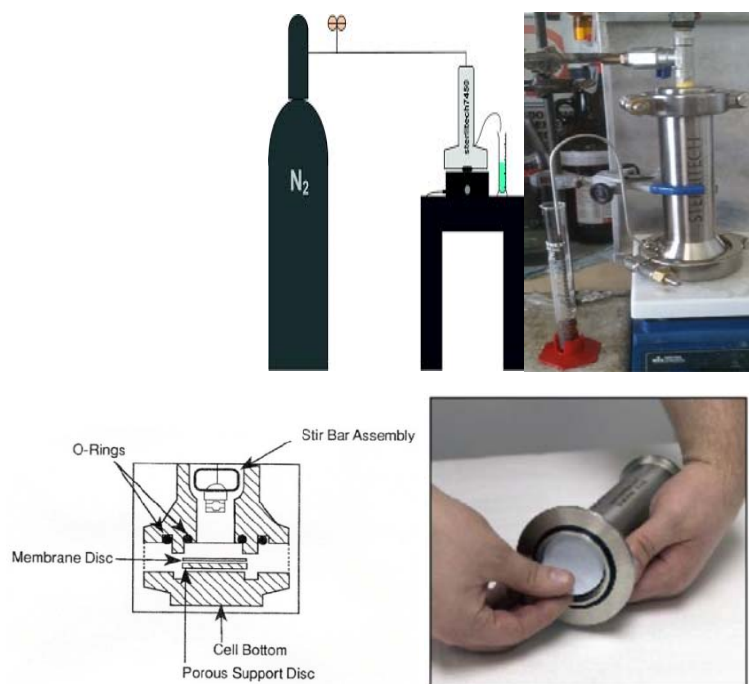


Figura 14-1. Esquema e imágenes del sistema de membranas de filtración utilizado.

14.2.2. Acondicionamiento de membranas previo a su uso y almacenamiento

En los diferentes ensayos se han utilizado membranas planas de distintos materiales (PES: polietersulfona, PESH: polietersulfona con tratamiento superficial para mayor hidrofiliidad, PVDF: fluoruro de polivinilideno) de diferentes cortes nominales de acuerdo a los diferentes ensayos a realizar (desde 1 a 800 kDa). En cada ensayo se indicará el material, marca y corte nominal de la membrana utilizada.

Las membranas fueron acondicionadas dejándolas en agua destilada previo a su uso, por al menos 72 horas, de forma de rehidatarlas. Posteriormente se filtró agua destilada durante al menos 20 minutos, de acuerdo a lo aconsejado por el fabricante. Luego de a su uso fueron lavadas con agua destilada en contracorriente o con una solución de ácido acético 0,1 % (v/v) y almacenadas en esta solución, a los efectos de evitar el crecimiento microbológico sobre la superficie de las membranas, no permitiendo que vuelvan a secarse para evitar la obstrucción de los poros.

14.2.3. Análisis realizados.

Las soluciones a separar fueron caracterizadas en términos de pH, sólidos disueltos, contenido de carbohidratos y ácidos orgánicos (acético y fórmico) y productos de degradación (HMF y furfural) por HPLC, de acuerdo con el procedimiento de NREL/TP-510-42623. Por otra parte, se midió la absorbancia a 280 nm de la muestra, ajustando el pH a 6 (pH del agua destilada), como indicativo de la presencia de lignina o fragmentos de ésta.

En los casos que el peso molecular de todos los carbohidratos de la mezcla fuera menor a 1500 Da, se determinó el peso molecular de la solución por HPLC-SEC con detector RID, utilizando la columna Bio-Rad Aminex HPX-42A, agua como fase móvil y trabajando a 60 °C de temperatura y un flujo de 0,6 mL/min. Se realizó una curva de calibración utilizando como estándares: xilosa (Sigma Aldrich) y xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa y xilopentosa (Megazymes, Irlanda) disueltos en agua, en una concentración de 1 g/L.

En los casos de que el peso molecular de los carbohidratos presentes fuera mayor a 1000 Da, también se utilizó la técnica de HPLC-SEC con detector RID, pero utilizando 5 columnas en serie de la marca PSS de acuerdo con la recomendación del proveedor: 3 columnas MCX 1000Å y 2 columnas MCX 100Å. Se utilizó una solución buffer a pH 12 (6,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 3,2 g de NaOH por litro de agua y eventual ajuste del pH a 12 con NaOH) como fase móvil y se trabajó a 35 °C de temperatura y un flujo de 0.6 mL/min. Se utilizó en serie el detector UV a 280 nm, a los efectos de determinar la presencia de compuestos fenólicos en las muestras. Se realizó una curva de calibración utilizando como estándares la sal sódica de sulfato de poliestireno de la marca PSS con pesos moleculares: 4230, 7930, 10600, 14900, 20700, 29100 y 64300 Da.

Las soluciones de retenido y permeado de las distintas etapas de separación con membranas fueron analizadas de la misma forma.

14.2.4. Cálculos realizados.

- Se calcularon los flujos de permeado en función del tiempo de duración del ensayo.
- Se calculó la permeabilidad de la membrana en función del tiempo de duración del ensayo.
- Se determinó el factor de reducción de volumen (VRF) de acuerdo con la definición establecida en el Capítulo 5 de la Revisión Bibliográfica.
- Se establecieron los balances de masa en términos de xilosacáridos, ácido acético y compuestos fenólicos de las distintas fracciones separadas por las membranas.
- Se determinó la permeabilidad al agua destilada de la membrana previo y posterior a su uso, en las distintas presiones de trabajo. La determinación de la permeabilidad posterior al uso de la membrana y luego de la limpieza de esta con ácido acético, se realiza a los efectos de determinar el nivel de ensuciamiento irreversible “fouling” de la membrana, debido a la solución utilizada.

14.3. Ensayos realizados sobre el extracto proveniente del tratamiento de explosión a vapor

Para los ensayos de esta sección se utilizó el mismo licor extraído por explosión de vapor que se utilizó en los ensayos 1 a 6 con las Resinas de Intercambio. El mismo se obtuvo trabajando a 180 °C de temperatura y 10 minutos de tiempo de residencia.

Las características del licor se presentan en la Tabla 14-1.

Tabla 14-1. Composición del licor obtenido por la explosión de vapor a 180 °C y 10 minutos.

Licor 180°C, 10 minutos (g/L)			
pH	3,39 ± 0,02	Sólidos disueltos (g/L)	36,3 ± 0,1
Glucosa (g/L)	0,5 ± 0,1	Glucosacáridos (g/L)	1,2 ± 0,1
Xilosa (g/L)	12,5 ± 0,1	Xilosacáridos	24,7 ± 0,5
Ác. acético	9,3 ± 0,2	Ác. fórmico	0,8 ± 0,1
Furfural	0,05 ± 0,01	Absorbancia a 280 nm (dil 1:100)	0,923 ± 0,002
Peso molecular- Mw (Da)	312 ± 4		

Se trabajó con membranas de ultrafiltración PESH de 50.000 Da y membranas de PES de 10.000 Da (todas de marca Microdyn-Nadir). En la Figura 14-3 se muestran los ensayos realizados.

En el primer ensayo se utilizó una membrana de PES de 10.000 Da y se analizó la filtración del licor extraído, filtrado previamente con un filtro de acetato de celulosa con 0,45 µm de corte.

En la celda de acero inoxidable se colocaron 50 mL del licor filtrado y se aplicó una presión de 8 kg/cm² durante 260 minutos.

La Figura 14-2 muestra como varía el flujo de filtrado y la permeabilidad de la membrana en función del VRF.

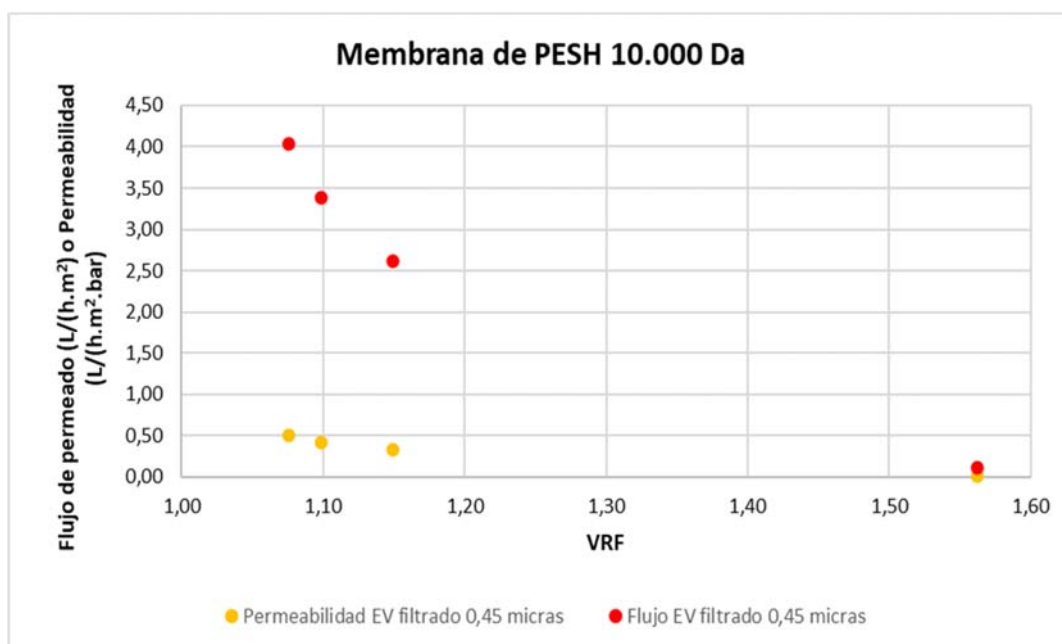


Figura 14-2. Flujo y permeabilidad obtenidos al ultrafiltrar el licor de explosión de vapor.

Los valores obtenidos fueron extremadamente bajos y como se observa, disminuyen con el tiempo. El fabricante recomienda para esta membrana una permeabilidad mayor a 50 L/hm² bar (Microdyn-Nadir, no date). Este compartimiento, con el mismo nivel de flujos fue observado por Koivula *et al.* (Koivula *et al.*, 2011, 2013) trabajando con licores de autohidrólisis de abedul, abeto o una mezcla de eucaliptus/pino y usando membranas de PES o polisulfona (PS), mientras que con membranas de celulosa regenerada reportaron un flujo de alrededor de 80 kg/(h m²).

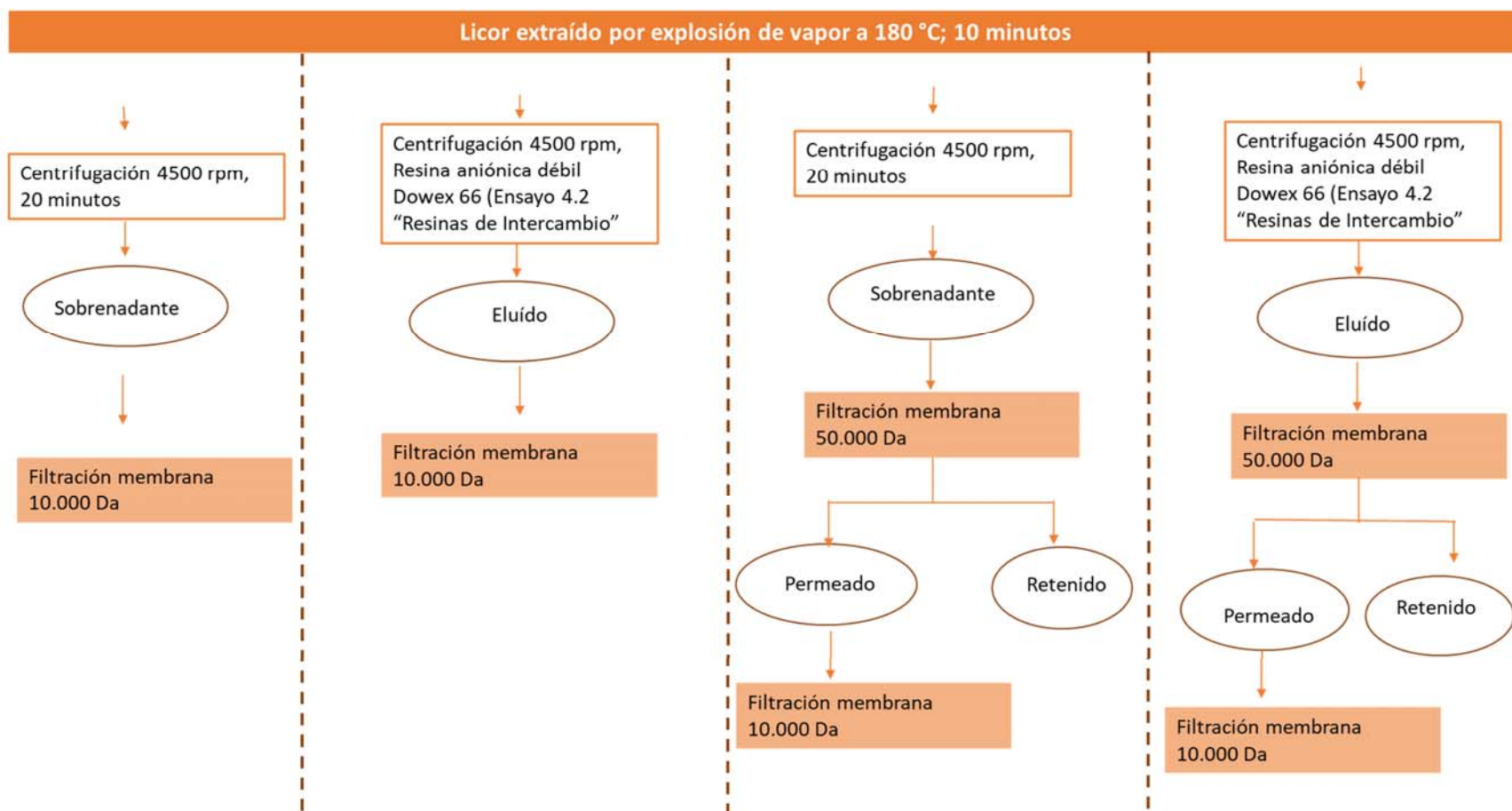


Figura 14-3. Esquema de las experiencias de filtración realizadas con el licor proveniente de los ensayos de explosión de vapor.

La mayor hidrofiliidad de las membranas de celulosa regenerada serían la explicación de este fenómeno. Del mismo modo, los valores de flujo obtenidos por Al Manasrah (Al Manasrah *et al.*, 2012) quienes trabajaron con licor de autohidrólisis de abeto, ultrafiltrándolo por membranas de celulosa regenerada de 5, 10 y 30 kDa de corte nominal fueron muy superiores. Para la membrana de 10 kDa indicaron un flujo de permeado de alrededor de 150 kg/(h.m²). Por su parte, Gullón *et al.* (Gullón, González-Muñoz, Domínguez, & Parajó, 2008), trabajando con licor de autohidrólisis de eucalipto indicaron un flujo aproximadamente de 350 L/(h.m²) a 7 bar de presión, utilizando membranas de cerámica de 15 kDa, más hidrofóbicas que las de PES utilizadas aquí. Sin embargo, en el trabajo de Gullón, así como en el indicado por Al Manasrah, el área de membrana fue 10 o más veces superior y además la forma de operación es en flujo transversal, lo que puede afectar significativamente las condiciones de filtrado. Además, las concentraciones de los carbohidratos y derivados de lignina utilizadas eran menores que las utilizadas en el presente trabajo.

El ensuciamiento o “fouling” es un problema severo cuando se trabaja con licores lignocelulósicos ácidos, ya que productos de degradación de la lignina y los extractivos liberados durante el pretratamiento de la biomasa tienden a formar partículas insolubles que se adhieren a la membrana reversible o irreversiblemente, provocando una drástica disminución del flujo (Puro, Tanninen and Nyström, 2002; Koivula *et al.*, 2011).

Para poder aumentar el flujo de permeado se ensayaron distintas estrategias, que se muestran en la Figura 14-3. De esta forma, se purificó el licor con la resina aniónica débil Dowex 66 de acuerdo con los resultados obtenidos en el capítulo anterior. y el eluido resultante se ultrafiltró por la membrana de 10 kDa aplicando una presión de 8 kg/cm². También se trabajó prefiltrando con una membrana de mayor corte y de PESH, que como se mencionó, al tener un tratamiento superficial, aumenta la hifrofilicidad. En este caso se trabajó con 6 kg/cm² de presión. Del mismo modo, se realizaron ambos tratamientos en conjunto para evaluar los resultados. La Figura 14-4 muestra el flujo de permeado con la membrana de PES de 10 kDa, para el licor de explosión a vapor sin tratar y luego de un tratamiento con la resina aniónica.

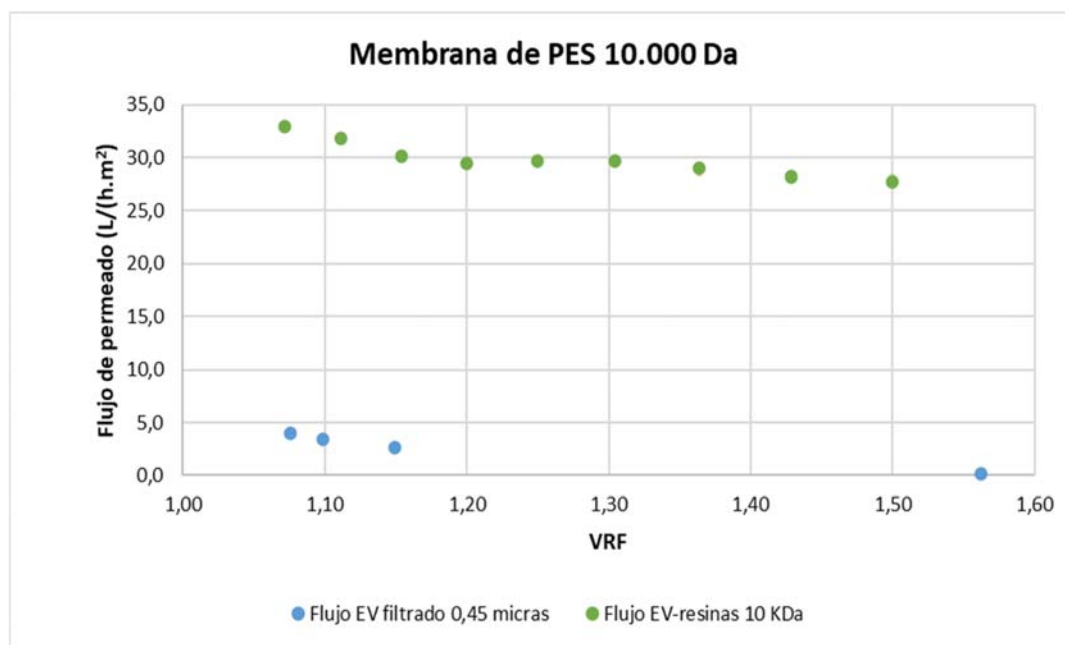


Figura 14-4. Flujo de permeado del licor de explosión de vapor con y sin tratamiento con resina aniónica.

Cómo puede observarse, al realizar un tratamiento con resinas aniónicas previo a la ultrafiltración con membranas se logró una mejora significativa del flujo de filtrado, manteniéndose aun levemente por debajo de las recomendaciones del fabricante. Estos valores son muy similares a los obtenidos por Koivula *et al.* (Koivula *et al.*, 2013) quienes tanto para un licor de autohidrólisis de eucalipto/pino como de abedul, reportaron valores del mismo orden luego del tratamiento del licor con resinas de adsorción del tipo XAD.

En la Figura 14-5 se muestra en la parte superior, el flujo de filtrado y la permeabilidad al pasar el licor (con y sin tratamiento con la resina aniónica débil) por la membrana de PESH de 50.000 Da. En la parte inferior se muestra el flujo de filtrado por 10.000 Da de la fracción permeada de 50.000 Da.

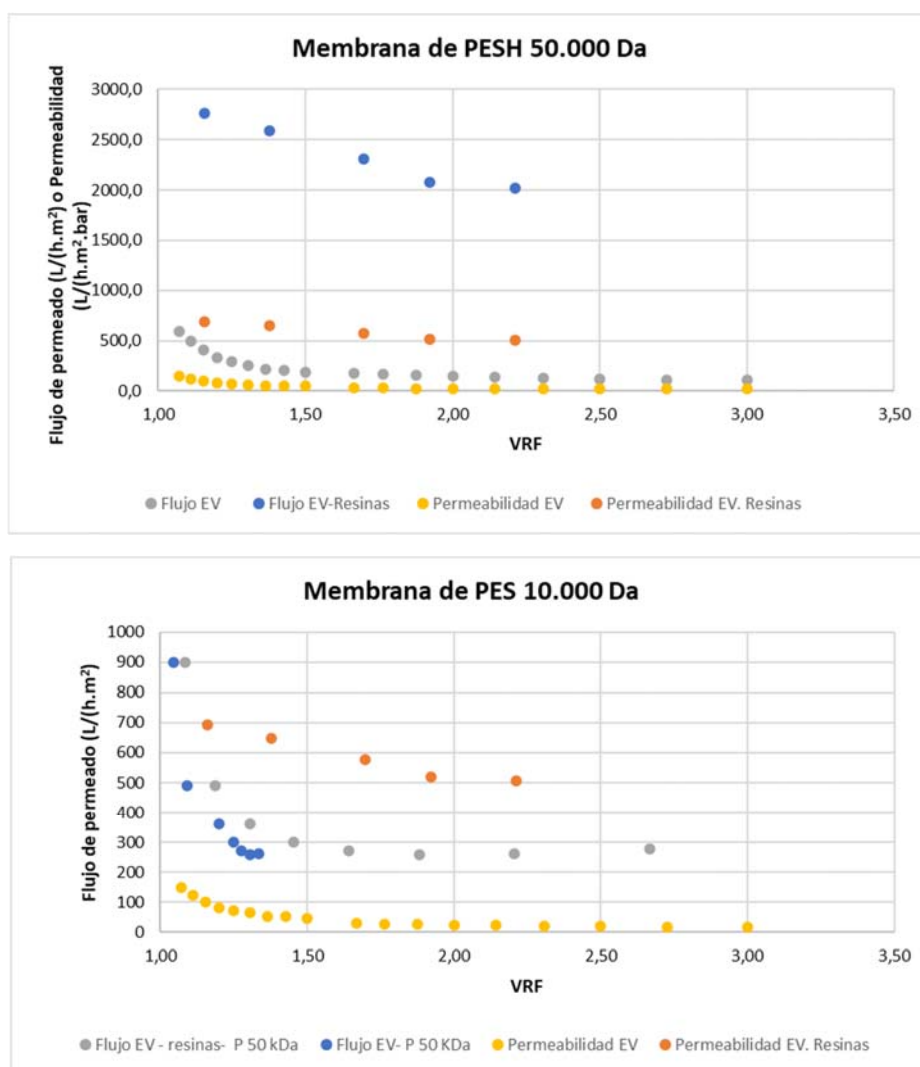
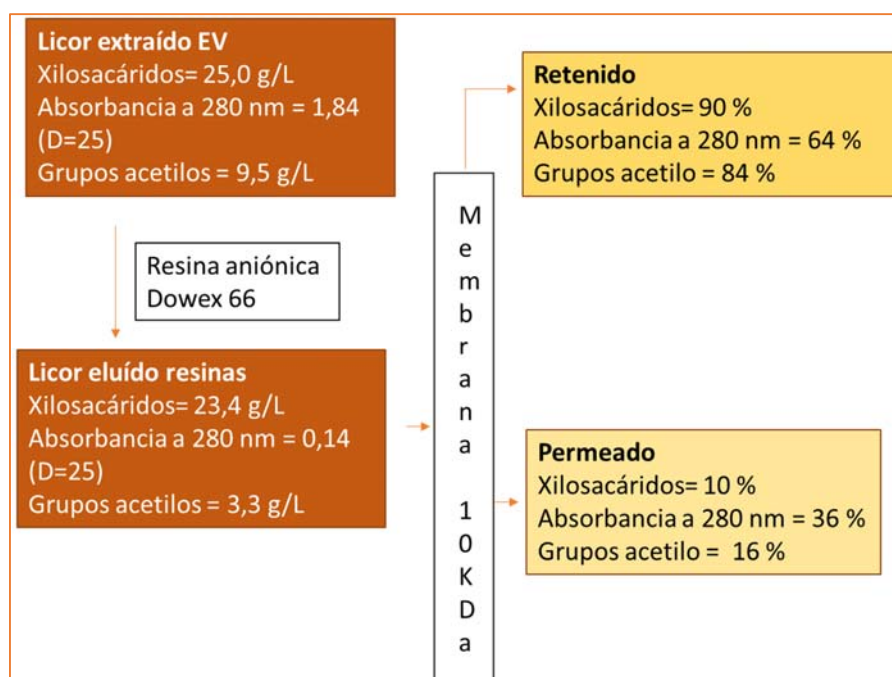
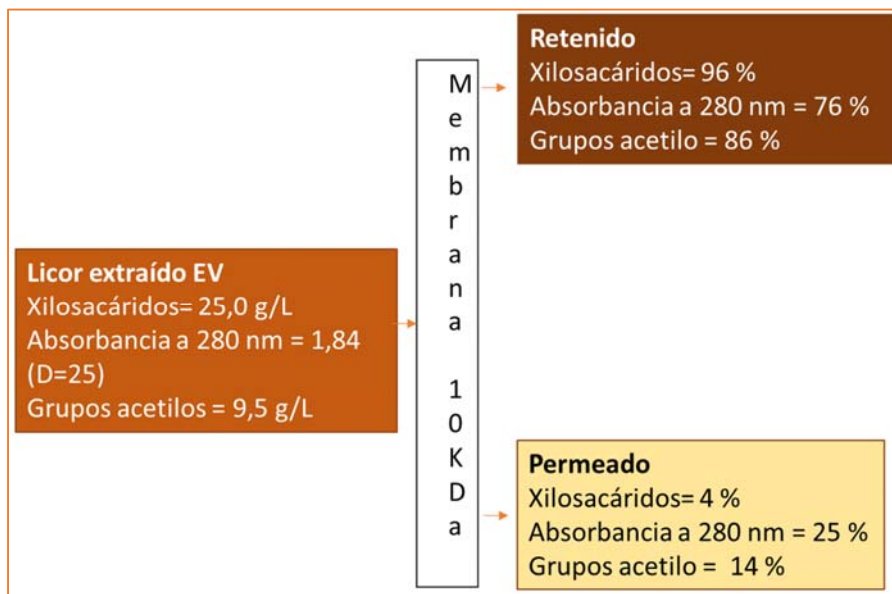


Figura 14-5. Flujo y permeabilidad del licor con y sin tratamiento con resinas aniónicas débiles. En la parte superior, permeado de 50.000 Da y en la parte inferior, filtrado de 10.000 Da del permeado de la membrana de 50.000 Da.

Como puede observarse al trabajar con las dos membranas en serie mejora sustancialmente el flujo (y la permeabilidad) del filtrado, lográndose flujos aceptables para su posterior escalado. Es necesario, analizar ahora si se logró la concentración y purificación de los xilosacáridos presentes en el licor. Para ello se presentan los balances de masa de las distintas experiencias realizadas (Figura 14-6).



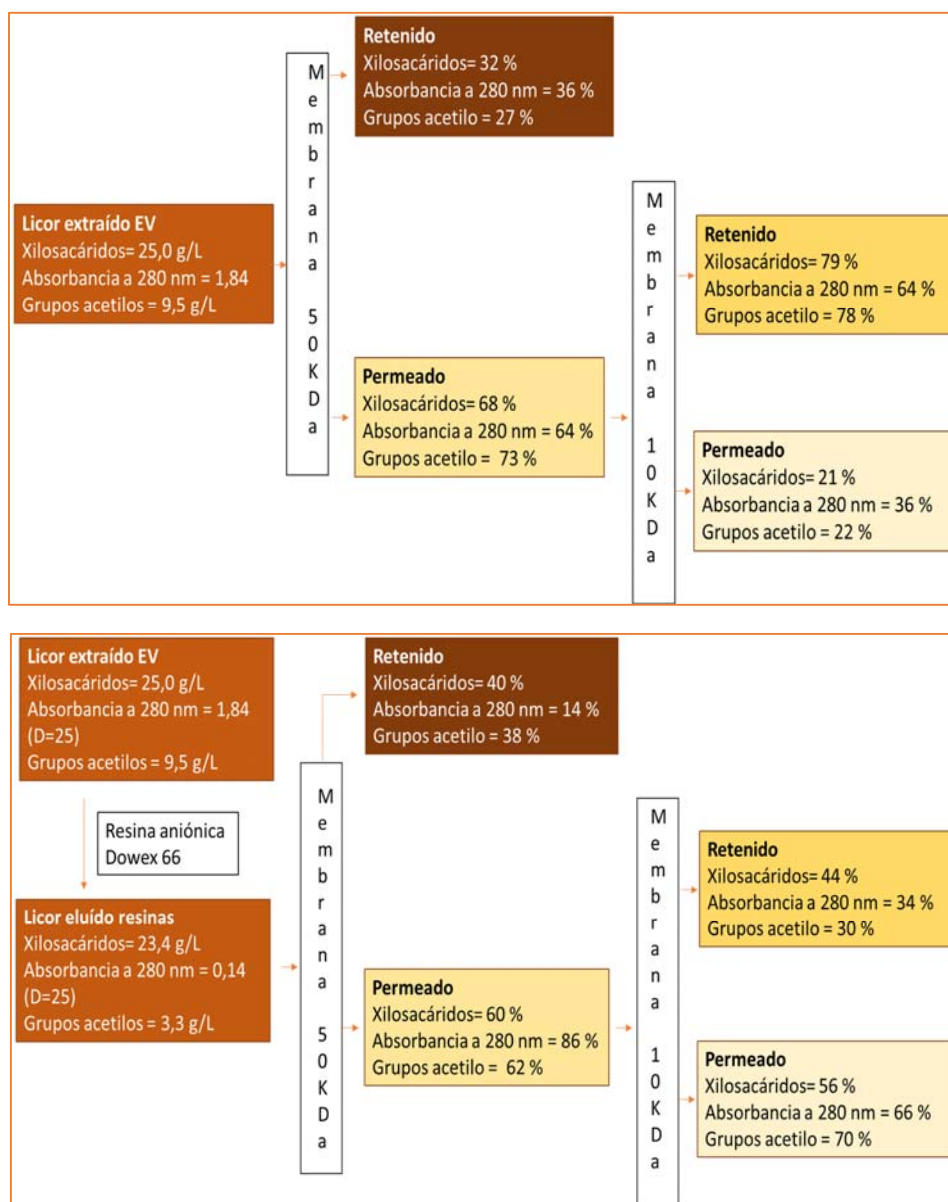


Figura 14-6. Distribución de los xilosacáridos, absorbancia a 280 nm y grupos acetilos en las distintas etapas del filtrado con membranas de 10.000 Da y/o 50.000 Da.

Como puede verse en la Figura 14-6, no fue posible separar eficientemente los xilosacáridos de los compuestos fenólicos ni del ácido acético en ninguna de las configuraciones ensayadas utilizando membranas. En el caso de la filtración del licor a 10.000 Da se logró retener un poco más selectivamente los xilosacáridos que los otros compuestos analizados, pero por la baja selectividad y permeabilidad comentada previamente, no es una estrategia de separación adecuada. Los xilosacáridos, en la membrana de 10.000 Da quedaron mayoritariamente en el retenido, a pesar de que en la determinación del peso molecular de estos el peso molecular promedio fue de 312 ± 4 Da. Este comportamiento es posiblemente debido a la interacción del material de las membranas con los componentes de la solución que aumentan la repulsión electrostática de la interfase y no permiten la separación (Thuvander, 2018). Koivula *et al.* (Koivula *et al.*, 2011) obtuvieron resultados similares trabajando con licor de autohidrólisis de eucalipto/pino o de abeto. Egües *et al.* (Egües *et al.*, 2012) trabajando con licor de autohidrólisis de tallos de maíz y con membranas de 1000, 5000 y 10.000 Da también indicaron que la mayor

fracción de retenido de hemicelulosas se obtuvo en la membrana de mayor corte. No se indicó en este caso la eficiencia de la separación de las hemicelulosas de los compuestos fenólicos o ácido acético.

Por lo previamente expuesto, se concluye que la utilización de las membranas de ultrafiltración no resultó en una buena estrategia para concentrar o purificar los licores provenientes del pretratamiento de explosión de vapor en las condiciones utilizadas.

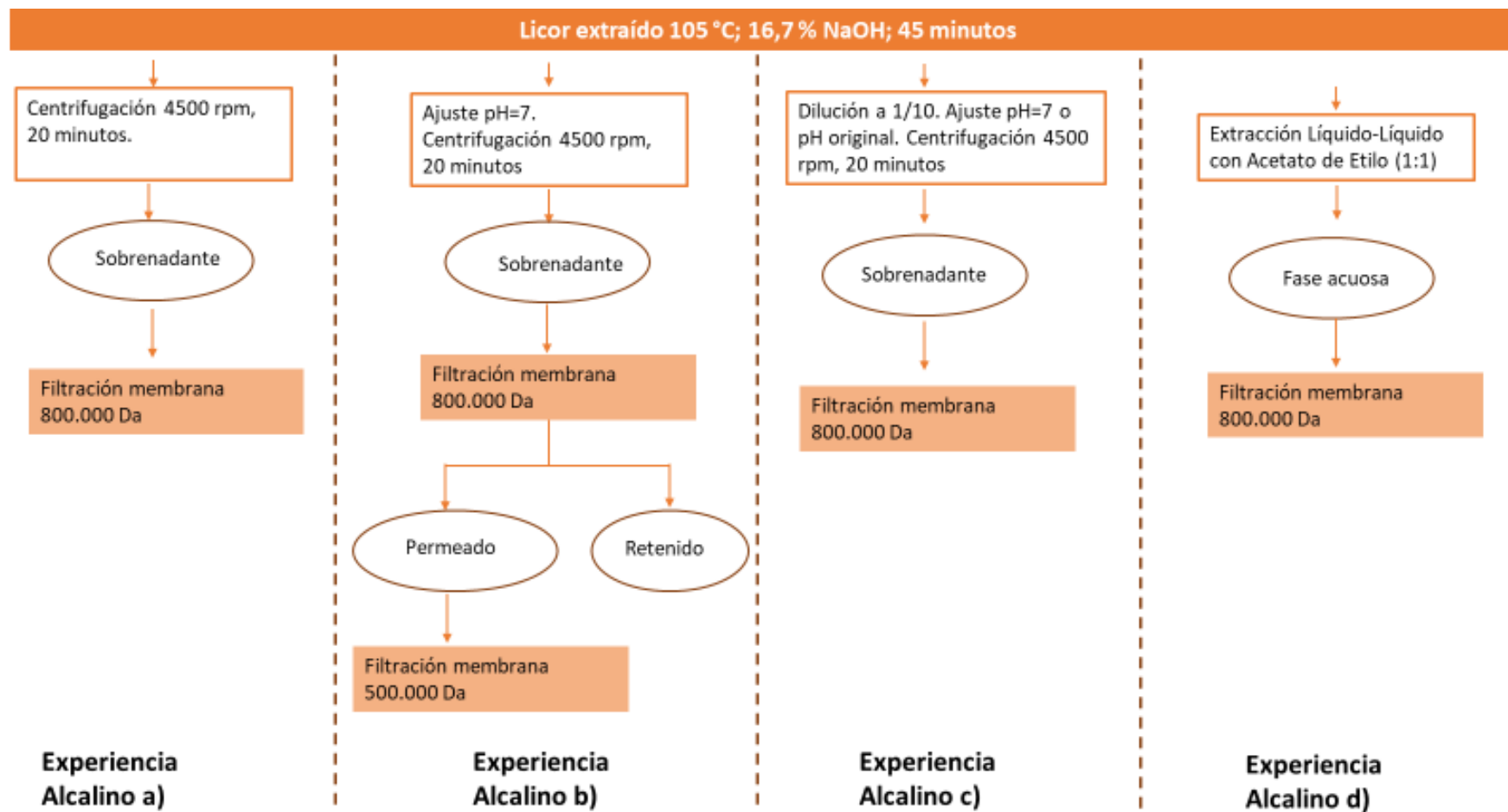
14.4. Ensayos realizados sobre el extracto proveniente del tratamiento con hidróxido de sodio

Se trabajó a partir del extracto obtenido a 105 °C, 45 minutos y 16,7 % de carga de soda. En la Tabla 14-2 se resumen las características principales del extracto obtenido.

Tabla 14-2. Características del extracto alcalino utilizado.

Extracto	
Temperatura = 105 °C, tiempo a T máx.= 45 minutos, Carga NaOH = 16,7 %	
Rendimiento extracción (% b.m.s)	18,2 ± 1,6
Sólidos disueltos en el extracto (%)	11,4 ± 0,2
pH	12,6 ± 0,1
Xilosacáridos (g/L) / Xilosacáridos (% b.m.s.)	5,6 ± 0,3 / 2,8 ± 0,2
Glucosacáridos (g/L) / Glucosacáridos (% b.m.s.)	2,4 ± 0,4 / 1,2 ± 0,3
Grupos acetilos (g/L) / Grupos acetilos (% b.m.s.)	5,3 ± 0,4 / 2,4 ± 0,3
Absorbancia a 280nm (dilución 1/1500)	0,401 ± 0,002
Mw (Da)	11310 ± 650

Los ensayos realizados se esquematizan en la Figura 14-7.



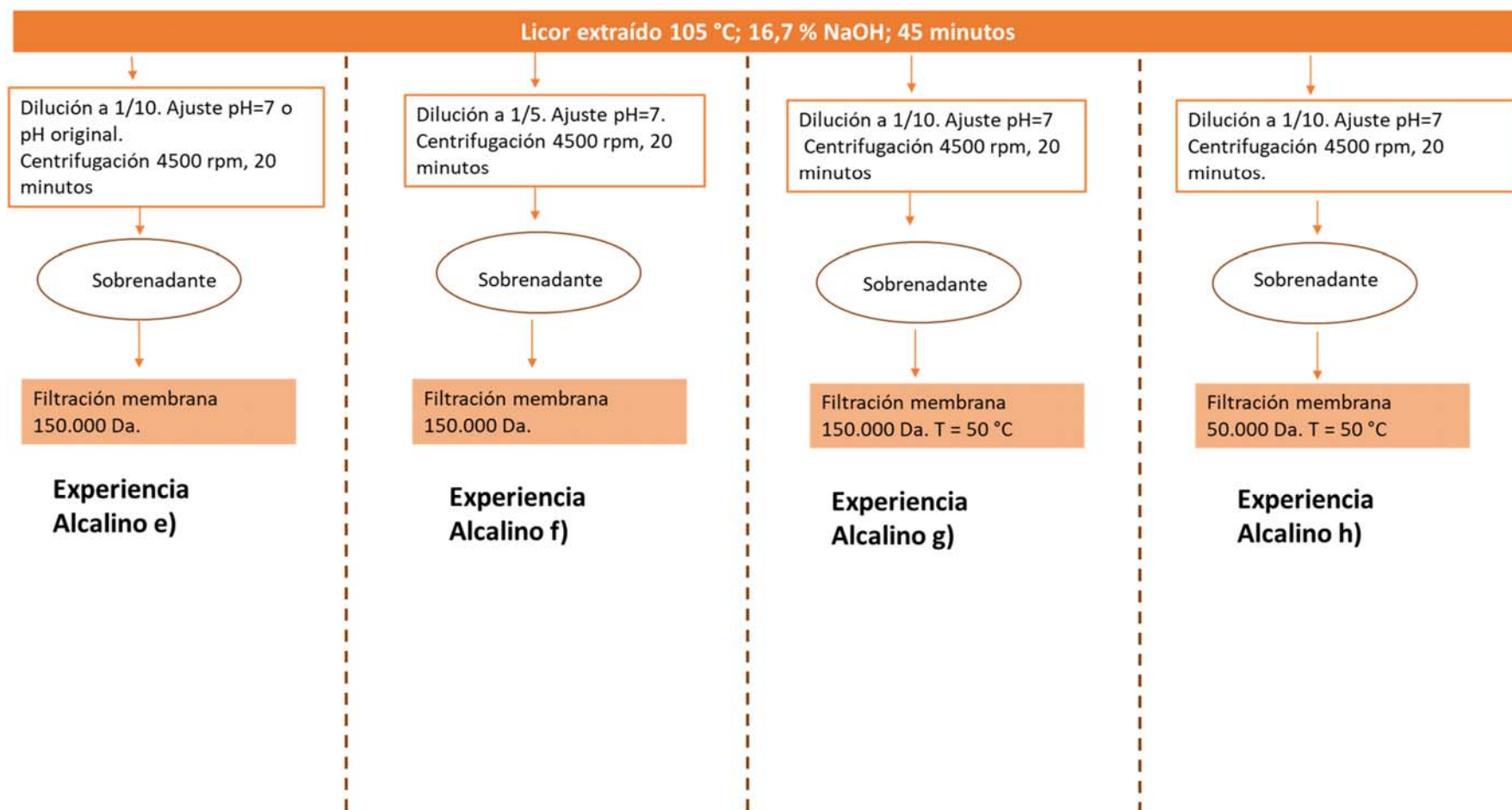


Figura 14-7. Esquema de las experiencias de microfiltración realizadas con el extracto alcalino.

14.4.1. Experiencia alcalino a)

Para determinar la factibilidad de separar los xilosacáridos de los demás compuestos del licor extraído, se ensayó en primer término la filtración directa de este.

En experiencias previas se encontró que no era factible filtrar a vacío el extracto por filtros de acetato de celulosas con 0,45 μm de corte, por lo que se decidió comenzar a trabajar con la membrana de mayor corte disponible. De esta forma, se utilizó una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF+) de 800.000 Da de la marca Synder, el signo de + del material indica que el mismo fue tratado en su fabricación a los efectos de disminuir su carga electrostática negativa.

El extracto se centrifugó a 3000g durante 20 minutos a los efectos de remover los sólidos suspendidos que pudiere contener. Se colocaron 260 mL del extracto en la celda de acero inoxidable y se aplicaron presiones desde 2 a 8 bar, no obteniendo permeado al cabo de 30 minutos de ensayo, por lo que se consideró que no es factible filtrar este extracto directamente por membranas de PVDF+ (de 800.000 Da nominal). Se utilizó este material ya que fue el único disponible comercialmente con el corte de 800.000 Da.

En términos generales Ho y Sirkar (Ho and Sirkar, 1992) mencionaron que en condiciones desfavorables las membranas se tornan órdenes de magnitud menos eficientes que en condiciones normales y no permiten el tamizado de partículas más pequeñas que el tamaño de poro. De acuerdo con la teoría de DLVO (teoría de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) la separación por membranas de compuestos disueltos en líquidos se da por efectos combinados de fuerzas intermoleculares según la teoría de Van der Waals e interacciones de doble capa eléctrica sobre la superficie de la membrana sólida. Bajo la mayoría de las circunstancias, cuando los sólidos están inmersos en líquidos, las fuerzas de Van der Waals son atractivas y las fuerzas de doble capa eléctrica son repulsivas. Sin embargo, ambos tipos de fuerzas tienen la capacidad de ser atractivos o repulsivos y el efecto neto puede ser diverso dependiendo de las condiciones del líquido y el sólido (membrana) (Ho and Sirkar, 1992). De acuerdo a Thuvander (Thuvander, 2018), las membranas de microfiltración (MF), cuyos poros grandes permiten el paso de las hemicelulosas, pueden usarse para eliminar componentes grandes e indeseables, como partículas y extractos coloidales. Sin embargo, aunque los poros de las membranas MF son considerablemente más grandes que las moléculas de hemicelulosas, la retención de hemicelulosas durante la filtración puede ser sorprendentemente alta. Esto generalmente se explica por la formación de capas secundarias de material en la superficie de la membrana.

14.4.2. Experiencia alcalino b)

La muestra anterior se ajustó a pH 7,12 y se centrifugó a 3000g durante 20 minutos, de forma de separar el precipitado formado. Este precipitado, según la bibliografía y los análisis de los capítulos precedentes, contiene fundamentalmente fragmentos de lignina, que precipitaron al bajar el pH, aunque también existen pérdidas de carbohidratos. Particularmente en este caso precipitaron el 27 % de los carbohidratos presentes en el extracto.

Se colocaron 240 mL del sobrenadante obtenido en la celda de acero inoxidable y se utilizó una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF+) de 800.000 Da de la marca Synder, aplicándose una presión de 8 bar durante 120 minutos de filtración.

La Figura 14-8 muestra como varía el flujo de filtrado y la permeabilidad de la membrana en función del VRF. El fabricante no informa el valor de permeabilidad recomendado para esta membrana, pero, como referencia, una membrana de PVDF+ de 500.000 Da se indica que la permeabilidad es mayor a 300 L/(m²hbar) utilizando agua (Microdyn-Nadir, no date).

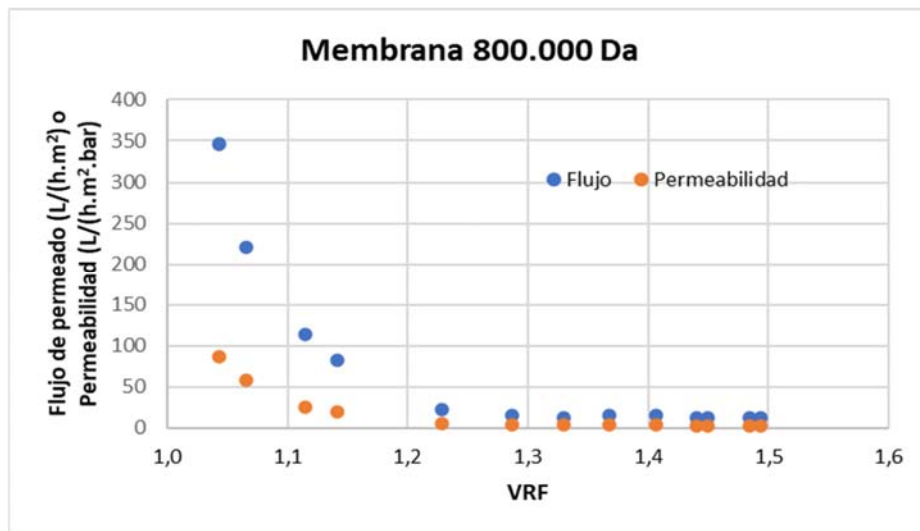


Figura 14-8. Flujo y permeabilidad del extracto alcalino en función del factor de reducción de volumen para la membrana de PVDF+ de 800.000Da.

Como puede verse en la figura, en los primeros 5 minutos la permeabilidad bajó bastante, partiendo de 86 L/(h m² bar) (lo que se considera un valor bajo pero aceptable) a menos de 10 L/(h m² bar) para posteriormente estabilizarse. Este último valor, que se puede además cotejar con los valores de flujo de filtrado, es inaceptable para un posterior escalado. Por esto se puede decir que los fenómenos de ensuciamiento (“fouling”) o de formación de una capa secundaria que aumenta la resistencia a la filtración, se dan ya en los primeros minutos del ensayo.

Complementariamente, al finalizar en ensayo (VRF = 1,5) y desarmar el sistema, se constató que la membrana utilizada estaba severamente dañada por lo que fue descartada (Figura 14-9a). Cabe señalar que el ensayo se realizó en el rango de pH aceptado para la membrana (pH = 2-11). Por otro lado, visualmente no se observan diferencias entre el permeado y retenido (Figura 14-9b), aunque como se verá más adelante, la absorbancia en la región UV de ambos es muy diferente.



Figura 14-9. a) Membrana de PVDF de 800.000 Da luego del ensayo. Las marcas más oscuras muestran zonas de la membrana donde se dañó el material filtrante. b) Permeado y retenido luego del ensayo.

Tanto el permeado como el retenido se filtraron por una membrana de la marca Synder de PVDF+ con un corte de 500.000 Da, aplicando 8 bar de presión. Sobre el retenido se ejerció la presión mencionada durante 20 minutos, no lográndose obtener permeado, por lo que se dió por finalizado el ensayo. El permeado se filtró hasta un VRF=1,6 por disponibilidad de solución, a los efectos de tener un volumen disponible de permeado y retenido para realizar los análisis químicos.

La Figura 14-10 muestra como varía el flujo de filtrado y la Permeabilidad de la membrana en función del VRF utilizando la membrana de 500.000 Da.

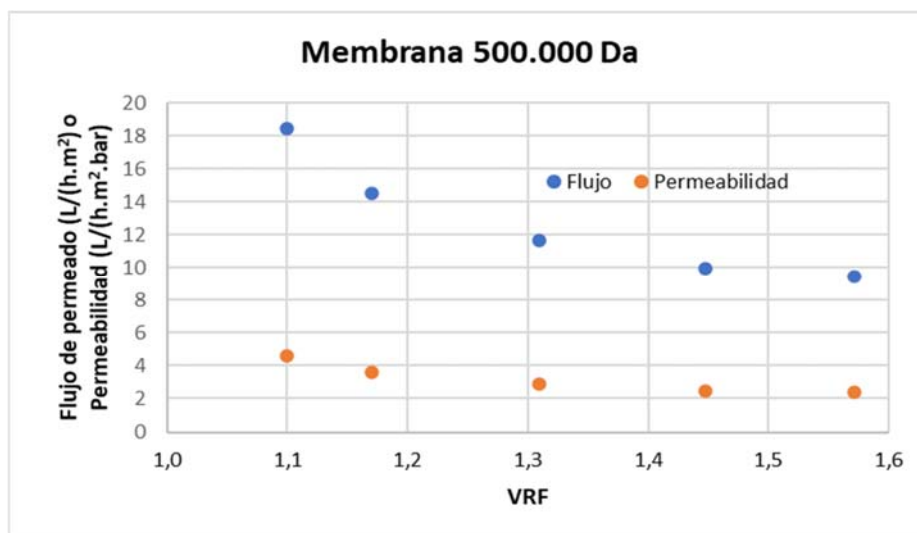


Figura 14-10. Flujo y permeabilidad del extracto alcalino en función del factor de reducción de volumen para la membrana de PVDF+ de 500.000Da (previamente permeado por 800.000Da).

Nuevamente la permeabilidad y el flujo de permeado fueron inaceptablemente bajos.

Referente al contenido de lignina en las diferentes fracciones, se puede observar en la Figura 14-11 que a 280 nm la absorbancia del licor original y del retenido son muy similares, lo que indica que los compuestos de lignina quedaron mayoritariamente en el retenido.

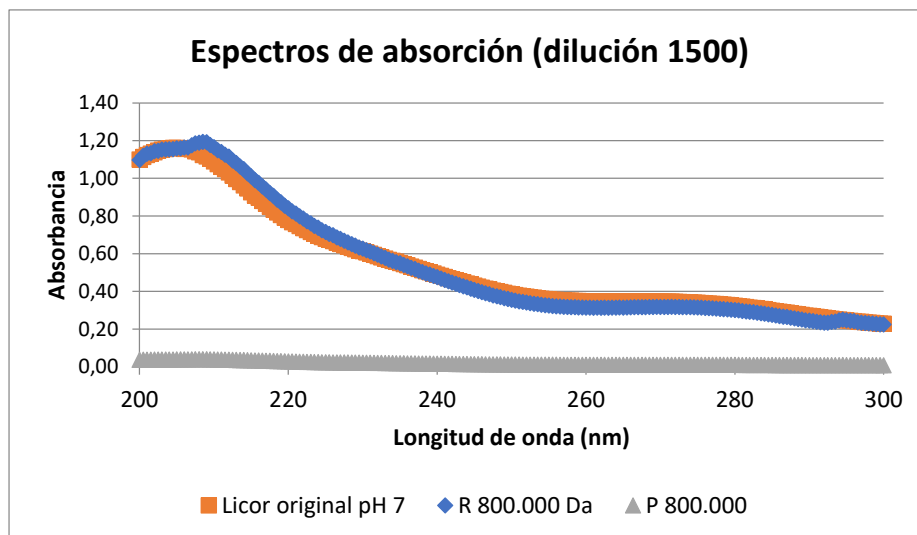


Figura 14-11. Espectros de absorción en la región UV para el licor extraído, el retenido (R) y Permeado (P) obtenidos con la membrana de 800.000 Da. Los valores están ponderados respecto al volumen en cada fracción.

Realizando el balance de masa para los xilosacáridos, absorbancia a 280 nm (compuestos fenólicos, derivados de la lignina) y grupos acetilos tenemos la distribución que se muestra en la Figura 14-12.

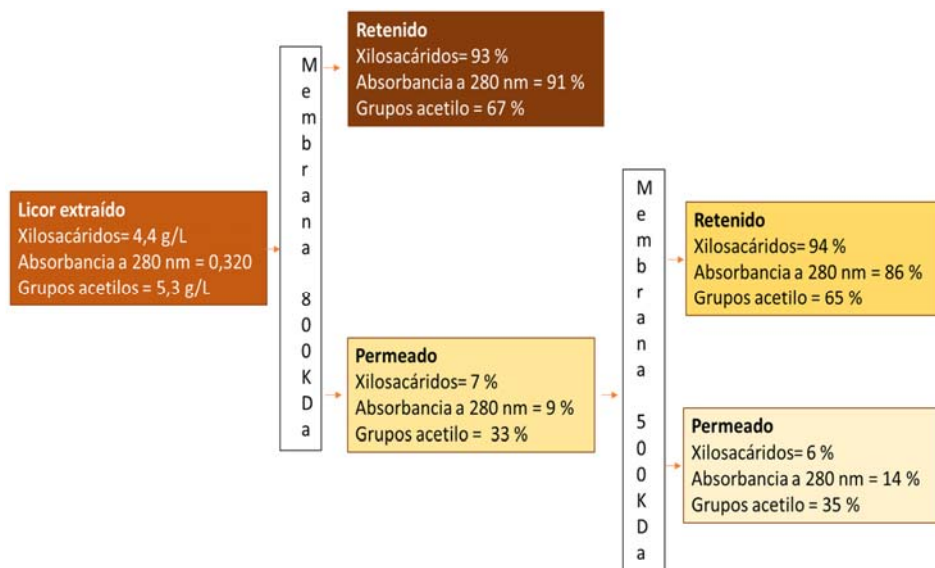


Figura 14-12. Distribución de los xilosacáridos, absorbancia a 280 nm y grupos acetilos en las distintas etapas del filtrado con membranas de 800.000 Da y 500.000 Da. Licor de partida a pH=7.

Como puede verse, la mayoría de los xilosacáridos (93 %) así como los compuestos que absorben a 280 nm (91 %), no atravesaron la membrana y quedaron en el remanente de la membrana de 800.000 Da, así como el 67 % de los grupos acetilos. El peso molecular del licor extraído y luego de la remoción de precipitado por el ajuste de pH a 7 fue de Mw=28.500 Da.

Los ensayos por filtración con membrana en serie, como el analizado fueron realizados en la misma jornada y posteriormente se realizaron los análisis químicos de las distintas fracciones.

Es por ello que, en este caso, por ejemplo, se filtró por membrana de 500.000 Da el permeado de la membrana de 800.000 Da, siendo que la mayor parte de los xilosacáridos había quedado retenida en esta última membrana. Como fue mencionado, no fue posible obtener permeado al filtrar el retenido de esta membrana por la membrana de 500.000 Da.

De esta forma, se concluye que no es factible separar los compuestos de lignina y hemicelulosas del licor extraído utilizando membranas con cortes tan elevados, posiblemente porque estos compuestos se encuentran químicamente unidos formando complejos lignina-carbohidratos.

Existen varios trabajos de separación de lignina del licor negro (Wallberg, Jönsson and Wimmerstedt, 2003; Wallberg, Linde and Jönsson, 2006; Jönsson, Nordin and Wallberg, 2008; Jönsson, 2016; Thuvander, Lipnizki and Jönsson, 2019), donde se menciona que la diferencia en la retención entre lignina y hemicelulosas proporciona un medio para eliminar las hemicelulosas por ultra o micro filtración antes de la precipitación de lignina, quedando las hemicelulosas en el retenido y la lignina en el permeado. En estos casos, dadas las mayores temperaturas y tiempos trabajados, se observaron dos diferencias con este trabajo: por un lado, el contenido de lignina es mucho mayor al de carbohidratos en el licor negro y por otro, posiblemente la cantidad de complejos lignina-carbohidratos sea menor que en este trabajo, dado que el tratamiento durante el pulpeo fue más exhaustivo. En estos trabajos se utilizaron membranas de ultra o microfiltración, normalmente de cerámica o PES. Normalmente el objetivo fue concentrar y purificar la lignina, entonces aparecen pocos datos publicados acerca del comportamiento de las hemicelulosas.

Por otra parte, en el trabajo de Ziesig *et al.* (Ziesig, Tomani and Theliander, 2014) se trabajó con licor negro Kraft de eucalipto, el que se filtró por membranas cerámicas de microfiltración de 0,2 μm y 300.000 Da, trabajando a 120 °C y 2 bar de presión. En el ensayo con la membrana de 0,2 μm , el 40 % de los carbohidratos quedaron en el retenido, mientras que el 57 % de los carbohidratos del permeado a 0,2 μm no atraviesa la membrana de 300.000 Da. Estos valores podrían considerarse en el orden de los obtenidos en este trabajo. Sin embargo, en el trabajo de Ziesig *et al.*, los compuestos de lignina atraviesan por completo la membrana de 0,2 μm y solo el 18 % queda retenido en la de 300.000 Da. Al estar trabajando con licor negro que fue sometido a mayor temperatura y tiempo de reacción, posiblemente los compuestos de lignina estén más fragmentados que en nuestro trabajo y químicamente separados de los carbohidratos.

14.4.3. Experiencia alcalino c)

Considerando la alta concentración de soda presente en el licor se ensayó diluir el mismo y analizar el flujo de permeado y la eficiencia de la separación en estos casos. La alta concentración de soda presente aumenta la viscosidad así como la repulsión electrostática de la solución con la membrana y con ello los coeficientes de transferencia de masa desde el seno de la solución a la superficie de la membrana pudiendo ser la razón por la que no se consigue la permeabilidad suficiente que permita la separación de los compuestos de interés, (Pritchard, Howell and Field, 1995; Krawczyk, Arkell and Jönsson, 2011). Para ello se trabajó con el licor diluido a la décima parte en dos condiciones, a pH resultante del licor y luego de ajustar el pH del licor diluido a 7. En ambos casos, previamente se separó el sobrenadante por centrifugación. Se trabajó a 8 kg/cm² de presión con Nitrógeno.

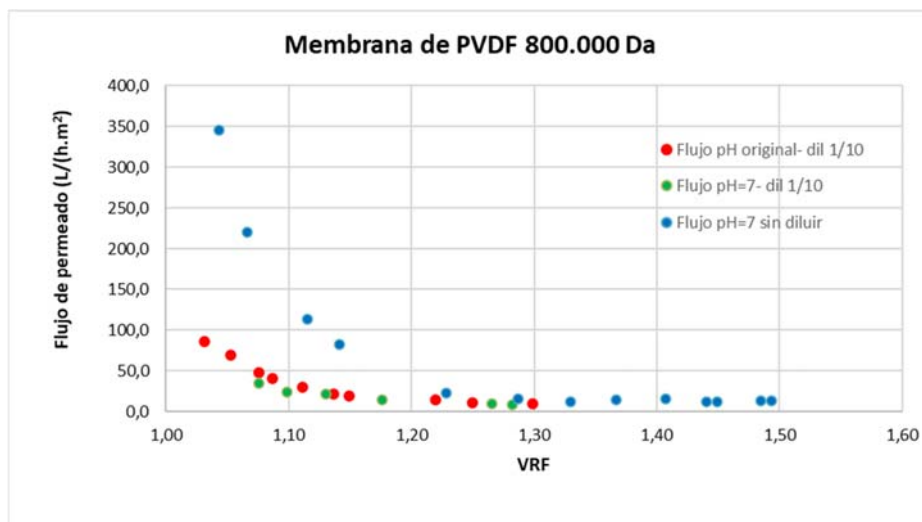


Figura 14-13. Flujo de permeado a 800.000 Da trabajando con el licor diluido y sin diluir.

En los dos ensayos con el licor diluido, el flujo de permeado fue bastante bajo desde el comienzo y continuó disminuyendo a medida que se prolongaba el ensayo. Como puede observarse en la Figura 14-13 la estrategia de diluir el licor no fue efectiva para aumentar el flujo de permeado. Sin embargo, en estos ensayos, la membrana luego del uso no sufrió alteraciones a diferencia del trabajo sin diluir que hubo que descartarla. De esta forma, se puede explicar que la obtención de un flujo de permeado superior con el licor sin diluir se debe a que al dañar la membrana se crearon caminos preferenciales que permitieron aumentar el flujo hasta que el ensuciamiento de la misma lo volvió a disminuir. En cuanto a la separación de las fracciones de xilosacáridos de los compuestos fenólicos o ácido acético, no hubo mayores diferencias que trabajando con el licor sin diluir. Para el caso del trabajo con el licor diluido a pH original un 83 % de los xilosacáridos, 80 % de los grupos acetilos y 80 % de los compuestos fenólicos quedaron en la fracción retenida. Trabajando a pH=7 estos valores fueron: 85 % de los xilosacáridos, 80 % de la lignina y 74 % de los grupos acetilos. De esta forma, la estrategia de dilución del licor no fue exitosa ni para aumentar el flujo de permeado, ni la separación de xilosacáridos con la membrana de 800.000 Da de PVDF. Igual que en los casos anteriores, no se apreciaron diferencias visuales en las soluciones de retenido y permeado.

14.4.4. Experiencia alcalino d)

Para esta experiencia se utilizó licor original con la composición dada en la Tabla 14-1. A los efectos de realizar una remoción previa de compuestos fenólicos se realizó una extracción L-L utilizando Acetato de Etilo. Para ello se agregó una relación de 1:1 (licor: acetato de etilo), un tiempo de mezclado de 20 minutos con agitación magnética suave y un tiempo de decantación en bola de 60 minutos inicialmente. Al transcurrir ese tiempo y ver que no se lograban separar las dos fases se resolvió dejarlo un tiempo mayor (hasta 12 horas) en las que no se lograron separar las dos fases, por lo que se descartó esta condición.

En la bibliografía analizada, sólo se encontró una publicación donde se realiza extracción Líquido-Líquido con licores alcalinos (Faustino *et al.*, 2010). En este caso se trabajó con licor

negro de pulpeo Kraft y al sulfito de eucalipto. Trabajaron con licor diluido y reportaron concentraciones de compuestos fenólicos del orden de 150 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de licor, lo que se presume (por los valores de absorbancia obtenidos) que son muchísimo menores a las presentes en este trabajo. Este trabajo no incluye filtración con membranas.

14.4.5. Experiencia alcalino e-f)

En los ensayos que siguen, se buscó utilizar una membrana de menor corte nominal y de un material más hidrofílico para evaluar si era posible mejorar los flujos de permeado y la separación de los xilosacáridos. En el ensayo e) se trabajó con una membrana de PES de 150.000 Da de corte nominal y con el licor alcalino diluido a la décima parte en dos condiciones: a pH original del licor y a pH=7. En el ensayo f) se diluyó el licor a la quinta parte y se utilizó el licor a pH=7. En todos los casos se centrifugó la solución para remover los sólidos suspendidos previo al ensayo. En la Figura 14-14 se muestran los flujos de permeado obtenidos al trabajar a 8 kg/cm² de presión.

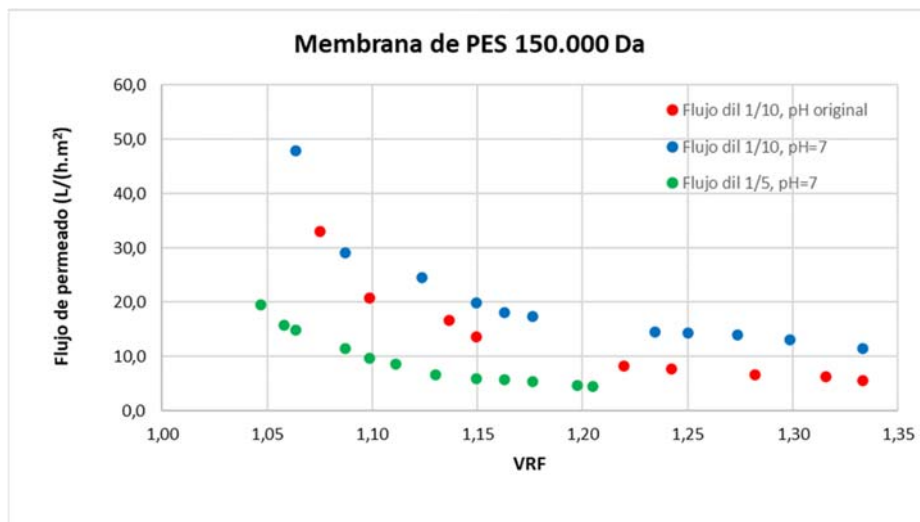


Figura 14-14. Flujo de permeado con el licor diluido 1/10 trabajando a pH original y con el pH ajustado en 7. Se muestra también el flujo de permeado con el licor diluido 1/5 y a pH=7.

Los flujos obtenidos son bastante bajos, aunque del mismo orden que trabajando con la membrana de mayor corte. Al igual que en los casos anteriores, para la misma dilución, el flujo a pH=7 es superior al flujo a pH original. En este caso al agregar ácido clorhídrico se removi6 20 % de la absorbancia a 280nm, pero la pérdida de xilosacáridos fue del orden de 10 %. Al trabajar con una dilución menor (1/5) el flujo bajó aún más por lo que no se continuó trabajando con esta condición. Este fenómeno es esperable ya que al aumentar la viscosidad, por el aumento de los sólidos en solución (principalmente hidróxido de sodio disuelto), el flujo disminuye (Krawczyk, Arkell and Jönsson, 2011). Como se observa en la parte superior de la Figura 14-15, visualmente el permeado y el retenido por la membrana son muy diferentes. Al realizar el balance de masa correspondiente de ambas fracciones, el mayor porcentaje de xilosacáridos, así como de grupos fenólicos queda nuevamente presente en el retenido. Se observa una

selectividad un poco mayor para los grupos acetilos, los cuales pasan en un porcentaje mayor al permeado, pero continúan mayoritariamente en el retenido.

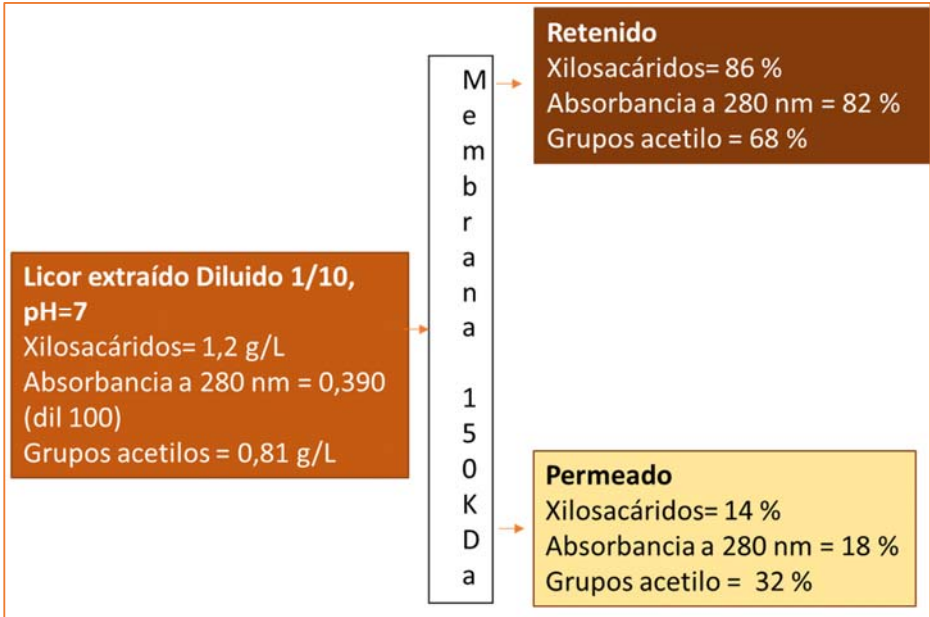


Figura 14-15. Parte superior: Retenido y permeado de la membrana de PES de 150.000 Da. Condiciones: licor diluido 1/10, pH=7. Parte inferior: Balance de masa del retenido y permeado en esas condiciones de trabajo.

No se muestra el balance de masa para los otros ensayos (dilución 1/10 y pH del licor sin ajustar y dilución 1/5 y pH =7, ya que los valores son del mismo orden).

Cuando se idearon estos ensayos y de acuerdo con la revisión de bibliografía (Jönsson, Nordin and Wallberg, 2008; Jönsson, 2016), las hemicelulosas quedarían mayoritariamente en el retenido de la membrana de mayor corte, pero la lignina y los grupos acetilo pasarían al permeado. En el ensayo se logró separar parcialmente las hemicelulosas de los grupos acetilos. Sin embargo, el hecho de no lograr separar las hemicelulosas de los grupos fenólicos ni del total de grupos acetilos, es otra evidencia que, en el licor obtenido de la extracción alcalina, las hemicelulosas están unidas químicamente a la lignina y por ello es tan difícil su separación. En el trabajo de Krawczyk *et al.* (Krawczyk, Arkell and Jönsson, 2013) con el licor obtenido de una extracción alcalina sobre salvado de trigo, reportaron resultados similares, los carbohidratos

permanecieron en el retenido de la membrana de ultrafiltración al igual que la lignina presente, pero lograron separar el hidróxido de sodio, que paso casi completamente al permeado.

14.4.6. Experiencia alcalino g)

Esta experiencia se realizó con el licor diluido 1/10 y con el pH=7 y tuvo dos objetivos. El primero, es mediante el aumento de la temperatura del ensayo, aumentar el flujo de permeado. Para ello se trabajó a 50 °C con el sistema sumergido en un baño de agua y a 8 Kg/cm². Se aumentó la temperatura sólo hasta 50 °C con el objetivo de no degradar las hemicelulosas, ni dañar la membrana, cuya temperatura máxima de trabajo es de 90 °C. Una vez que se constató el flujo de filtrado aumentaba con la temperatura, se trabajó hasta un VRF mayor, de forma de analizar si con ello se lograba aumentar la separación de los xilosacáridos de los compuestos fenólicos o de los compuestos acetilos.

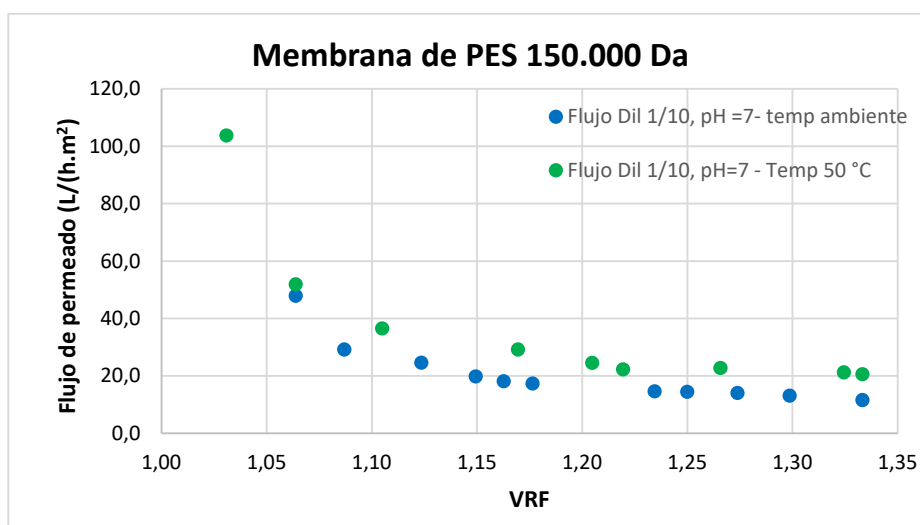


Figura 14-16. Flujo de permeado trabajando con el licor diluido 1/10 y a pH=7 a dos temperaturas: temp. ambiente (aprox. 20 °C) y T=50 °C.

Como es de esperar, al aumentar la temperatura el flujo de permeado se incrementa, ya que la viscosidad de la solución es menor y por ende baja el coeficiente de transferencia de masa entre el seno de la solución y la superficie de la membrana (Pritchard, Howell and Field, 1995; Krawczyk, Arkell and Jönsson, 2011). En las condiciones de trabajo utilizadas, el aumento de flujo fue del orden de 40 %, por lo que se considera que la temperatura de trabajo es una variable importante a tener en cuenta.

Al analizar las soluciones de permeado y retenido trabajando hasta VRF distintos, se constatan, como era de esperarse, diferencias en las soluciones para distintos VRF, los balances de masa de estos ensayos se muestran en la Figura 14-17.

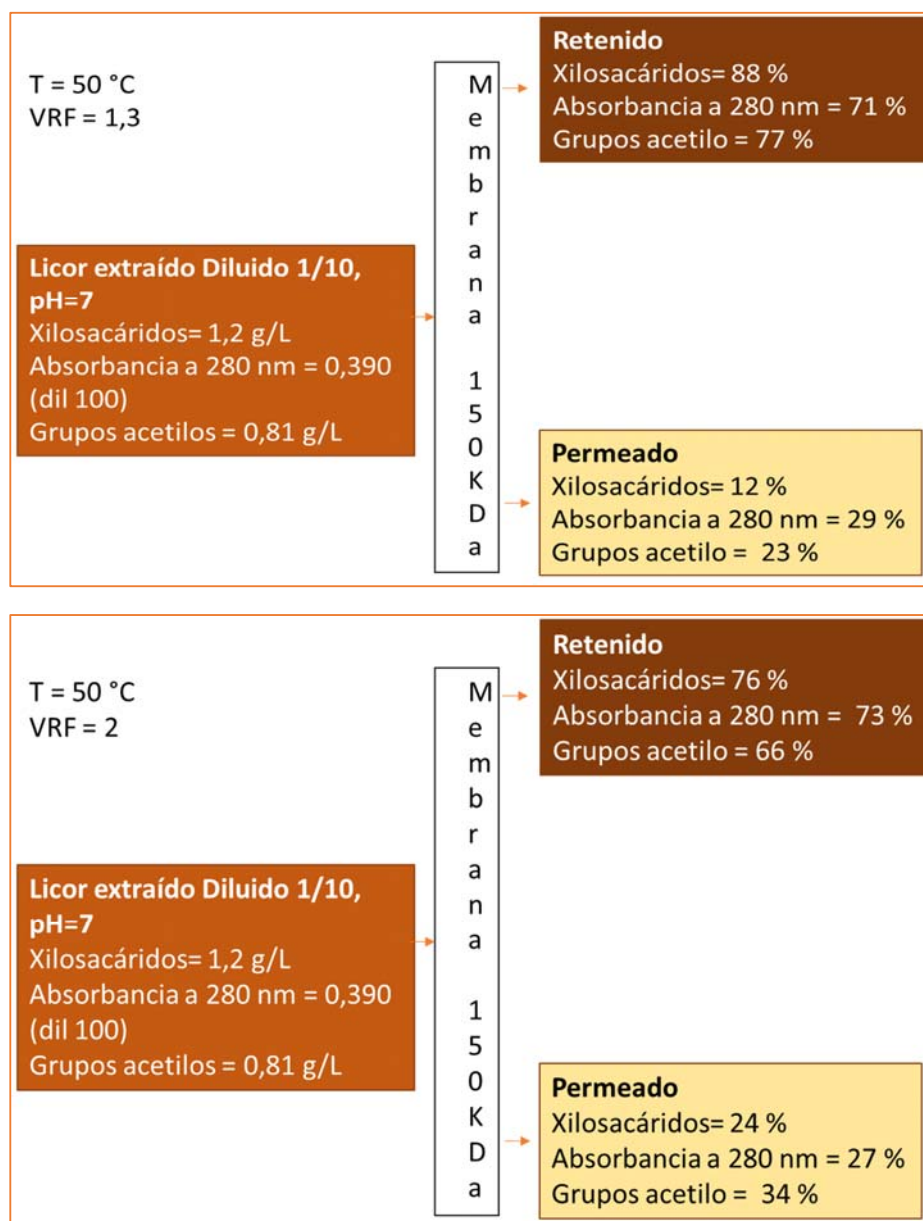


Figura 14-17. Balance de masa de los ensayos efectuados hasta distintos VRF con el licor diluido 1/10, a 50 °C y a pH=7.

Trabajando hasta un VRF menor (menos flujo de permeado), los xilosacáridos se mantienen en el retenido en mayor porcentaje, es decir comienzan a pasar al permeado luego de que la solución se concentra en ellos. Lo mismo sucede para los grupos acetilos. Sin embargo, los compuestos fenólicos pasan en la misma extensión al permeado para ambos VRF. No obstante, en ninguno de los casos se logra separación efectiva de los xilosacáridos de los compuestos fenólicos o de los grupos acetilos.

14.4.7. Experiencia alcalino h)

Como última instancia del trabajo con el licor alcalino, se implementaron todas las modificaciones realizadas previamente que resultaron en una mejora del flujo de permeado y se trabajó con una membrana de menor corte. Para esto se utilizó una membrana de PESH de 50.000 Da y licor diluido a 1/10 a pH =7 a 50 °C de temperatura y 8 kg/cm² de presión. La Figura 14-18 muestra el flujo de permeado obtenido en estas condiciones.

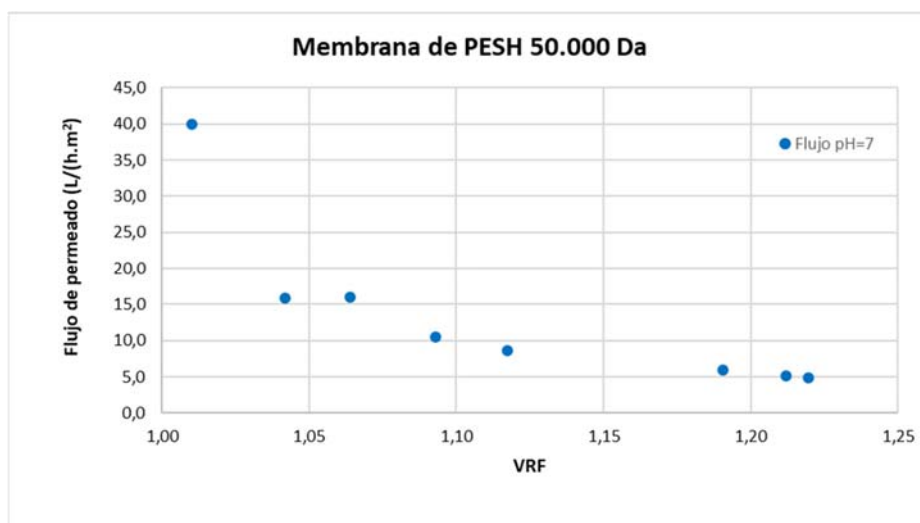


Figura 14-18. Flujo de permeado con la membrana de PESH de 50.000 Da de corte nominal. Se utilizó licor alcalino diluido 1/10, a pH =7 y se realizó el ensayo a 50 °C.

El flujo de permeado continuó siendo bajo para las recomendaciones del fabricante, pero sin embargo fue del mismo orden que el obtenido para membranas de mayor corte.

Hubo diferencias visuales significativas entre el permeado y el retenido como se puede ver en la parte superior de la Figura 14-19. Al realizar los análisis químicos correspondientes se pudo apreciar que la concentración de los xilosacáridos en el retenido aumentó significativamente, pasando de 1,2 g/L a 9,5 g/L, lo cual es importante. En el balance de masa, los xilosacáridos quedaron alrededor del 60 % en el retenido y un 40 % pasó al permeado, mientras que los grupos acetilos quedaron casi en un 70 % en el retenido. Por su parte los compuestos fenólicos, quedaron mayoritariamente en el retenido.

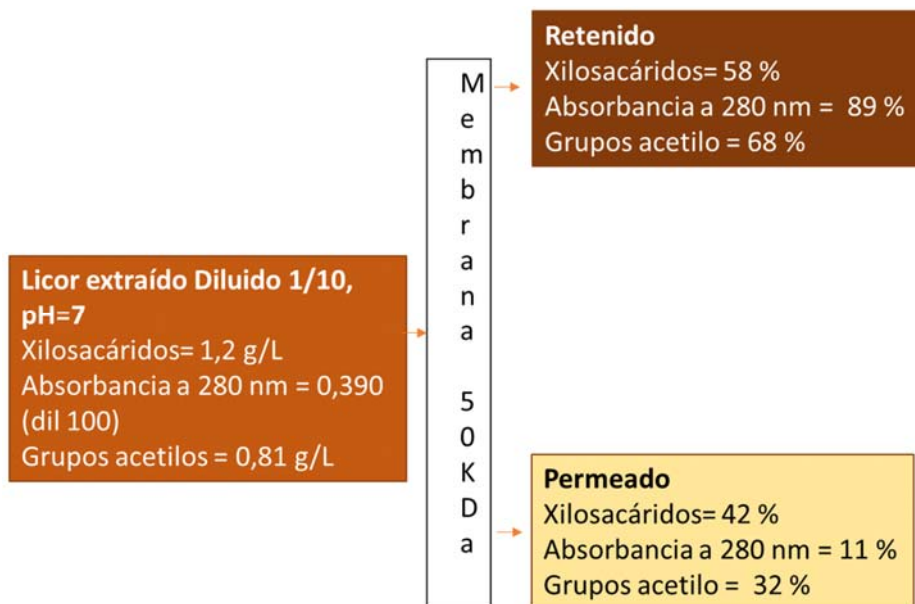


Figura 14-19. Parte superior: Retenido y permeado de la membrana de PESH de 50.000 Da. Condiciones: licor diluido 1/10, pH=7., 50 °C. Parte inferior: Balance de masa del retenido y permeado en esas condiciones de trabajo.

En un ensayo posterior, donde se trabajó hasta un VRF de 1,85, pensando que al aumentar el volumen de permeado podría aumentar la fracción de xilosacáridos en este, se obtuvo un 82 % de los xilosacáridos en el retenido, por lo que se descartó también esta estrategia.

14.4.8. Purificación con membranas de los precipitados obtenidos al agregar etanol al licor alcalino

Otra estrategia utilizada en este trabajo fue intentar purificar los precipitados obtenidos a partir de los licores alcalinos. Para ello, el extracto alcalino cuya composición se muestra en la Tabla 14-2 se llevó a pH = 7 con ácido clorhídrico, se centrifugó a 3000g durante 20 minutos para separar el precipitado formado y al sobrenadante se agregó 1 volumen de etanol de acuerdo con lo discutido en el capítulo de “Precipitación con solventes en licores provenientes de tratamientos alcalinos”. El precipitado obtenido fue disuelto en hidróxido de sodio 0,1 M y la solución resultante (de aquí en adelante “solución del precipitado”) fue sometida a los diferentes ensayos con membranas de micro y ultrafiltración que se desarrollarán y discutirán a

continuación. La Figura 14-20 muestra el esquema de precipitación y redisolución realizado, mientras que las características químicas de la solución obtenida se muestran en la Tabla 14-3.

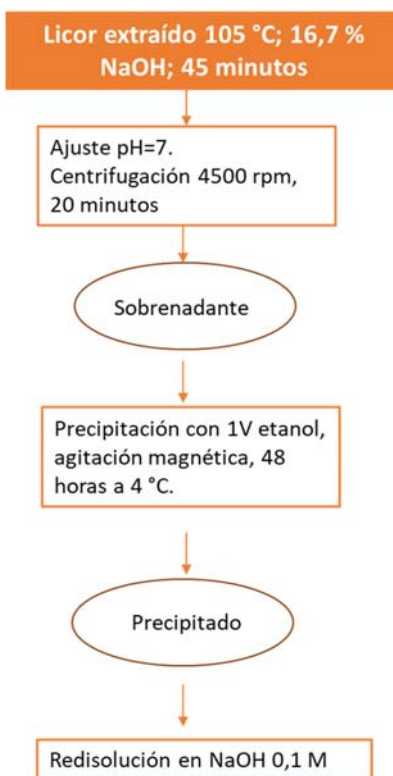


Figura 14-20. Esquema de precipitación y redisolución de los xilosacáridos presentes en el licor alcalino.

Tabla 14-3. Características de la solución obtenida por redisolución del precipitado.

Solución obtenida a partir de la redisolución en NaOH del precipitado conseguido al agregar etanol al licor extraído en condiciones alcalinas	
Sólidos disueltos en el extracto (g/L)	29,6 ± 0,2
pH	12,4 ± 0,1
Xilosacáridos (g/L)	0,93 ± 0,02
Grupos acetilos (g/L)	0,22 ± 0,09
Absorbancia a 280nm (dilución 1/50)	0,180 ± 0,003
Mw (Da)	16.860 ± 30

Ensayo P1)

Para este ensayo se utilizaron membranas de ultrafiltración de polietersufona (PES) de 10.000 Da y de PESH de 50.000 Da; ambas membranas son de la marca Microdyn-Nadir.

En primera instancia se colocaron 160 mL de la solución en la celda de acero inoxidable que contenía la membrana de 50.000 Da y se aplicaron 8 bar de presión durante 250 minutos (VRF = 2,7). El permeado obtenido en este ensayo se filtró utilizando la membrana de 10.000 Da, hasta un VRF= 2.0, para tener disponibilidad de solución para los análisis. La Figura 14-21 muestra un esquema del trabajo realizado en este ensayo.

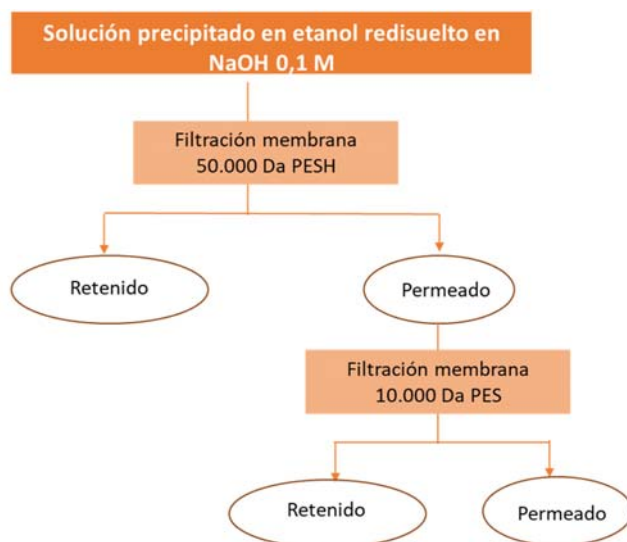


Figura 14-21. Etapas de la filtración con membranas del ensayo P1.

La Figura 14-22 muestra como varía el flujo de filtrado y la Permeabilidad de la membrana en función del VRF trabajando con la membrana de 50.000 Da. El fabricante informa un valor de permeabilidad mayor de 85 L / (h m² bar) como adecuado (Microdyn-Nadir, no date).

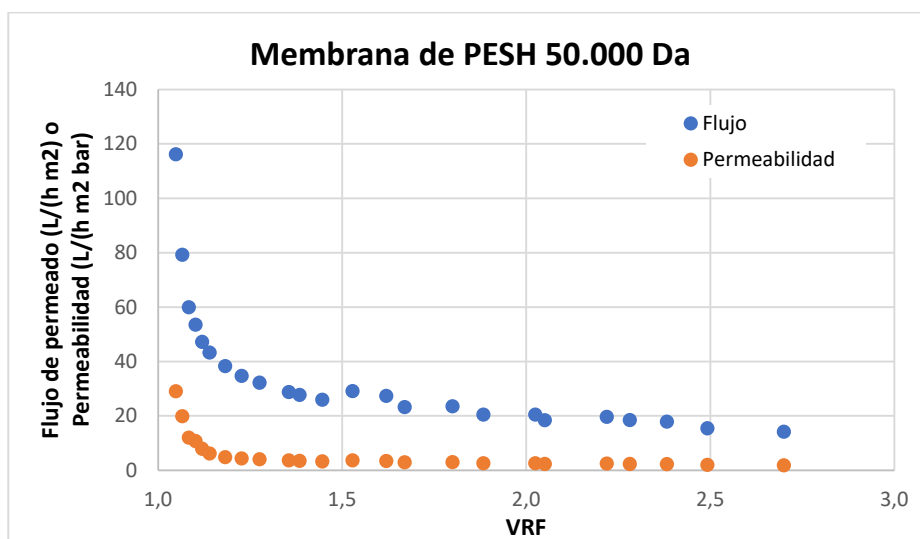


Figura 14-22. Flujo y permeabilidad de la solución del precipitado en función del factor de reducción de volumen para la membrana de PESH de 50.000Da.

A excepción de los primeros minutos donde se logra obtener un flujo (y permeabilidad) aceptables de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, estos luego descienden paulatinamente hasta un flujo de 14 L / (h m²) y una permeabilidad de 2 L / (h m² bar). Aquí también se observa que los problemas de ensuciamiento y/o de formación de una capa secundaria por fenómenos electrostáticos, se dan en los primeros minutos de filtración.

Al filtrar el permeado de la membrana de 50.000 Da por la membrana de PES de 10.000 Da a una presión de 2 bar se obtiene el gráfico de la Figura 14-23, donde la permeabilidad y flujo de filtrado están en regiones aceptables de utilización a mayor escala.

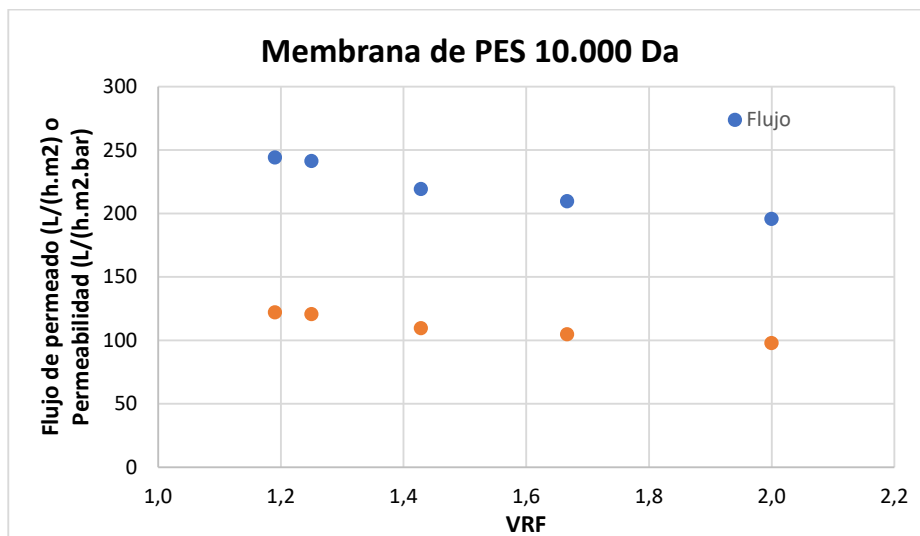


Figura 14-23. Flujo y permeabilidad de la solución del precipitado en función del factor de reducción de volumen para la membrana de PES de 10.000Da.



Figura 14-24. A la izquierda, retenido y permeado de la membrana de 50.000 Da. A la derecha retenido y permeado de la membrana de 10.000 Da.

Como se puede observar en la Figura 14-24, la solución retenida en la membrana de 50.000 Da presenta un color oscuro, y es visualmente diferente a la solución de permeado por la misma membrana. Sin embargo, no se observan diferencias entre el aspecto del permeado y retenido obtenidos al filtrar por la membrana de 10.000 Da la solución proveniente del permeado de 50.000 Da.

Nuevamente las hemicelulosas quedaron presentes mayoritariamente en el retenido de la membrana de mayor corte (Figura 14-25). Sin embargo, nuevamente la lignina quedó retenida en la misma solución. En el ensayo con la membrana de 10.000 Da se vuelve a ver la misma tendencia, no lográndose la separación de los compuestos fenólicos de los xilosacáridos,

inclusive para la fracción de menor peso molecular, que es permeable a la membrana de 50.000 Da.

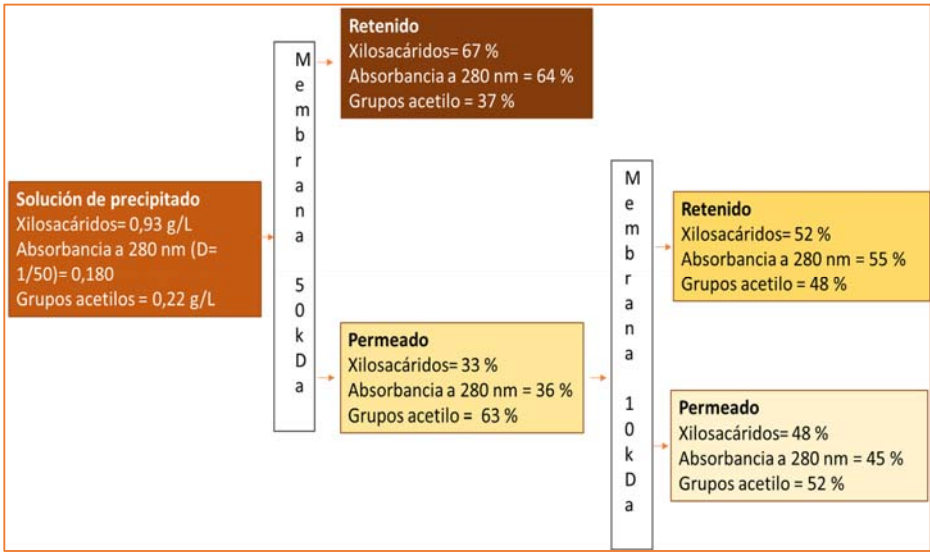


Figura 14-25. Distribución de los xilosacáridos, absorbancia a 280 nm y grupos acetilos en las distintas etapas del filtrado con membranas de 50.000 Da y 10.000 Da.

En el trabajo de Jönsson *et al.* (Jönsson, Nordin and Wallberg, 2008) utilizaron licor negro industrial de pulpeo kraft de maderas de fibra larga y fibra corta (no se aclara la especie) y trabajaron con membranas de ultrafiltración de 100.000 Da de PVDF y de 20.000 Da de polisulfonas (PS). Para el caso del licor de fibra corta reportaron una retención del 82% para las hemicelulosas y de 30% para la lignina en la membrana de 100.000 Da; mientras que en la membrana de 20.000 Da reportaron una retención de 90 y 30% respectivamente. Como fue mencionado previamente, en este trabajo los compuestos de hemicelulosas y lignina factiblemente estén más degradados que en nuestro trabajo, y se hayan roto los complejos lignina-carbohidratos, dado que en el tratamiento industrial las condiciones de extracción son más severas.

El peso molecular de las distintas fracciones separadas por las membranas se muestra en la Tabla 14-4.

Tabla 14-4. Distribución de pesos moleculares de las distintas fracciones de permeado y retenido. Los datos en la columna representada por el símbolo de numeral (#) indica si el valor para las condiciones dadas se refiere a considerar todos los picos del cromatograma (Total) o cada pico individualmente.

Fracción analizada	Distribución de pesos moleculares		
	#	Mw (Da)	%
Solución de precipitado	Total	16860	
	1	43899	10,0
	2	24378	47,8
	3	1930	42,2
Retenido membrana 50.000 Da	Total	12403	
	1	26711	42
	2	1982	58
Permeado membrana 50.000 Da	Total	1295	
	1	1295	100
Retenido membrana 10.000 Da	Total	1327	
	1	1327	100
Permeado membrana 10.000 Da	Total	1392	
	1	1392	100

Como se ve en la Tabla 14-4, al filtrar por membranas no se aprecia el pico de mayor tamaño de 43899 Da. Más allá de ese pico, que no se observa frecuentemente, pero sí se observó en esta solución de precipitado, en el retenido de 50.000 Da quedan retenidas las especies de mayor peso molecular (24378 Da), a pesar de que el peso molecular ponderado de este retenido es menor que en la solución previo a pasar por la membrana. El pico en 24378 Da representa el 42 % del área, mientras que el pico de bajo peso molecular (1958 Da) representa el 58 % del área. Esta experiencia se realizó hasta un VRF=2,7, queda la interrogante si, se hubiera concentrado más, es decir hasta un VRF mayor, se hubiera logrado una mayor permeado de las especies que generan el pico en 1958 Da y de esta forma concentrar en las especies de mayor tamaño. El permeado a 50.000 Da solo muestra un pico a 1295 Da, que es similar a los picos en el retenido y permeado de la membrana de 10.000 Da. Puede verse de la distribución de especies en la Figura 14-25 y la distribución de pesos moleculares de la Tabla 14-4 que la membrana de 10.000 Da no fue de utilidad ya que no hay diferencias entre las especies en el retenido y permeado.

Ensayo P2)

De acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo anterior, se buscó en este ensayo comenzar con una membrana de mayor corte, de forma de intentar separar las hemicelulosas de la lignina. Posteriormente se filtraron las corrientes de retenido y permeado obtenidos, de forma de purificar las corrientes obtenidas.

Para este ensayo se utilizó una membrana de ultrafiltración de polietersufona (PES) de 150.000 Da de la marca Microdyn-Nadir y una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de la marca Synder, de 70.000 Da de corte.

En primera instancia se colocaron 150 mL de la solución en la celda de acero inoxidable que contenía la membrana de 150.000 Da y se aplicaron 8 bar de presión durante 290 minutos (VRF = 3,1). Tanto el permeado como el retenido de este ensayo se filtraron por membranas de 70.000 Da, el permeado hasta un VRF de 3,3 y el retenido hasta un VRF de 2, para poder tener muestra para los análisis de todas las fracciones separadas. La Figura 14-26 muestra un esquema del trabajo realizado en este ensayo.

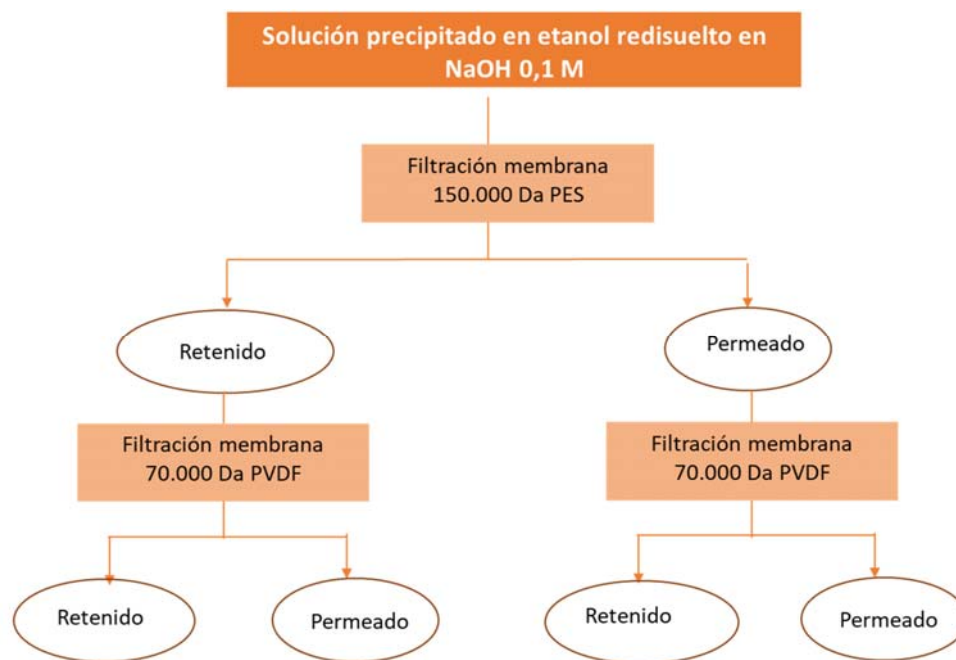


Figura 14-26. Etapas de la filtración con membranas del ensayo P2.

La Figura 14-27 muestra como varía el flujo de filtrado y la Permeabilidad de la membrana en función del VRF trabajando con la membrana de 150.000 Da. El fabricante informa un valor de permeabilidad mayor de 285 L / (h m² bar) como adecuado (Microdyn-Nadir, no date).

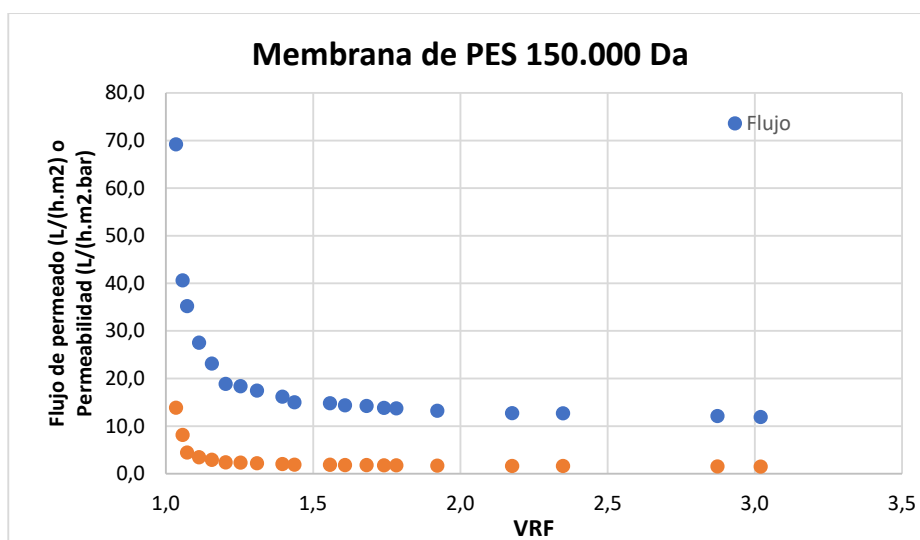


Figura 14-27. Flujo y permeabilidad de la solución del precipitado en función del factor de reducción de volumen para la membrana de PES de 150.000Da. P = 8 bar.

Nuevamente se puede observar la misma tendencia que en los casos anteriores, un flujo mayor al principio y que en los primeros minutos baja abruptamente. El flujo inicial, en este caso, es menor a la recomendación del fabricante y menor que el obtenido con la membrana de 50.000

Da, hecho que en principio no se esperaría. Sin embargo, existen antecedentes de este tipo de comportamiento. Al-Rudainy *et al.* (Al-Rudainy, Galbe and Wallberg, 2017) reportaron flujos un poco superiores trabajando a 8 bar con licores de pulpeo termomecánico de madera de abeto, con un sistema de membranas de flujo cruzado y utilizando membranas de Polisulfonas (PS) de 50.000 y 100.000 Da. Encontraron también que el flujo con la membrana de menor corte era un poco superior a la de mayor corte. El contenido de hemicelulosas (mayoritariamente galactoglucomanos) fue de 5,5 g/L y de lignina de 31,4 g/L en el licor utilizado. Krawczyk y Jönsson (Krawczyk and Jönsson, 2011) observaron el mismo fenómeno en el que, un aumento en el tamaño de poro de la membrana condujo a la disminución del flujo de permeado. Atribuyeron este fenómeno al ensuciamiento irreversible de las membranas con el tamaño de poro más grande, donde las partículas pueden ingresar mejor y quedar adheridas dentro del poro.

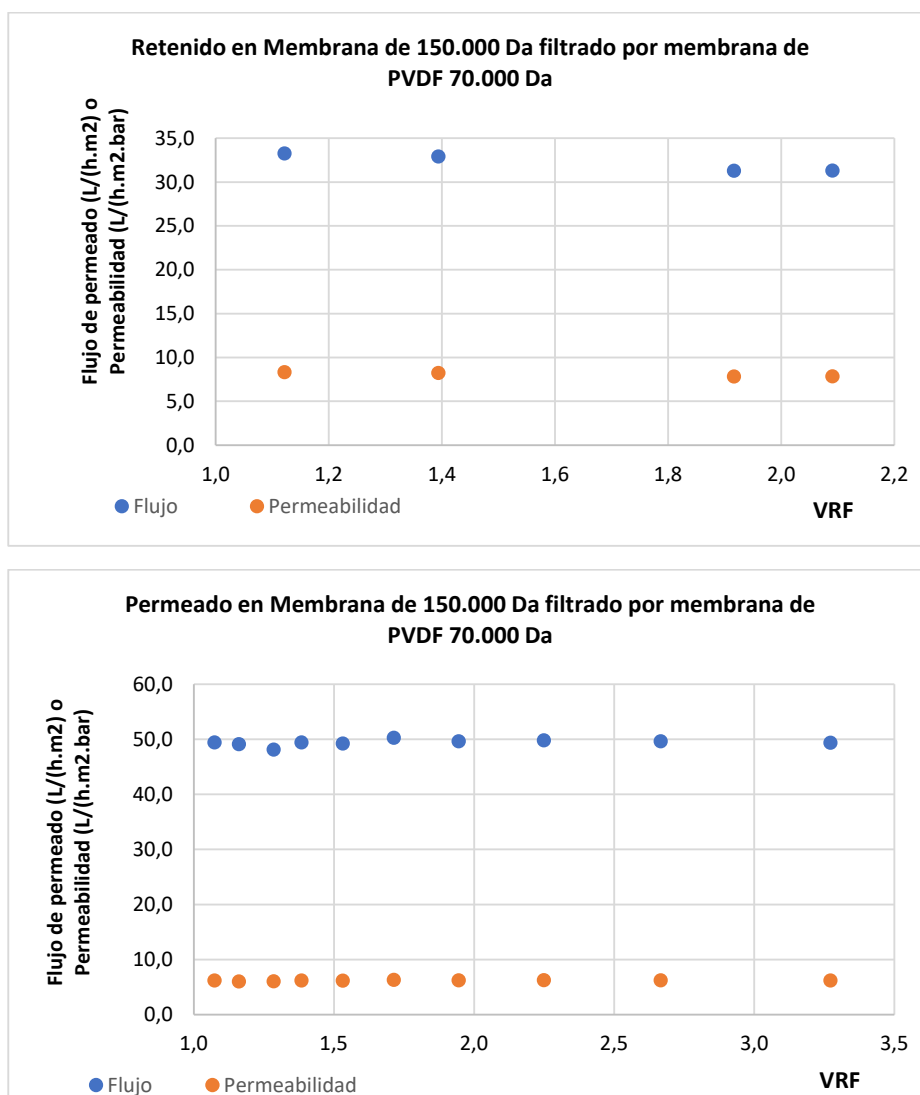


Figura 14-28. Flujo y permeabilidad de la solución del precipitado en función del factor de reducción de volumen para la membrana de PVDF de 70.000 Da. En la parte superior corresponde a los valores de utilizar la solución retenida en la membrana de 150.000 Da a P = 6 bar. En la parte inferior, corresponde a la solución permeada en la membrana de 150.000 Da a P = 6 bar.

En el caso de la membrana de PVDF, las dos fracciones filtradas presentaron un flujo y permeabilidad bajas pero constantes al largo del ensayo.

En la Figura 14-29 se pueden observar las distintas soluciones de permeado y retenido obtenidas, así como el aspecto de los sólidos obtenidos luego de secar estas soluciones a 40 °C. Es claro que la fracción de sólidos disueltos del hidróxido de sodio agregado, atravesaron las membranas en gran extensión. Es claro también, que las hemicelulosas continúan de color oscuro, lo que es indicativo de su contaminación con compuestos fenólicos.

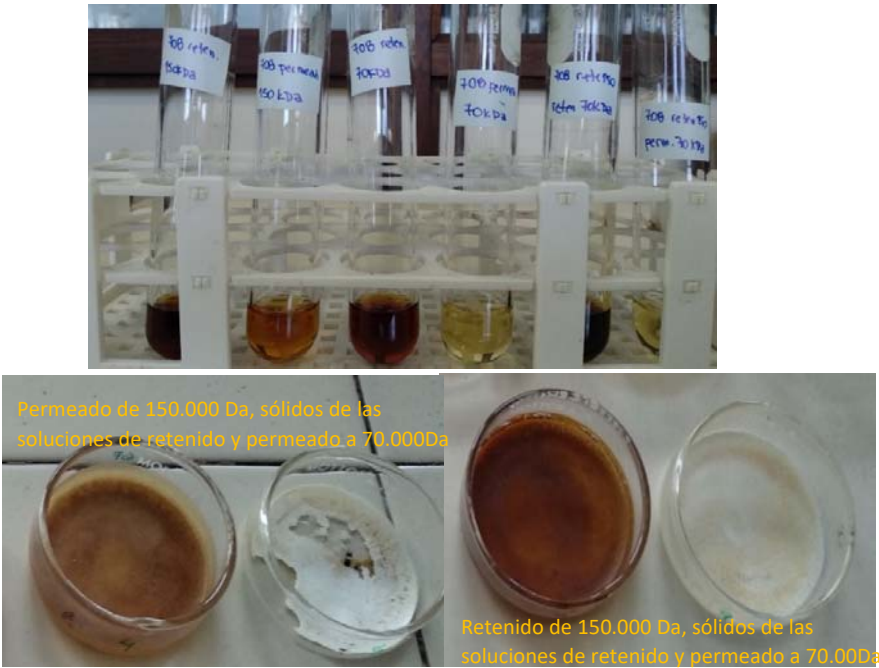


Figura 14-29. Arriba soluciones de retenido y permeado de las distintas membranas. Abajo sólidos secos (a 40 °C) de las soluciones de retenido y permeado de la membrana de 70.000 Da.

La Figura 14-30 muestra la distribución de xilosacáridos, grupos acetilo y absorbancia en las distintas fracciones obtenidas.

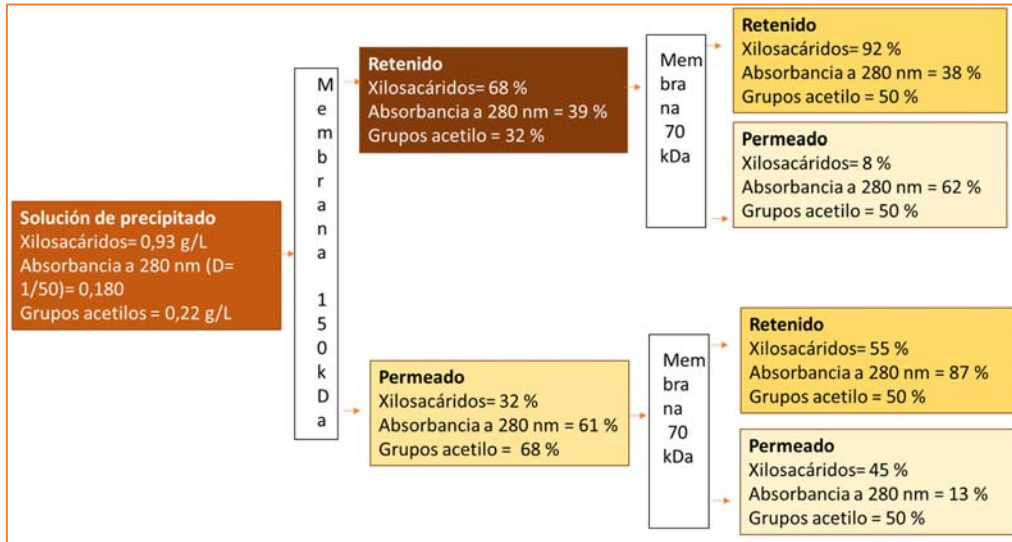


Figura 14-30. Distribución de los xilosacáridos, absorbancia a 280 nm y grupos acetilos en las distintas etapas del filtrado con membranas de 150.000 Da y 70.000 Da.

Trabajando con un corte un poco mayor al usado en el ensayo anterior, 150.000 Da en lugar de 50.000 Da y con un VRF levemente mayor (3,0 frente a 2,7) se logró, en esta instancia, separar parcialmente la fracción de xilosacáridos de la compuestos fenólicos y grupos acetilos. La filtración por la membrana de 70.000 Da del retenido en 150.000 Da, permitió incluso obtener con un retenido más concentrado en xilosacáridos (3,9 g/L frente a 0,93 g/L inicialmente) y más purificado en estos compuestos. De todas formas, puede constatar, que las soluciones de retenido en 150.000 Da y en 70.000 Da, que son las más ricas en hemicelulosas, son las más oscuras de las soluciones obtenidas.

La diferencia entre ensayo y el reportado en el ensayo anterior se basó únicamente en utilizar membranas de mayor corte al principio, y en filtrar por una membrana de un corte un poco menor el retenido en la membrana de mayor corte, de forma de enriquecer la solución retenida en esta membrana en xilosacáridos. Como puede observarse por los resultados obtenidos, esta resultó ser una buena estrategia. Queda ahora la interrogante de si la fracción de lignina que permanece junto a la fracción retenida en 150.00 Da y a su vez retenida en 70.000 Da, es parte de complejos lignina-carbohidratos o simplemente con continuar el ensayo hasta VRF mayores, se lograría separar.

Jönsson *et al.* (Jönsson, Nordin and Wallberg, 2008) en el trabajo previamente mencionado con licor negro (Kraft) industrial de maderas de fibra larga y fibra corta, mencionan que al establecer las condiciones de funcionamiento de tal manera que haya una marcada diferencia en la retención de lignina y hemicelulosas, es posible obtener un permeado con un alto contenido de lignina y solo una pequeña cantidad de hemicelulosas, y un retenido concentrado de hemicelulosas y con una baja concentración en lignina. En el trabajo de Al-Rudainy *et al.* mencionado (Al-Rudainy, Galbe and Wallberg, 2017) la retención de hemicelulosas es también mayor trabajando a 100.000 Da que ha 50.000 Da.

La Tabla 14-5 muestra la distribución de los pesos moleculares obtenidos en las distintas fracciones.

Tabla 14-5. Distribución de pesos moleculares de las distintas fracciones de permeado y retenido. Los datos en la columna representada por el símbolo de numeral (#) indica si el valor para las condiciones dadas se refiere a considerar todos los picos del cromatograma (Total) o cada pico individualmente. En los casos que se indica 100 en la columna % es porque el cromatograma presentó un solo pico.

Fracción analizada	Distribución de pesos moleculares		
	#	Mw (Da)	%
Solución de precipitado	Total	16860	
	1	43899	10,0
	2	24378	47,8
	3	1930	42,2
Retenido membrana 150.000 Da	Total	15414	
	1	23284	63,5
	2	1732	36,5
Permeado membrana 150.000 Da	Total	5122	
	1	20636	19,5
	2	1360	80,5
Retenido membrana 70.000 Da (de fracción retenida en 150.000 Da)	Total	14150	
	1	23780	56,1
	2	1840	43,9
Permeado membrana 70.000 Da (de fracción retenida en 150.000 Da)	No hay picos		
Retenido membrana 70.000 Da (de fracción permeada en 150.000 Da)	Total	745	
	1	745	100
Permeado membrana 70.000 Da (de fracción permeada en 150.000 Da)	No hay picos		

El peso molecular promedio del retenido a 150.000 Da fue apenas menor que la solución de partida ya que no está presente en este retenido la fracción mayor de 40.000 Da; sin embargo, este retenido está enriquecido en el pico de alrededor de 23.000 Da. De forma inversa, el permeado de 150.000 Da está enriquecido en los compuestos de menor peso molecular (1300 Da) y ha disminuido la proporción del pico a 20.000 Da. No obstante, al pasar por la membrana de 70.000 Da el retenido de la membrana de 150.000 Da, no se logró concentrar la fracción de mayor peso molecular, aunque sí los xilosacáridos, de acuerdo a lo visto en la Figura 14-30.

Ensayo P3)

Para este ensayo se previó remover los grupos acetilos y fenólicos utilizando acetato de etilo para ello. La diagramación del ensayo se basó en experiencia previa (Cebreiros, Guigou and Cabrera, 2017) donde se trabajó con el líquido proveniente de la extracción con licor verde de chips de *Eucalyptus grandis* y en los trabajos de Cruz *et al.* (Cruz *et al.*, 1999; Garrote *et al.*, 2008) quienes utilizaron licores provenientes de tratamientos hidrotérmicos sobre chips de eucalipto. Se realizaron 3 etapas de extracción con una relación 1:1 de solución a extraer: acetato de etilo. En cada etapa de extracción, se efectuó una agitación magnética a 150 rpm durante 20 minutos y se dejó separar en bola de decantación durante 30 minutos. Se ensayaron dos condiciones de pH: pH original de la solución de precipitado (pH=12,4) y ajuste de la solución a pH=3,0, de acuerdo con lo visto en la bibliografía.

La Figura 14-31 muestra una imagen del ensayo al momento de finalizar la separación de la primera etapa de extracción. A la izquierda el ensayo realizado al pH de la solución (12,4), donde

no hubo extracción de compuestos a la fase orgánica (superior), hecho que se constata visualmente (además de con los análisis efectuados). Sobre el lado derecho de la figura se muestra el ensayo a pH 3,0.



Figura 14-31. Extracción con acetato de etilo de las soluciones de precipitado, a la izquierda extracción a pH original de la solución (pH=12,4) y a la derecha extracción con el pH de la solución ajustado a 3,0.

La solución final, luego de las tres etapas de extracción con acetato de etilo presenta las características mostradas en la Tabla 14-6.

Tabla 14-6. Características de la solución obtenida luego de las extracciones con acetato de etilo.

Solución obtenida a partir de la redisolución en NaOH del precipitado conseguido al agregar etanol al licor extraído en condiciones alcalinas	
pH	$3,0 \pm 0,1$
Xilosacáridos (g/L)	$0,78 \pm 0,02$
Grupos acetilos (g/L)	No detectable
Absorbancia a 280nm (dilución 1/50)	$0,117 \pm 0,003$

De esta forma se remueve con el ensayo de extracción con acetato de etilo el 100 % de los grupos acetilos, 35 % de los grupos fenólicos y se pierden 16 % de los xilosacáridos presentes. La eficiencia de extracción de grupos fenólicos es bastante menor que las reportadas en trabajos con acetato de etilo, pero sobre licores de tratamiento hidrotérmico, donde se reportan eficiencias de extracción superiores al 80 % (Cruz *et al.*, 1999; Egüés *et al.*, 2012).

El extracto acuoso obtenido se colocó en la celda agitada y utilizando la membrana de PES de 150.000, se aplicaron 7 bar de presión monitoreándose el tiempo y volumen de permeado hasta un VRF= 3,6. En la Figura 14-32 se muestra la variación de flujo y permeabilidad del ensayo en función del VRF. Se grafican los datos juntos a los del ensayo p2) de forma de poder apreciar las diferencias. En la primer gráfica, es notorio que al comienzo de la filtración, el flujo fue mucho mayor que en la filtración sin extracción L-L, pero con el paso del tiempo, este flujo bajó significativamente y aunque fue siempre un poco mayor que en el caso de la solución sin extraer, las diferencias no fueron relevantes (por ejemplo, para un VRF=3,0, el flujo de permeado de la solución sin extraer fue de 12 L/(h m²) y de 19 L/(h m²) para la solución obtenida luego de la extracción con acetato de etilo. Este comportamiento fue reportado por Koivula *et al.* (Koivula *et al.*, 2011), quienes observaron la misma tendencia trabajando con extracción L-L con acetato de etilo, pero sobre licores hidrotérmicos de abedul y abeto y con membranas de PS de 5000 y 10.000 Da de corte. Indicaron que este comportamiento puede deberse a que el acetato de etilo,

que es ligeramente soluble en agua, pudo no haberse eliminado por completo antes de la filtración, y podría haberse filtrado al comienzo, aumentando el flujo. Cabe mencionar que la solución acuosa que se colocó en la celda de filtración presentaba olor a acetato de etilo.

En la filtración por 70.000 Da del retenido en la membrana de 150.000 Da (Figura 14-32 b), el flujo y permeabilidad de la solución proveniente de la extracción con acetato de etilo fue un poco menor que el filtrado de la solución sin extraer, por lo que no se observa una mejora por la extracción líquido-líquido. En este ensayo se trabajó con 8 bar de presión.

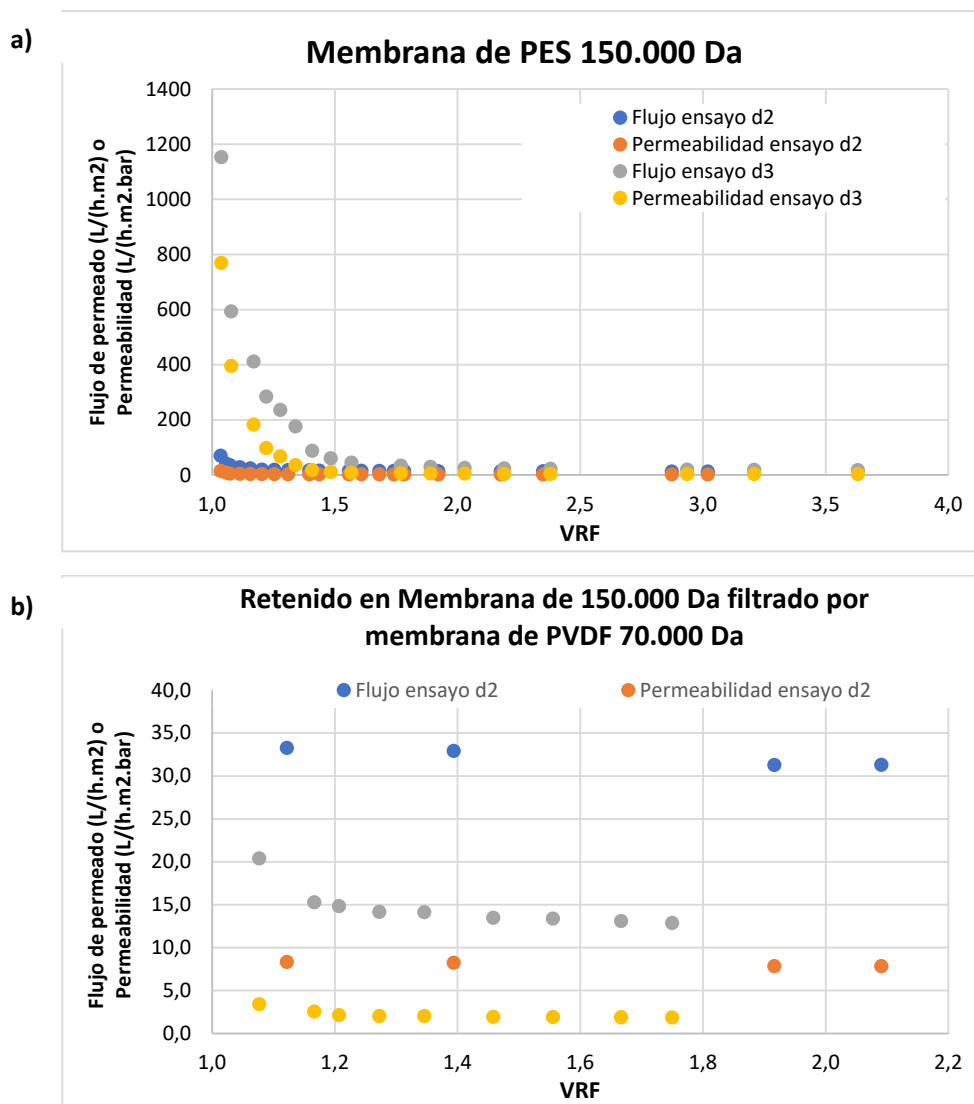


Figura 14-32. Flujo y permeabilidad de la solución del precipitado con y sin extracción con acetato de etilo, en función del factor de reducción de volumen. a) para la membrana de PES de 150.000Da b) retenido en la membrana de 150.000 Da filtrado por la membrana de PVDF de 70.000 Da.

No se detectan grupos acetilos posterior a la extracción con acetato de etilo, hecho que es esperable y esta reportado ampliamente (Park, Moon and Um, 2013; Cebreiros, Guigou and Cabrera, 2017).

En este caso, la recuperación de xilosacáridos en el retenido de la membrana de 150.000 Da es un poco inferior que en el caso de la solución sin extraer con acetato de etilo y la fracción de polifenoles que queda en el retenido es mayor. Sin embargo, el valor de absorbancia en la solución de retenido de 150.000 Da de la solución extraída con acetato de etilo, es similar al valor de absorbancia de la fracción análoga en el ensayo sin extraer. De esta forma, se puede decir que los compuestos fenólicos que son extraídos con acetato de etilo, no corresponden a la fracción que queda retenida en la membrana de mayor corte, otro hecho que infiere que las fracciones de xilosacáridos de mayor peso molecular están químicamente unidas con los compuestos fenólicos provenientes de la lignina.

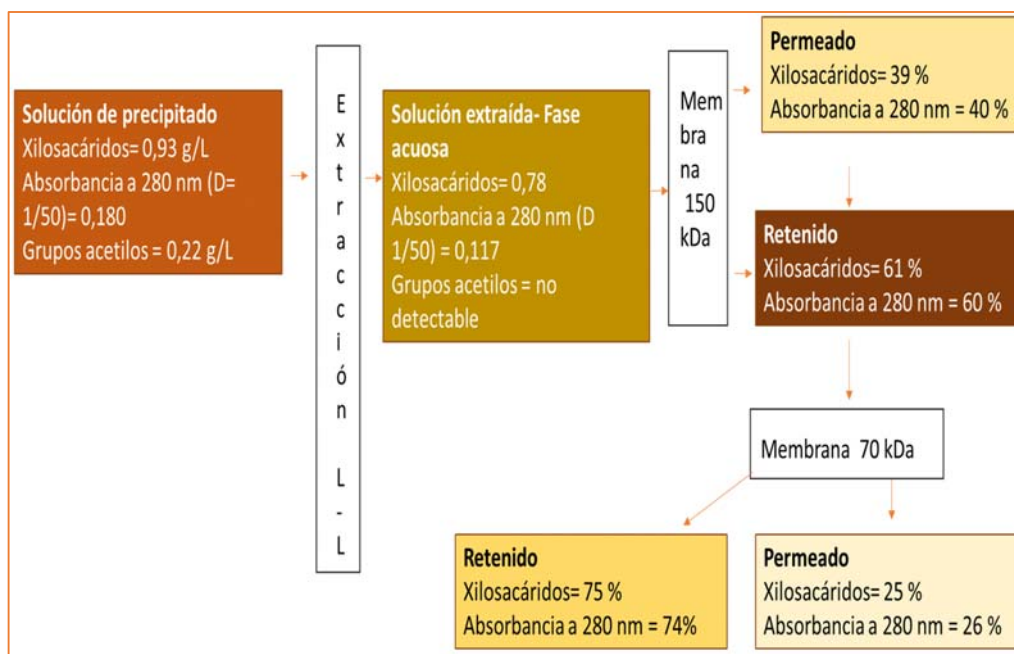


Figura 14-33. Distribución de los xilosacáridos, absorbancia a 280 nm y grupos acetilos en las distintas etapas del filtrado con membranas de 150.000 Da y 70.000 Da luego de la extracción L-L con acetato de etilo.

La utilización de una membrana de menor corte no produjo ninguna separación adicional en la purificación de los xilosacáridos.

La extracción con acetato de etilo previo a la separación por membranas se entiende que no produjo mejoras en la separación de xilosacáridos e incorpora una etapa que complejiza el proceso.

14.5. Conclusiones

Se ensayaron diferentes estrategias con membranas de micro y ultrafiltración para la concentración y purificación de licores de eucalipto provenientes de tratamientos de explosión a vapor y alcalino.

Para el caso del tratamiento de explosión de vapor se trabajó con membranas de PESH y PES de cortes nominales 50.000 y 10.000 Da. La filtración del licor directamente por membranas de 10.000 Da fue prácticamente imposible. Por ello se prefiltró por una membrana de 50.000 Da y el permeado de esa membrana se filtró por la membrana de 10.000 Da. Esta estrategia mejoró sensiblemente el flujo de permeado obteniendo, siendo aún más bajo que el recomendado por el fabricante y el obtenido por otros autores, pero comparable con el de otros autores que trabajaron en condiciones similares de área de filtrado y concentración de licor, con otras especies de biomasa. La estrategia de purificar el licor con resinas de intercambio aniónico fue muy efectiva para aumentar la velocidad de flujo de permeado.

Respecto a la purificación de los xilosacáridos del licor de explosión de vapor, no fue posible separar eficientemente estos compuestos de los compuestos fenólicos ni de los grupos acetilos en ninguna de las configuraciones ensayadas utilizando membranas. Los xilosacáridos junto con los demás compuestos quedaron retenidos en la membrana de 10.000 Da a pesar de que su peso molecular promedio es del orden de 350 Da.

Por otro lado, se intentó la filtración con membranas de microfiltración de los xilosacáridos extraídos por tratamiento alcalino, quienes presentaron un peso molecular promedio de alrededor de 11.500 Da. La filtración directa por membranas de 800.000 Da de PVDF fue imposible o terminó dañando severamente la membrana. Se ensayó la filtración de soluciones diluidas de licor, de forma de disminuir el efecto de la alta viscosidad, dada fundamentalmente por la alta concentración de hidróxido de sodio presente. Fue posible en este caso la filtración por membranas de 800.000 Da sin dañar la misma, pero tanto los xilosacáridos como los compuestos fenólicos quedaron en la fracción de retenido.

Se realizaron varios ensayos con el licor diluido y trabajando con membrana de PES de corte más bajo, 150.000 Da y de PESH de 50.000 corte nominal. Se comprobó que trabajar a mayor temperatura es efectivo para aumentar el flujo de permeado, aunque la fracción de xilosacáridos y demás compuestos tiene el mismo comportamiento que a temperatura ambiente. Nuevamente en este caso la fracción mayoritaria de xilosacáridos y compuestos fenólicos quedó en el retenido, lográndose una remoción un poco mayor de los grupos acetilos.

Es factible redissolver los precipitados obtenidos al agregar etanol al licor alcalino y ultrafiltrarlos con membranas de diversos cortes, pero no se obtuvieron resultados de purificación de los xilosacáridos auspiciosos para continuar el trabajo en esta línea.

CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo de Tesis se confirma que es factible lograr buenos rendimientos en la preextracción de xilosacáridos a partir de chips o residuos de eucalipto, particularmente *Eucalyptus grandis* o mezclas que contienen mayoritariamente esta especie.

Del estudio de la pre-extracción con licor verde se logró una remoción de xilosacáridos en el entorno de 2,9 a 3,5 % en base de madera seca (b.m.s) en las mejores condiciones de tratamiento, entre 155 y 160 °C durante 120-150 minutos y con una carga de licor verde de 1 o 2 %. Sin embargo, en estas condiciones se obtuvo una merma del 4 % en el rendimiento de pulpeo y una disminución de las propiedades papeleras de la pulpa producida, por lo que se consideró como una alternativa no atractiva a utilizar.

El tratamiento hidrotérmico que utilizó agua caliente permitió extraer hasta un 12 % b.m.s. de xilosacáridos, lo que implica un 80 % del contenido de xilanos en biomasa original. Maximizando la producción de xilooligosacáridos (XOS) en este trabajo y minimizando la presencia de grupos fenólicos en extracto, se logra extraer un 9,5 % b.m.s., encontrándose el 7,2 % b.m.s. como XOS. Estos valores se obtuvieron realizando el pretratamiento a 165 °C durante 60 minutos. De la distribución de pesos moleculares se observó un alto porcentaje de xilosacáridos con grado de polimerización de 10 o más en las condiciones más suaves analizadas (factor P = 295 y menores), mientras que predominó la xilosa o los xilooligosacáridos de DP > 5 en las condiciones de trabajo realizadas a mayor temperatura y tiempo de extracción (factor P = 935 y mayores). El estudio cinético confirmó las cinéticas de degradación de xilanos de orden 1. Se ensayaron dos modelos de la bibliografía y se logró un buen ajuste.

Se ensayó el pretratamiento de explosión de vapor a tres temperaturas de trabajo en el rango 180 a 200 °C. En estas condiciones se logró una remoción de entre 60 y 80 % de los xilanos presentes en la biomasa original. Dependiendo la intensidad del tratamiento, los mismos se encontraron como XOS (en las intensidades más bajas) o como monómero y XOS de bajos grados de polimerización a la mayor temperatura de trabajo.

Con los pretratamientos alcalinos se buscó extraer xilanos de alto peso molecular, que fueran factibles de ser utilizados posteriormente en la producción de biofilms o biogeles. Realizando la optimización de las condiciones experimentales, considerando como respuestas a optimizar la mayor extracción de xilosacáridos y el menor contenido de lignina en el licor, se encontró que las mejores condiciones a aplicar correspondieron a una temperatura de 105 °C y carga de soda de 16,7 % en b.m.s., no afectando significativamente el tiempo de extracción en el rango estudiado (45 a 135 minutos). En este caso, se logró remover el 2,3 % de xilosacáridos (b.m.s.), lo que corresponde al 15,6 % de los xilosacáridos presentes en la madera original. El peso molecular ponderado Mw del material precipitado con etanol fue de aproximadamente 30.000 Da, lo que indica un polímero en principio apropiado para la producción de biofilms o biogeles.

El tratamiento alcalino reforzado con peróxido de hidrógeno fue ensayado en dos rangos de condiciones, una considerada de baja-moderada carga de químicos, condiciones utilizadas para el pulpeo semiquímico, y en condiciones más fuertes de extracción dadas por mayor carga de químicos y tiempo de reacción, normalmente utilizadas para la aumentar la accesibilidad a la celulosa en un posterior tratamiento enzimático. En el primer rango de trabajo, la extracción de xilanos fue muy ineficiente, menor al 1 % b.m.s., mientras que en el segundo rango de trabajo

se lograron remociones de hasta el 6 % b.m.s., pero con cargas de soda y peróxido de hidrógeno excesivamente altas, por lo que se descartó como pretratamiento factible de ser transferido al sector productivo.

Como métodos de purificación y concentración se evaluaron la precipitación con solventes orgánicos, el uso de resinas de adsorción e intercambio iónico y las membranas de micro y ultrafiltración.

Respecto a la precipitación con solventes, la misma se ensayó en los licores provenientes del tratamiento hidrotérmico con agua caliente y el tratamiento alcalino. Se encontró que el mejor solvente a utilizar es el etanol. Para los licores provenientes de tratamiento hidrotérmico, el mayor rendimiento de precipitación se logró a pH = 5,7, utilizando 4 volúmenes de etanol por volumen de licor. El contenido de xilosacáridos en estos precipitados es de alrededor de 45-48%. Del análisis de FTIR-ATR de los precipitados se confirma la presencia de xilanos u xilooligosacáridos, contaminados por fragmentos de lignina.

Para los licores alcalinos, los mayores rendimientos de precipitación de xilosacáridos y proporción de xilosacáridos en el precipitado se lograron ajustando el pH a 7 con ácido clorhídrico y con 1 volumen de etanol. De esta forma se logra precipitar el 80 % de los xilosacáridos presentes en el licor. El contenido de xilosacáridos correspondió a alrededor del 40 % del precipitado con un Mw de 22.000 Da. Bajar el pH antes del agregado de etanol permitió la separación de una fracción de fragmentos de lignina, que de lo contrario precipitaría con el agregado de etanol. Los espectros FTIR-ATR de las condiciones seleccionadas presentaron los picos característicos de la presencia de xilosacáridos en el precipitado, aunque se observan también picos asignables a grupos fenólicos, que corresponden a fragmentos de lignina.

La utilización de resinas de adsorción y de intercambio aniónico permitió la purificación de los licores provenientes del tratamiento por explosión con vapor. Con las resinas de adsorción (XAD) se logró una alta remoción de compuestos fenólicos con baja retención de xilosacáridos. Sin embargo, presentaron mala remoción de los ácidos alifáticos presentes. Por otra parte, las resinas aniónicas fuertes presentaron una remoción admisible de compuestos fenólicos (superior al 70 %), pero baja remoción de ácidos alifáticos (menor al 40 %) y una alta retención de xilosacáridos (mayor a 20 %), por lo que fueron descartadas. Sin embargo, la resina aniónica débil utilizada arrojó muy buenos resultados en términos de remoción de compuestos fenólicos (mayor a 80 %) y ácidos alifáticos (mayor a 90 %), con una muy baja retención de xilosacáridos.

La utilización de membranas de ultrafiltración con los licores de explosión a vapor o eluido de la resina aniónica débil permitió la concentración de los xilosacáridos, pero no su separación de los compuestos fenólicos.

Se ensayaron diferentes estrategias de purificación de los licores alcalinos con membranas de micro y ultrafiltración de varios cortes (desde 800.000 Da a 10.000 Da) y materiales (PES, PESH y PVDF), no lográndose la separación de los xilosacáridos de compuestos fenólicos existentes en el licor.

La realización de este trabajo de tesis permitió establecer distintas condiciones de preextracción de los xilanos que componen la madera de eucalipto (en particular para el *Eucalyptus grandis* o mezclas donde este es la especie mayoritaria). Las diferentes condiciones y pretratamientos

aplicados permitieron la obtención de los xilosacáridos en diversas formas, ya sea como polímeros, oligómeros o monómeros. Del mismo modo se lograron establecer las condiciones de precipitación con solventes y purificación con resinas de intercambio. Los conocimientos generados en este trabajo permitirán continuar el trabajo de desarrollo de productos de valor agregado a partir de los xilanos provenientes de madera de eucalipto, trabajando en el marco de una biorrefinería integrada.

De los pretratamientos y tecnologías de purificación analizadas se puede concluir que, los tratamientos hidrotérmicos ensayados permitieron una muy buena remoción de los xilosacáridos y la producción de XOS o xilosa. La utilización de resinas de intercambio aniónico débil demostraron ser una tecnología sencilla y fácilmente escalable para la purificación de estos compuestos, pensando en su eventual utilización como prebióticos o para la producción de xilitol, por ejemplo.

De los tratamientos con hidróxido de sodio, hay dos aspectos fundamentales a tener en cuenta, por un lado, los rendimientos de extracción son sensiblemente más bajos que en los tratamientos hidrotérmicos y por otro la separación de los xilanos de los fragmentos de lignina contenidos en el licor no es simple, al menos con las tecnologías ensayadas. Sin embargo, dados estos resultados es necesario cuestionarse si los compuestos extraídos pueden tener utilidad o no en la forma que se encuentran en el licor de extracción y determinar la factibilidad de uso mediante la evaluación de las propiedades del producto final a producir.

BIBLIOGRAFÍA

- Afore. (2013). *New products from forest biorefineries*. Retrieved from www.eu-afore.fi
- Akpınar, O., Erdogan, K., & Bostanci, S. (2009). Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. *Carbohydrate Research*, 344(5), 660–666. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.01.015>
- Al-dajani, W. W., & Tschirner, U. W. (2008). Pre-extraction of hemicelluloses and subsequent kraft pulping Part I: alkaline extraction. *Tappi Journal*, (June), 3–8.
- Al-Rudainy, B., Galbe, M., & Wallberg, O. (2017). Influence of prefiltration on membrane performance during isolation of lignin-carbohydrate complexes from spent sulfite liquor. *Separation and Purification Technology*, 187, 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.06.031>
- Al Manasrah, M., Kallioinen, M., Ilvesniemi, H., & Mänttari, M. (2012). Recovery of galactoglucomannan from wood hydrolysate using regenerated cellulose ultrafiltration membranes. *Bioresource Technology*, 114, 375–381. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.014>
- Alekhina, M., Mikkonen, K. S., Alén, R., Tenkanen, M., & Sixta, H. (2014). Carboxymethylation of alkali extracted xylan for preparation of bio-based packaging films. *Carbohydrate Polymers*, 100, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.048>
- Alén, R. (2000). Basic chemistry of wood delignification. In Per Stenius (Ed.), *Forest products Chemistry* (1st Ed., p. 61). Helsinki (Finland): Fapet Oy.
- Alén, R., & Hartus, T. (1988). UV spectrophotometric determination of lignin from alkaline pulping liquors. *Cellul. Chem. Technol*, 22(6), 613–618.
- Alexandratos, S. D. (2009). Ion-Exchange resins: A retrospective from industrial and engineering chemistry research. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48(1), 388–398. <https://doi.org/10.1021/ie801242v>
- Alfa Laval. (2020). Membrane filtration. Retrieved from <https://www.alfalaval.com/globalassets/documents/industries/pulp-and-paper/al-membranefiltration.pdf>
- Álvarez, C., González, A., Negro, M. J., Ballesteros, I., Oliva, J. M., & Sáez, F. (2017). Optimized use of hemicellulose within a biorefinery for processing high value-added xylooligosaccharides. *Industrial Crops and Products*, 99, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.034>
- Amorim, C., Silvério, S. C., Prather, K. L. J., & Rodrigues, L. R. (2019). From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 37(7), 107397. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.05.003>
- Antal, M. J., Leesomboon, T., Mok, W. S., & Richards, G. N. (1991). Mechanism of formation of 2-furaldehyde from D-xylose *. *Carbohydrate Research*, 217, 71–85.
- Area, María C., Felissia, F. E., Clermont, J. E., Núñez, C. E., & Venica, A. D. (2004). Estudio comparativo de especies de eucalyptus y su respuesta al pulpado NSSC. In *III congreso Iberoamericano de Investigación en celulosa y papel (CIADICYP 2004)*. Córdoba-España. Retrieved from <http://www.cenunez.com.ar/archivos/111-4Eucas.pdf>
- Area, María Cristina, & Vallejos, M. E. (2012). La biorrefinería Forestal. In María Cristina Area &

M. E. Vallejos (Eds.), *Biorrefinería a partir de residuos lignocelulósicos*. (p. 183). Saarbrücken, Alemania: Editorial académica española.

Azevedo Carvalho, A. F., de Oliva Neto, P., Fernandes da Silva, D., & Pastore, G. M. (2013). Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 51(1), 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.021>

Bai, L., Hu, H., & Xu, J. (2012). Influences of configuration and molecular weight of hemicelluloses on their paper-strengthening effects, 88, 1258–1263. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.002>

Bajpai, P. (2013). Products from Hemicelluloses. In *Biorefinery in the Pulp and Paper Industry* (1st Ed., pp. 65–98). Academic Press, Inc. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409508-3.00004-3>

Balakshin, M., Capanema, E., & Berlin, A. (2014). *Isolation and Analysis of Lignin–Carbohydrate Complexes Preparations with Traditional and Advanced Methods. Studies in Natural Products Chemistry* (1st ed., Vol. 42). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63281-4.00004-5>

Baraibar, F., & Andrada, L. (2017). *Informe Diagnostico Reciclado*. Retrieved from <http://www.ciu.com.uy/innovaportal/file/84806/1/diganostico-reciclado-ctplas---informe-publicable-version-final.pdf>.

Bariani, M., Boix, E., Cassella, F., & Cabrera, M. N. (2020). Furfural production from rice husks within a biorefinery framework. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00810-1>

Berrios, M., Siles, J. A., Martín, M. A., & Martín, A. (2013). Ion Exchange. In S. Ramaswamy, H.-J. Huang, & B. V. V. Ramarao (Eds.), *Separation and Purification Technologies in Biorefineries* (1st Ed., pp. 149–165). John Wiley & Sons, Inc.

Bhaumik, P., & Dhepe, P. L. (2016). Conversion of Biomass into Sugars. In D. Murzin & O. Simakova (Eds.), *Biomass Sugars for Non-Fuel Applications* (1st Ed., pp. 1–46). RSC Green Chemistry.

Bian, J., Peng, F., Peng, P., Xu, F., & Sun, R. C. (2010). Isolation and fractionation of hemicelluloses by graded ethanol precipitation from *Caragana korshinskii*. *Carbohydrate Research*, 345(6), 802–809. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.01.014>

Biddy, M. J., Scarlata, C., & Kinchin, C. (2016). *Chemicals from Biomass: A Market Assessment of Bioproducts with Near-Term Potential. National Renewable Energy Laboratory*. <https://doi.org/10.2172/1244312>

Bokhary, A., Leitch, M., & Liao, B. Q. (2020). Liquid–liquid extraction technology for resource recovery: Applications, potential, and perspectives. *Journal of Water Process Engineering*, (July), 101762. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101762>

Bonfiglio, F., Cagno, M., Rey, F., Torres, M., Böthig, S., Menéndez, P., & Mussatto, S. I. (2019). Pretreatment of switchgrass by steam explosion in a semi-continuous pre-pilot reactor. *Biomass and Bioenergy*, 121(November 2018), 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.12.013>

Borrega, M., Nieminen, K., & Sixta, H. (2011). Degradation kinetics of the main carbohydrates in birch wood during hot water extraction in a batch reactor at elevated temperatures. *Bioresource Technology*, 102(22), 10724–10732. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.027>

Boscana, M., & Boragno, L. (2020). *Estadísticas Forestales 2020*. Montevideo, Uruguay.

Retrieved from <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2020-05/DGF Boletin Estadistico 2020.pdf>

Bozell, J. J., Black, S. K., Myers, M., Cahill, D., Miller, W. P., & Park, S. (2011). Solvent fractionation of renewable woody feedstocks: Organosolv generation of biorefinery process streams for the production of biobased chemicals. *Biomass and Bioenergy*, 35(10), 4197–4208. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.07.006>

Bozell, J. J., & Petersen, G. R. (2010). Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. *Green Chemistry*, 12(4), 539–554. <https://doi.org/10.1039/b922014c>

Brandt, A., Gräsvik, J., Halletta, J. P., & Welton, T. (2013). Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chemistry*, 15(3), 550. <https://doi.org/10.1039/c2gc36364j>

Brännvall, E. (2009). Pulp characterisation. In M. Ek, G. Gellerstedt, & G. Henriksson (Eds.), *Pulping Chemistry & Technology* (1st Ed., pp. 439–484). Stockholm: De Gruyter.

Brienzo, M., Siqueira, A. F., & Milagres, A. M. F. (2009). Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. *Biochemical Engineering Journal*, 46(2), 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.05.012>

Brienzo, Michel, & Figueiredo, F. C. De. (2016). Sugarcane bagasse hemicellulose properties, extraction technologies and Xylooligosaccharides production. In G. L. Riley (Ed.), *Food Waste* (pp. 155–188). Nova Science Publishers, Inc.

Brodin, M., Vallejos, M., Opedal, M. T., Area, M. C., & Chinga-Carrasco, G. (2017). Lignocellulosics as sustainable resources for production of bioplastics – A review. *Journal of Cleaner Production*, 162, 646–664. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.05.209>

Buruiana, C. T., Gómez, B., Vizireanu, C., & Garrote, G. (2017). Manufacture and evaluation of xylooligosaccharides from corn stover as emerging prebiotic candidates for human health. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 449–459. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.083>

Buslov, D. K., Kaputski, F. N., Sushko, N. I., Torgashev, V. I., Solov’eva, L. V., Tsarenkov, V. M., ... Larchenko, L. V. (2009). Infrared spectroscopic analysis of the structure of xylans. *Journal of Applied Spectroscopy*, 76(6), 801–805. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10812-010-9282-z>

Cao, R., Guo, J., Hua, X., & Xu, Y. (2020). Investigation on decolorization kinetics and thermodynamics of lignocellulosic xylooligosaccharides by highly selective adsorption with Amberlite XAD-16N. *Food Chemistry*, 310(159), 125934. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125934>

Carvalho, F., Duarte, L. C., Gírio, F., & Moniz, P. (2016). Hydrothermal/Liquid Hot Water Pretreatment (Autohydrolysis): A Multipurpose Process for Biomass Upgrading. In S. I. Mussatto (Ed.), *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery* (1st Ed., pp. 315–347). Elsevier B.V.- Woodhead publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00014-1>

Carvalho, F., Duarte, L. C., Lopes, S., Parajó, J. C., Pereira, H., & Gírio, F. M. (2005). Evaluation of the detoxification of brewery’s spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Process Biochemistry*, 40(3–4), 1215–1223. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.015>

Carvalho, Florbela, Duarte, L. C., & Gírio, F. M. (2008). Hemicellulose biorefineries : a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 67(November), 849–864.

- Carvalho, A. F. A., Marcondes, W. F., de Oliva Neto, P., Pastore, G. M., Saddler, J. N., & Arantes, V. (2018). The potential of tailoring the conditions of steam explosion to produce xylo-oligosaccharides from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 250(October 2017), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.041>
- Cebreiros, F., Guigou, M. D., & Cabrera, M. N. (2017). Integrated forest biorefineries: Recovery of acetic acid as a by-product from eucalyptus wood hemicellulosic hydrolysates by solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, 109(August), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.012>
- Chen, X., Lawoko, M., & van Heiningen, A. (2010). Kinetics and mechanism of autohydrolysis of hardwoods. *Bioresource Technology*, 101(20), 7812–7819. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.006>
- Chen, Z., Hu, T. Q., Jang, H. F., & Grant, E. (2015). Modification of xylan in alkaline treated bleached hardwood kraft pulps as classified by attenuated total-internal-reflection (ATR) FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 127, 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.084>
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51(7), 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- Chiarello, L. M., Ramos, C. E. A., Neves, P. V., & Ramos, L. P. (2016). Production of cellulosic ethanol from steam-exploded Eucalyptus urograndis and sugarcane bagasse at high total solids and low enzyme loadings. *Sustainable Chemical Processes*, 4(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s40508-016-0059-4>
- Chirat, C., Lachenal, D., & Sanglard, M. (2012). Extraction of xylans from hardwood chips prior to kraft cooking. *Process Biochemistry*, 47(3), 381–385. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.12.024>
- Costabel, L. (2013). *Alkaline Pre-extraction of Birch Wood Prior to Alkaline Pulping*. Universidad de la República.
- Cruz, J. M., Dominguez, J. M., Dominguez, H., & Parajo, J. C. (1999). Solvent extraction of hemicellulosic wood hydrolysates: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity, 67, 147–153.
- da Costa Lopes, A. M., João, K. G., Morais, A. R. C., Bogel-Lukasik, E., & Bogel-Lukasik, R. (2013). Ionic liquids as a tool for lignocellulosic biomass fractionation. *Sustainable Chemical Processes*, 1(1), 3. <https://doi.org/10.1186/2043-7129-1-3>
- Dammström, S., Salmén, L., & Gatenholm, P. (2009). On the interactions between cellulose and xylan, a biomimetic simulation of the hardwood cell wall. *Bioresources*, 4(1), 3–14.
- Danielsson, S., & Lindström, M. E. (2005). Influence of birch xylan adsorption during kraft cooking on softwood pulp strength. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 20(4), 436–441. <https://doi.org/10.3183/npprj-2005-20-04-p436-441>
- de Arruda, P. V., de Cássia Lacerda Brambilla Rodrigues, R., da Silva, D. D. V., & de Almeida Felipe, M. das G. (2011). Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. *Biodegradation*, 22(4), 815–822. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9397-1>
- de Carvalho, D. M., Queiroz, J. H. de, & Colodette, J. L. (2016). Assessment of alkaline pretreatment for the production of bioethanol from eucalyptus, sugarcane bagasse and

sugarcane straw. *Industrial Crops and Products*, 94, 932–941. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.069>

de Carvalho, W., Canilha, L., Mussatto, S. I., Dragone, G., Morales, M. L. V., & Solenzal, A. I. N. (2004). Detoxification of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate with ion-exchange resins for xylitol production by calcium alginate-entrapped cells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(8), 863–868. <https://doi.org/10.1002/jctb.1061>

de Figueiredo, F. C., Carvalho, A. F. A., Brienzo, M., Campioni, T. S., & de Oliva-Neto, P. (2017). Chemical input reduction in the arabinoxylan and lignocellulose alkaline extraction and xylooligosaccharides production. *Bioresource Technology*, 228, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.097>

Deutschmann, R., & Dekker, R. F. H. (2012). From plant biomass to bio-based chemicals : Latest developments in xylan research. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1627–1640. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.07.001>

Dien, B. S., Cotta, M. a, & Jeffries, T. W. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(3), 258–266. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1444-y>

Dieste, A., Cabrera, M. N., Clavijo, L., & Cassella, N. (2019). *La bioeconomia forestal en Uruguay desde una perspectiva tecnológica*. Montevideo, Uruguay. Retrieved from <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/22747>

Doner, L. W., Sweeney, G. A., & Hicks, K. B. (1997). Isolation of hemicellulose from corn fiber. *Cereal Chemistry*, 74(2), 176–181. Retrieved from <https://www.google.com/patents/US6147206>

Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., & Ballesteros, M. (2016). Steam Explosion as Lignocellulosic Biomass Pretreatment. In S. I. Mussatto (Ed.), *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery* (1st Ed., pp. 349–368). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00015-3>

Dutra, E. D., Santos, F. A., Alencar, B. R. A., Reis, A. L. S., de Souza, R. de F. R., Aquino, K. A. da S., ... Menezes, R. S. C. (2018). Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of lignocellulosic biomass: status and perspectives. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 8(1), 225–234. <https://doi.org/10.1007/s13399-017-0277-3>

Dutta, S., De, S., Saha, B., & Alam, I. (2012). Advances in conversion of hemicellulosic biomass to furfural and upgrading to biofuels. *Catalysis Science and Technology*, 2, 2025–2036. <https://doi.org/10.1039/c2cy20235b>

Ebringerova, A., Heinze, T., Ebringerová, A., & Heinze, T. (2000). Xylan and xylan derivatives - Biopolymers with valuable properties, 1: Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 21(9), 542–556. [https://doi.org/10.1002/1521-3927\(20000601\)21:9<542::aid-marc542>3.3.co;2-z](https://doi.org/10.1002/1521-3927(20000601)21:9<542::aid-marc542>3.3.co;2-z)

Ebringerová, A., & Hromádková, Z. (2010). An overview on the application of ultrasound in extraction, separation and purification of plant polysaccharides. *Central European Journal of Chemistry*, 8(2), 243–257. <https://doi.org/10.2478/s11532-010-0006-2>

Ebringerova, A., Hromadkova, Z., & Heinze, T. (2005). Hemicellulose. *Advances in Polymer Science*, 186(August), 1–67. <https://doi.org/10.1007/b136816>

Edlund, U., Ryberg, Y. Z., & Albertsson, A.-C. (2010). Barrier films from renewable forestry waste. *Biomacromolecules*, 11(9), 2532–2538. <https://doi.org/10.1021/bm100767g>

- Egües, I., Sanchez, C., Mondragon, I., & Labidi, J. (2012). Separation and Purification of Hemicellulose by Ultrafiltration. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51(1), 523–530.
- Egües, I., Sanchez, C., Mondragon, I., & Labidi, J. (2012). Effect of alkaline and autohydrolysis processes on the purity of obtained hemicelluloses from corn stalks. *Bioresource Technology*, 103(1), 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.139>
- Ek, M., Gellerstedt, G., & Henriksson, G. (2009). *Pulp and Paper Chemistry and Technology*. (M. Ek, G. Gellerstedt, & G. Henriksson, Eds.) (Vol. 2). <https://doi.org/10.1515/9783110213423>
- Emmel, A., Mathias, A. L., Wypych, F., & Ramos, L. P. (2003). Fractionation of Eucalyptus grandis chips by dilute acid-catalysed steam explosion. *Bioresource Technology*, 86(2), 105–115. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00165-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00165-7)
- Estudio Forestal Faroppa. (2017). *Primer informe de la línea de base del sector forestal-madera uruguayo Pre-diagnóstico y tendencias*. Montevideo, Uruguay.
- Evtuguin, D. V., Tomás, J. L., Silva, A. M. S., & Pascoal Neto, C. (2003). Characterization of an acetylated heteroxylan from Eucalyptus globulus Labill. *Carbohydrate Research*, 338(7), 597–604. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00529-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00529-3)
- Fang, J. M., Sun, R. C., & Tomkinson, J. (2000). Isolation and characterization of hemicelluloses and cellulose from rye straw by alkaline peroxide extraction. *Cellulose*, 7, 87–107.
- Fang, J. M., Sun, R. C., Tomkinson, J., & Fowler, P. (2000). Acetylation of wheat straw hemicellulose B in a new non-aqueous swelling system, 41, 379–387.
- Farhat, W., Venditti, R. A., Hubbe, M., Taha, M., Becquart, F., & Ayoub, A. (2017). A Review of Water-Resistant Hemicellulose-Based Materials: Processing and Applications. *ChemSusChem*, 10(2), 305–323. <https://doi.org/10.1002/cssc.201601047>
- Faustino, H., Gil, N., Baptista, C., & Duarte, A. P. (2010). Antioxidant activity of lignin phenolic compounds extracted from kraft and sulphite black liquors. *Molecules*, 15(12), 9308–9322. <https://doi.org/10.3390/molecules15129308>
- Felipe, M. G. A. (2004). Biotechnological Production of Xylitol from Lignocellulosic Materials. In B. C. Saha (Ed.), *Lignocellulose Biodegradation* (pp. 300–315). Washington: American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2004-0889.ch018>
- Ferreira, A. F. (2017). Biorefinery Concept. In M. Rabaçal, A. F. Ferreira, C. A. M. Silva, & M. Costa (Eds.), *Biorefineries- Targeting Energy, High Value Products and Waste Valorisation* (1st Ed., Vol. 57, pp. 1–20). Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-48288-0>
- Fonseca Silva, T. C., Habibi, Y., Colodette, J. L., & Lucia, L. a. (2011). The influence of the chemical and structural features of xylan on the physical properties of its derived hydrogels. *Soft Matter*, 7(3), 1090. <https://doi.org/10.1039/c0sm00868k>
- Freiling, E. C. (1955). Ion Exchange as a Separations Method. IX. Gradient Elution Theory. *Journal of the American Chemical Society*, 77(8), 2067–2071. <https://doi.org/10.1021/ja01613a010>
- Gabrielii, I., & Gatenholm, P. (1998). Preparation and properties of hydrogels based on hemicellulose. *Journal of Applied Polymer Science*, 69(8), 1661–1667. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19980822\)69:8<1661::AID-APP19>3.3.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19980822)69:8<1661::AID-APP19>3.3.CO;2-K)
- Gabrielii, I., Gatenholm, P., Glasser, W. ., Jain, R. ., & Kenne, L. (2000). Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose from aspen wood. *Carbohydrate Polymers*, 43(4), 367–374. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00181-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00181-8)

- Galbe, M., & Wallberg, O. (2019). Pretreatment for biorefineries: A review of common methods for efficient utilisation of lignocellulosic materials. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1634-1>
- Galbe, M., & Zacchi, G. (2012). Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*, 46, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.03.026>
- Garrote, G., Cruz, J. M., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2008). Non-isothermal autohydrolysis of barley husks: Product distribution and antioxidant activity of ethyl acetate soluble fractions. *Journal of Food Engineering*, 84(4), 544–552. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2007.06.021>
- Garrote, G., & Parajo, J. C. (2002). Non-isothermal autohydrolysis of Eucalyptus wood. *Wood Science and Technology*, 36, 111–123. <https://doi.org/10.1007/s00226-001-0132-2>
- Garrote, Gil, Domínguez, H., & Parajó, J. C. (1999). Mild autohydrolysis : an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 74(July), 1101–1109. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199911\)74:11<1101::AID-JCTB146>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199911)74:11<1101::AID-JCTB146>3.0.CO;2-M)
- Garrote, Gil, Domi, H., & Parajo, J. C. (2002). Interpretation of deacetylation and hemicellulose hydrolysis during hydrothermal treatments on the basis of the severity factor, 37, 1067–1073.
- Garrote, Gil, Falqué, E., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2007). Autohydrolysis of agricultural residues: study of reaction byproducts. *Bioresource Technology*, 98(10), 1951–1957. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.07.049>
- Garrote, Gil, Kabel, M. A., Schols, H. A., Falqué, E., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2007). Effects of Eucalyptus globulus wood autohydrolysis conditions on the reaction products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 9006–9013. <https://doi.org/10.1021/jf0719510>
- Gatenholm, P., Bodin, A., Gröndahl, M., Dammström, S., & Eriksson, L. (2008). United States Patent No. US 7,427,643 B2.
- Gatenholm, P., & Tenkanen, M. (2004). *Hemicelluloses: Science and Technology*. (P. Gatenholm & M. Tenkanen, Eds.) (First). Orlando, FLA: ACS Symposium Series 864.
- Gharehkhani, S., Sadeghinezhad, E., Kazi, S. N., Yarmand, H., Badarudin, A., Safaei, M. R., & Zubir, M. N. M. (2015). Basic effects of pulp refining on fiber properties - A review. *Carbohydrate Polymers*, 115, 785–803. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.047>
- Gírio, F M, Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4775–4800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- Gírio, Francisco M, Marques, S., Pinto, F., Oliveira, A. C., Costa, P., & Reis, A. (2017). Biorefineries in the World. In M. Rabaçal, A. F. Ferreira, C. A. M. Silva, & M. Costa (Eds.), *Biorefineries-Targeting Energy, High Value Products and Waste Valorisation* (1st. Ed, Vol. 57, pp. 227–281). Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-48288-0>
- Gonzales, R., Johns, M. R., Greenfield, P. F., & Pace, G. W. (1990). Phase equilibria for xanthan gum in ethanol-water solutions. *Carbohydrate Polymers*, 13(3), 317–333. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(90\)90062-W](https://doi.org/10.1016/0144-8617(90)90062-W)
- Gottumukkala, L. D., Parameswaran, B., Valappil, S. K., Pandey, A., & Sukumaran, R. K. (2014). Growth and butanol production by *Clostridium sporogenes* BE01 in rice straw hydrolysate: Kinetics of inhibition by organic acids and the strategies for their removal. *Biomass Conversion*

and *Biorefinery*, 4(3), 277–283. <https://doi.org/10.1007/s13399-013-0110-6>

Gröndahl, M., Bindgard, L., Gatenholm, P., & Hjertberg, T. (2013). *US 8,557,033 B2*. United States: United State Patents.

Gröndahl, M., Eriksson, L., & Gatenholm, P. (2004). Material properties of plasticized hardwood xylans for potential application as oxygen barrier films. *Biomacromolecules*, 5(4), 1528–1535. <https://doi.org/10.1021/bm049925n>

Gröndahl, M., Teleman, A., Gatenholm, P., & Gro, M. (2003). Effect of acetylation on the material properties of glucuronoxylan from aspen wood. *Carbohydrate Polymers*, 52(4), 359–366. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00014-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00014-6)

Guigou, M., Cebreiros, F., Cabrera, M. N., Lareo, C., Ferrari, D., & Lareo, C. (2016). Bioethanol production from *Eucalyptus grandis* hemicellulose hydrolyzate recovered before Kraft pulping using an integrated forest biorefinery concept. *Biomass Conversion and Biorefinery*, Paper 31744. <https://doi.org/10.1007/s13399-016-0218-6>

Gullichsen, J. (1999). Fiber line operations. In J. Gullichsen & C. J. Fogelholm (Eds.), *Chemical Pulping* (p. 693). Fapet Oy.

Gullón, P., González-Muñoz, M. J., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2008). Membrane processing of liquors from *Eucalyptus globulus* autohydrolysis. *Journal of Food Engineering*, 87(2), 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.11.032>

Gullón, Patricia, González-Muñoz, M. J., Gool, M. P. Van, Schols, H. A., Hirsch, J., Ebringerová, A., & Parajó, J. C. (2011). Structural features and properties of soluble products derived from *Eucalyptus globulus* hemicelluloses. *Food Chemistry*, 127(4), 1798–1807. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.066>

Guo, X., Meng, H., Tang, Q., Pan, R., Zhu, S., & Yu, S. (2016). Food Hydrocolloids Effects of the precipitation pH on the ethanolic precipitation of sugar beet pectins. *Food Hydrocolloids*, 52, 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.013>

Gupta, R., & Lee, Y. Y. (2010). Pretreatment of corn stover and hybrid poplar by sodium hydroxide and hydrogen peroxide. *Biotechnology Progress*, 26(4), 1180–1186. <https://doi.org/10.1002/btpr.405>

Gütsch, J. S., Nousiainen, T., & Sixta, H. (2012). Comparative evaluation of autohydrolysis and acid-catalyzed hydrolysis of *Eucalyptus globulus* wood. *Bioresource Technology*, 109, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.018>

Hansen, N. M. L., Blomfeldt, T. O. J., Hedenqvist, M. S., & Plackett, D. V. (2012). Properties of plasticized composite films prepared from nanofibrillated cellulose and birch wood xylan. *Cellulose*, 19(6), 2015–2031. <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9764-7>

Hansen, N. M. L., & Plackett, D. (2008). Sustainable films and coatings from hemicelluloses: a review. *Biomacromolecules*, 9(6), 1493–1505. <https://doi.org/10.1021/bm800053z>

Harmsen, P., Huijgen, W., Bermudez, L., & Bakker, R. (2010). *Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass*. Biosynergy. Wageningen.

Heikkinen, S. L., Mikkonen, K. S., Pirkkalainen, K., Serimaa, R., Joly, C., & Tenkanen, M. (2013). Specific enzymatic tailoring of wheat arabinoxylan reveals the role of substitution on xylan film properties. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 733–740. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.085>

Heinonen, J., Sanlaville, Q., Niskakoski, H., Tamper, J., & Sainio, T. (2017). Separation and

recovery of lignin from hydrolysates of lignocellulose with a polymeric adsorbent. *Separation and Purification Technology*, 186, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.06.001>

Helmerius, J., von Walter, J. V., Rova, U., Berglund, K. A., & Hodge, D. B. (2010). Impact of hemicellulose pre-extraction for bioconversion on birch Kraft pulp properties. *Bioresource Technology*, 101(15), 5996–6005. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.029>

Hernández-Pérez, F. A., de Arruda, P. V., Sene, L., Silvério da Silva, S., Kumar Chandel, A., & de Almeida Felipe, M. das G. (2019). Xylitol bioproduction: state-of-the-art, industrial paradigm shift, and opportunities for integrated biorefineries. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(7), 924–943. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1640658>

Hespell, R. B. (1998). Extraction and Characterization of Hemicellulose from the Corn Fiber Produced by Corn Wet-Milling Processes, 8561(97), 2615–2619.

Ho, W. S. W., & Sirkar, K. K. (1992). *Membrane Handbook* (1st. Ed). New York: Chapman & Hill.

Horn, S. J., & Eijssink, V. G. H. (2010). Enzymatic hydrolysis of steam-exploded hardwood using short processing times. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74(6), 1157–1163. <https://doi.org/10.1271/bbb.90762>

Hou-Rui, Z. (2012). Key Drivers Influencing the Large Scale Production of Xylitol. In S. Silvério da Silva & A. K. Chandel (Eds.), *D-xylitol* (pp. 267–290). Berlin Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0_12

Hu, X., & Goff, H. D. (2018). Fractionation of polysaccharides by gradient non-solvent precipitation: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 81(September), 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.011>

Hu, X., Liu, C., Jin, Z., & Tian, Y. (2015). Fractionation of starch hydrolysate into dextrin fractions with low dispersity by gradient alcohol precipitation. *SEPARATION AND PURIFICATION TECHNOLOGY*, 151, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.07.044>

Huang, C., Jeuck, B., Du, J., Yong, Q., Chang, H. min, Jameel, H., & Phillips, R. (2016). Novel process for the coproduction of xylo-oligosaccharides, fermentable sugars, and lignosulfonates from hardwood. *Bioresource Technology*, 219, 600–607. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.051>

Huang, H.-J. J., Ramaswamy, S., Tschirner, U. W. W., & Ramarao, B. V. V. (2008). A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Separation and Purification Technology*, 62(1), 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.12.011>

Huggins, M. L. (1942). Some properties of solutions of long-chain compounds. *J. Phys. Chem.*, 46(1), 151–158. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/j150415a018>

Hughes, S. R., Gibbons, W. R., Moser, B. R., & Rich, J. O. (2013). Sustainable Multipurpose Biorefineries for Third- Generation Biofuels and Value-Added Co-Products. In Z. Fang (Ed.), *Biofuels - Economy, Environment and Sustainability* (1st ed., pp. 245–267). InTechOpen. <https://doi.org/10.5772/54804>.

IEA Bioenergy Task42. (2018). *Bioeconomy and biorefining strategies in the EU Member States and beyond - Reference Year 2018*. Retrieved from https://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2018/12/Bioeconomy-and-Biorefining-Strategies_Final-Report_DEC2018.pdf

IEA Bioenergy. (2014). *IEA Bioenergy Task 42- Biorefining. Task 42 Biorefinery*. Wageningen. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(07\)00064-5](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(07)00064-5)

IfBB- Institute for Bioplastics and Biocomposites. (2019). *Biopolymers facts and statistics 2019*.

Biopolymers facts and statistics. Retrieved from <https://www.ifbb-hannover.de/en/facts-and-statistics.html>

Inalbon, M. C., Solier, Y. N., & Zanuttini, M. Á. (2017). Hydrothermal treatment of Eucalyptus wood: Effects on Ion permeability and material removing. *Industrial Crops and Products*, 104(November 2016), 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.042>

Jayapal, N., Samanta, a. K., Kolte, A. P., Senani, S., Sridhar, M., Suresh, K. P., & Sampath, K. T. (2013). Value addition to sugarcane bagasse: Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. *Industrial Crops and Products*, 42(2013), 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.019>

Jeoh, T., & Agblevor, F. A. (2001). Characterization and fermentation of steam exploded cotton gin waste. *Biomass and Bioenergy*, 21(2), 109–120. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(01\)00028-9](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(01)00028-9)

Jian, H. L., Lin, X. J., Zhang, W. A., Zhang, W. M., Sun, D. F., & Jiang, J. X. (2014). Characterization of fractional precipitation behavior of galactomannan gums with ethanol and isopropanol. *Food Hydrocolloids*, 40, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.012>

Johakimu, J., & Andrew, J. (2013). Hemicellulose extraction from South African Eucalyptus grandis using green liquor and its impact on kraft pulping efficiency and paper making properties. *BioResources*, 8(3), 3490–3504.

Jönsson, A. S. (2016). Membranes for lignin and hemicellulose recovery in pulp mills. In A. Figoli, A. Cassano, & A. Basile (Eds.), *Membrane Technologies for Biorefining* (1st ed., pp. 105–133). Elsevier- Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100451-7.00005-0>

Jönsson, Ann Sofi, Nordin, A. K., & Wallberg, O. (2008). Concentration and purification of lignin in hardwood kraft pulping liquor by ultrafiltration and nanofiltration. *Chemical Engineering Research and Design*, 86(11), 1271–1280. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2008.06.003>

Kabel, M. A., Borne, H. Van Den, Vincken, J. P., & Voragen, A. G. J. (2015). Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.09.006>

Kabel, M. a., Carneiro, F., Garrote, G., Avgerinos, E., Koukios, E., Parajó, J. C., ... Voragen, a. G. J. (2002). Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylooligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 50(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00045-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00045-0)

Kacurakova, M., Belton, P. S., Wilson, R. H., & Ebringerova, A. (1998). Hydration Properties of Xylan-Type Structures : an FTIR Study of Xylooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 38–44.

Kacuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N., & Ebringerová, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43(2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00151-X)

Kamm, B., Gruber, P. R., & Kamm, M. (2010). *Biorefineries-Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Karagöz, P., Rocha, I. V., Özkan, M., & Angelidaki, I. (2012). Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by Same Vessel Saccharification and Co-Fermentation. *Bioresource Technology*, 104, 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.075>

- Karinen, R., Vilonen, K., & Niemelä, M. (2011). Biorefining : Heterogeneously Catalyzed Reactions of Carbohydrates for the Production of Furfural and Hydroxymethylfurfural. *Chem Sus Chem*, 4, 1002–1016. <https://doi.org/10.1002/cssc.201000375>
- Kim, J. S., Lee, Y. Y., & Kim, T. H. (2016). A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 199(2016), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>
- Kim, S. J., Kwon, H. S., Kim, G., & Um, B.-H. (2015). Green liquor extraction of hemicellulosic fractions and subsequent organic acid recovery from the extracts using liquid – liquid extraction. *Industrial Crops & Products*, 67, 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.040>
- Kim, S. M., Dien, B. S., & Singh, V. (2016). Promise of combined hydrothermal/chemical and mechanical refining for pretreatment of woody and herbaceous biomass. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0505-2>
- King, D., Inderwildi, O. R., & Williams, A. (2010). *The Future of Industrial Biorefineries*. World Economic Forum. Cologny/Geneva- Switzerland.
- Köhnke, T. (2010). *Adsorption of xylans on cellulosic fibres Influence of xylan composition on adsorption characteristics*. CHALMERS UNIVERSITY OF TECHNOLOGY-Sweden. Retrieved from <http://publications.lib.chalmers.se/records/fulltext/109278.pdf>
- Koivula, E., Kallioinen, M., Preis, S., Testova, L., Sixta, H., & Mänttari, M. (2011). Evaluation of various pretreatment methods to manage fouling in ultrafiltration of wood hydrolysates. *Separation and Purification Technology*, 83(1), 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.09.006>
- Koivula, Elsi, Kallioinen, M., Sainio, T., Antón, E., Luque, S., & Mänttari, M. (2013). Enhanced membrane filtration of wood hydrolysates for hemicelluloses recovery by pretreatment with polymeric adsorbents. *Bioresource Technology*, 143, 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.129>
- Kondo, R., & Sarkanen, K. V. (1984). Kinetics of lignin and hemicellulose dissolution and formation of coniferyl alcohol during the initial stage of alkaline pulping. *Holzforschung*, 1(38), 31–36.
- Koullas, D. P., Umealu, O. S., & Koukios, E. G. (1999). Solvent selection for the extraction of ethanol from aqueous solutions. *Separation Science and Technology*, 34(11), 2153–2163. <https://doi.org/10.1081/SS-100100762>
- Krawczyk, H., Arkell, A., & Jönsson, A. (2011). Membrane performance during ultrafiltration of a high-viscosity solution containing hemicelluloses from wheat bran. *Separation and Purification Technology*, 83, 144–150. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.09.028>
- Krawczyk, H., Arkell, A., & Jönsson, A. S. (2013). Impact of prefiltration on membrane performance during isolation of hemicelluloses extracted from wheat bran. *Separation and Purification Technology*, 116, 192–198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.05.039>
- Krawczyk, H., & Jönsson, A. S. (2011). Separation of dispersed substances and galactoglucomannan in thermomechanical pulp process water by microfiltration. *Separation and Purification Technology*, 79(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.03.009>
- Kruzolek, C. (2000). *Aplicación de variantes del proceso de pulpado al peróxidoalcalino (APMP) a Eucalyptus grandis de 6 y 16 años*. Universidad Nacional de Misiones, Argentina.

- Kumar, A. K., & Sharma, S. (2017). Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0137-9>
- Kumar, B., Bhardwaj, N., Agrawal, K., Chaturvedi, V., & Verma, P. (2020). Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. *Fuel Processing Technology*, 199(July 2019). <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106244>
- Kumar, V., Krishania, M., Preet Sandhu, P., Ahluwalia, V., Gnansounou, E., & Sangwan, R. S. (2018). Efficient detoxification of corn cob hydrolysate with ion-exchange resins for enhanced xylitol production by *Candida tropicalis* MTCC 6192. *Bioresource Technology*, 251(December 2017), 416–419. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.039>
- Kumar, V., Yadav, S. K., Kumar, J., & Ahluwalia, V. (2020). A critical review on current strategies and trends employed for removal of inhibitors and toxic materials generated during biomass pretreatment. *Bioresource Technology*, 299(October 2019), 122633. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122633>
- Laine, C., Harlin, A., Hartman, J., Hyvärinen, S., Kammiovirta, K., Krogerus, B., ... Vähä-nissi, M. (2013). Hydroxyalkylated xylans – Their synthesis and application in coatings for packaging and paper. *Industrial Crops & Products*, 44, 692–704. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.033>
- Larnaudie, V., Ferrari, M. D., & Lareo, C. (2019). Techno-economic analysis of a liquid hot water pretreated switchgrass biorefinery: Effect of solids loading and enzyme dosage on enzymatic hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, 130(September), 105394. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105394>
- Larsson, S., Reimann, A., Nilvebrant, N.-O., & Jönsson, L. J. (1999). Comparison of Different Methods for the Detoxification of Lignocellulose Hydrolyzates of Spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77(1–3), 91–104. <https://doi.org/10.1385/ABAB:77:1-3:91>
- Lehto, J., & Alén, R. (2012). Purification of hardwood-derived autohydrolysates. *BioResources*, 7(2), 1813–1823.
- Lehto, J., & Alén, R. (2013). Alkaline Pre-treatment of Hardwood Chips Prior to Delignification. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 33(2), 77–91. <https://doi.org/10.1080/02773813.2012.748077>
- Leschinsky, M., Sixta, H., & Patt, R. (2009). Detailed mass balances of the autohydrolysis of Eucalyptus Globulus AT 170C. *Bioresources*, 4(2), 687–703.
- Li, J., Lu, M., Guo, X., Zhang, H., Li, Y., & Han, L. (2018). Insights into the improvement of alkaline hydrogen peroxide (AHP) pretreatment on the enzymatic hydrolysis of corn stover : Chemical and microstructural analyses. *Bioresource Technology*, 265(March), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.082>
- Li, X., Converse, A. O., & Wyman, C. E. (2003). Characterization of molecular weight distribution of oligomers from autocatalyzed batch hydrolysis of xylan. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105–108, 515–522. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12721432>
- Li, Z., & Pan, X. (2018). Strategies to modify physicochemical properties of hemicelluloses from biorefinery and paper industry for packaging material. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 17(1), 47–69. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9460-7>
- Lisboa, S. A., Evtuguin, D. V., Neto, C. P., & Goodfellow, B. J. (2005). Isolation and structural characterization of polysaccharides dissolved in Eucalyptus globulus kraft black liquors.

Carbohydrate Polymers, 60(1), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.11.024>

Liu, L., Chang, H., Jameel, H., & Park, S. (2018). Furfural production from biomass pretreatment hydrolysate using vapor- releasing reactor system. *Bioresource Technology*, 252(November 2017), 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.006>

Liu, W., Yuan, Z., Mao, C., Hou, Q., & Li, K. (2011). Removal of hemicelluloses by NaOH pre-extraction from aspen chips prior to mechanical pulping. *BioResources*, 6(3), 3469–3480. <https://doi.org/10.15376/biores.6.3.3469-3480>

Liu, Z., Fatehi, P., Jahan, M. S., & Ni, Y. (2011). Separation of lignocellulosic materials by combined processes of pre-hydrolysis and ethanol extraction. *Bioresource Technology*, 102(2), 1264–1269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.049>

Llano, T., Alexandri, M., Koutinas, A., Gardeli, C., Papapostolou, H., Coz, A., ... Komaitis, M. (2015). Liquid–Liquid Extraction of Phenolic Compounds from Spent Sulphite Liquor. *Waste and Biomass Valorization*, 6(6), 1149–1159. <https://doi.org/10.1007/s12649-015-9425-9>

Longue Jr., D., Ayoub, A., Venditti, R. A., Jameel, H., Colodette, J. L., & Chang, H. min. (2013). Ethanol precipitation of hetero-polysaccharide material from hardwood by alkaline extraction prior to the kraft cooking process. *BioResources*, 8(4), 5319–5332. <https://doi.org/10.15376/biores.8.4.5319-5332>

Longue Junior, D., Colodette, J. L., Juste Gomes, V., Longue, D., Colodette, J. L., & Gomes, V. J. (2010). Extraction of wood hemicelluloses through NaOH leaching. *Cerne*, 16(4), 423–429.

Luo, Jian, Cai, M., & Gu, T. (2013). Pretreatment of Lignocellulosic Biomass Using Green Ionic Liquids. In T. Gu (Ed.), *Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production* (p. 158). SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6052-3>

Luo, Jie, Genco, J. M., & Zou, H. (2012). Extraction of hardwood biomass using dilute alkali. *Tappi Journal*, 11(6), 19–27.

Luo, Y., Li, Z., Li, X., Liu, X., Fan, J., Clark, J. H., & Hu, C. (2019). The production of furfural directly from hemicellulose in lignocellulosic biomass: A review. *Catalysis Today*, 319, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.06.042>

Maciel de Mancilha, I., & Karim, M. N. (2003). Evaluation of Ion Exchange Resins for Removal of Inhibitory Compounds from Corn Stover Hydrolyzate for Xylitol Fermentation. *Biotechnology Progress*, 19(6), 1837–1841. <https://doi.org/10.1021/bp034069x>

Magaton, Andreia S., Colodette, J. L., Piló-Veloso, D., & Gomide, J. L. (2011). Behavior of eucalyptus wood xylans across kraft cooking. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 31(1), 58–72. <https://doi.org/10.1080/02773813.2010.484123>

Magaton, Andréia S., Oliveira, R. de, Lopes, O. R., Milagres, F. R., Piló-Veloso, D., & Colodette, J. L. (2006). Composição Química da Madeira de Espécies de Eucalipto Resultados e Discussão. In *29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Águas de Lindóia - SP-Brazil.

Magaton, Andréia S., Silva, T. C. F., Colodette, J. L., Piló-Veloso, D., & Milagres, F. R. (2013). Behavior of xylans from Eucalyptus species part 1. The influence of structural features of Eucalyptus xylans on their retention in kraft pulp. *Holzforschung*, 67(2), 115–122. <https://doi.org/10.1515/hf-2012-0034>

Mäkeläinen, H., Forssten, S., Saarinen, M., Stowell, J., Rautonen, N., & Ouwehand, A. C. (2010). Xylo-oligosaccharides enhance the growth of bifidobacteria and *Bifidobacterium lactis* in a

- simulated colon model. *Beneficial Microbes*, 1(1), 81–91. <https://doi.org/10.3920/BM2009.0025>
- Marcondes, Wilian F., Milagres, A. M. F., & Arantes, V. (2020). Co-production of xylo-oligosaccharides, xylose and cellulose nanofibrils from sugarcane bagasse. *Journal of Biotechnology*, 321(July), 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.07.001>
- Marcondes, Wilian Fioreli. (2018). *Integração da produção de xilo-oligossacarídeos como co-produto de alto valor agregado ao processo de produção de celulose nanofibrilada a partir do bagaço de cana-de-açúcar*. Universidade de São Paulo-Brasil.
- Marcotullio, G. (2011). *The Chemistry and Technology of Furfural Production in Modern Lignocellulose-Feedstock Biorefineries*. Delft University of Technology.
- Martín-Sampedro, R., Eugenio, M. E., García, J. C., Lopez, F., Villar, J. C. C., Diaz, M. J. J., & Martí, R. (2012). Steam explosion and enzymatic pre-treatments as an approach to improve the enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus globulus*. *Biomass and Bioenergy*, 42, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.03.032>
- Martín-Sampedro, Raquel. (2011). *Integración del Proceso Kraft de obtención de pasta de celulosa en el esquema de una biorefinería*. Universidad Complutense de Madrid.
- Martinez Burgos, P. A. (2013). *Caracterización química y estructural de hemicelulosas de genotipos de Eucalyptus globulus contrastantes en densidad y rendimiento pulpable*. Universidad de Concepción- Chile.
- Mateo, S., Roberto, I. C., Sánchez, S., & Moya, A. J. (2013). Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. *Industrial Crops and Products*, 49, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.046>
- Mergner, R., Janssen, R., Rutz, D., de Bari, I., & Sissot, F. (2013). *Lignocellulosic Ethanol Process and Demonstration*. (D. Chiamonti, A. Giovannini, R. Janssen, & R. Mergner, Eds.). Munich, Germany. Retrieved from www.biolyfe.eu
- MGAP-DGF. (2019). *Cartografía Forestal Nacional 2018*. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Montevideo, Uruguay. Retrieved from <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/informe-resultados-cartografia-forestal-nacional-2018>
- Microdyn-Nadir. (n.d.). Flat Sheet Membrane Data Sheets. Retrieved March 14, 2019, from <https://www.microdyn-nadir.com/flat-sheet-membrane-data-sheets/>
- Mikkonen, K. S., Laine, C., Kontro, I., Talja, R. A., Serimaa, R., & Tenkanen, M. (2015). Combination of internal and external plasticization of hydroxypropylated birch xylan tailors the properties of sustainable barrier films. *European Polymer Journal*, 66, 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.02.034>
- Mikkonen, K. S., & Tenkanen, M. (2012). Sustainable food-packaging materials based on future biorefinery products: Xylans and mannans. *Trends in Food Science and Technology*, 28(2), 90–102. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.06.012>
- Mittal, A., Chatterjee, S. G., Scott, G. M., & Amidon, T. E. (2009). Modeling xylan solubilization during autohydrolysis of sugar maple wood meal: Reaction kinetics. *Holzforschung*, 63(3), 307–314. <https://doi.org/10.1515/HF.2009.054>
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673–686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>

- Moura, P., Cabanas, S., Lourenço, P., Gírio, F., Loureiro-Dias, M. C., & Esteves, M. P. (2008). In vitro fermentation of selected xylo-oligosaccharides by piglet intestinal microbiota. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 1952–1961. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.11.007>
- Moure, A., Gullón, P., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry*, 41(9), 1913–1923. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.011>
- Mussatto, S. I., & Dragone, G. M. (2016). *Biomass Pretreatment, Biorefineries, and Potential Products for a Bioeconomy Development*. (S. I. Mussatto, Ed.), *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00001-3>
- Nabarlatz, D., Ebringerová, A., & Montané, D. (2007). Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 69(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.08.020>
- Nabarlatz, D., Farriol, X., & Montane, D. (2004). Kinetic Modeling of the Autohydrolysis of Lignocellulosic Biomass for the Production of Hemicellulose-Derived Oligosaccharides. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 43, 4124–4131.
- Nabarlatz, D., Farriol, X., & Montane, D. (2005). Autohydrolysis of Almond Shells for the Production of Xylo-oligosaccharides : Product Characteristics and Reaction Kinetics. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 44, 7746–7755.
- Nilvebrant, N. O., Reimann, A., Larsson, S., & Jönsson, L. J. (2001). Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resins. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 91–93, 35–49. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:35>
- Nitzsche, R., Gröngroft, A., & Kraume, M. (2019). Separation of lignin from beech wood hydrolysate using polymeric resins and zeolites – Determination and application of adsorption isotherms. *Separation and Purification Technology*, 209(February 2018), 491–502. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.07.077>
- Njoku, S. I. (2012). *Optimization of the production of cellulosic biofuels*. Aalborg University-Copenhagen.
- NREL, -National Renewable Energy Laboratory. (2011). What Is a Biorefinery? Retrieved November 26, 2014, from <http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html>
- Nunes, A. P., & Pourquie, J. (1996). Steam explosion pretreatment and enzymatic hydrolysis of eucalyptus wood. *Bioresource Technology*, 57(2), 107–110. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00019-3](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00019-3)
- O'Dwyer, M. H. (1926). The Hemicelluloses. Part IV: The Hemicelluloses of Beech Wood. *Biochemical Journal*, 20(4), 656–664. <https://doi.org/10.1042/bj0200656>
- Oefner, P. J., Lanziner, A. H., Bonn, G., & Bobleter, O. (1992). Quantitative studies on furfural and organic acid formation during hydrothermal, acidic and alkaline degradation of D-xylose. *Monatshefte Für Chemie Chemical Monthly*. <https://doi.org/10.1007/BF00816848>
- Oficina de Planeamiento y Presupuesto-Dirección de Planificación. (2019). *Presente y futuro de las energías renovables en Uruguay. Hacia una Estrategia Nacional de Desarrollo, Uruguay 2050, Oficina de Planeamiento y Presupuesto* (Vol. X). Montevideo, Uruguay.
- Overend, R. P., Chornet, E., & Gascoigne, J. A. (1987). Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A*,

Mathematical and Physical Sciences, 321(1561), 523–536.
<https://doi.org/10.1098/rsta.1987.0029>

Paananen, M., Tamminen, T., Nieminen, K., & Sixta, H. (2010). Galactoglucomannan stabilization during the initial kraft cooking of Scots pine. *Holzforschung*, 64(6), 683–692. <https://doi.org/10.1515/HF.2010.109>

Palacio, L., Prádanos, P., & Hernández, A. (2014). Procesos de separación: membranas en el día a día. *Revista de Ciencias*, (4), 5–10.

Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxication. *Bioresource Technology*, 74, 17–24.

Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Larsson, M., Stenberg, K., Szengyel, Z., ... Zacchi, G. (1996). Design and operation of a bench-scale process development unit for the production of ethanol from lignocellulosics. *Bioresource Technology*, 58(2), 171–179. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00096-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00096-X)

Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577–7587. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>

Parajó, J. ., Garrote, G., Cruz, J. ., & Dominguez, H. (2004). Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. *Trends in Food Science & Technology*, 15(3–4), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.009>

Parajó, J. C., Alonso, J. L., & Vázquez, D. (1994). Effect of selected operational variables on the susceptibility of NaOH-pretreated pine wood to enzymatic hydrolysis: a mathematical approach. *Wood Science and Technology*, 28(4), 297–300. <https://doi.org/10.1007/BF00204216>

Parajó, J. C., Domínguez, H., & Domínguez, J. M. (1997). Xylitol production from Eucalyptus wood hydrolysates extracted with organic solvents. *Process Biochemistry*, 32(7), 599–604. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(97\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(97)00016-2)

Park, J., Jones, B., Koo, B., Chen, X., Tucker, M., Yu, J., ... Park, S. (2016). Use of mechanical refining to improve the production of low-cost sugars from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 199, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.059>

Park, S. J., Moon, J. K., & Um, B. H. (2013). Evaluation of the efficiency of solvent systems to remove acetic acid derived from pre-pulping extraction. *Journal of the Korean Wood Science and Technology*, 41(5), 447–455. <https://doi.org/10.5658/WOOD.2013.41.5.447>

Pascoal Neto, C., Evtuguin, D., Pinto, P., Silvestre, A., & Freire, C. (2005). Química da madeira de Eucalyptus globulus: especificidades e impacto nos processos de cozimento e de branqueamento. *Pasta e Papel*, 7, 32–42.

Paul Chen, J., Mou, H., Wang, L. K., & Matsuura, T. (2006). Membrane Filtration. In L. K. Wang, Y.-T. Hung, & N. K. Shammass (Eds.), *Advanced Physicochemical Treatment Processes* (1st Ed., pp. 203–255). New Jersey: Humana Press Inc.

Paul Chen, J., Yang, L., Wun-Jern, N., Wang, K. L., & Thong, S.-L. (2006). Ion exchange. In L. Wang, Y.-T. Hung, & N. K. Shammass (Eds.), *Advanced Physicochemical Treatment Processes* (pp. 261–292). New Jersey: Humana Press.

Peleteiro, S., Rivas, S., Alonso, J. L., Santos, V., & Parajó, J. C. (2016). Furfural production using ionic liquids: A review. *Bioresource Technology*, 202, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.017>

- Peng, F. (2012). Isolation and Fractionation of Hemicelluloses From *Salix Psammophila*. *Cellulose Chemistry and Technology*, 46, 177–184.
- Peng, F., Peng, P., Xu, F., & Sun, R. (2012). Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances*, 30, 879–903. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.018>
- Peng, F., Ren, J.-L., Xu, F., Bian, J., Peng, P., Sun, R.-C., ... Sun, R.-C. (2009). Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6305–6317. <https://doi.org/10.1021/jf900986b>
- Peng, X. W., Ren, J. L., Zhong, L. X., Peng, F., & Sun, R. C. (2011). Xylan-rich hemicelluloses- graft -acrylic acid ionic hydrogels with rapid responses to pH, salt, and organic solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(15), 8208–8215. <https://doi.org/10.1021/jf201589y>
- Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., & Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations, 50.
- Pereira Ramos, L. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quimica Nova*, 26(6), 863–871. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000600015>
- Petzold-Welcke, K., Schwikal, K., Daus, S., & Heinze, T. (2014). Xylan derivatives and their application potential - Mini-review of own results. *Carbohydrate Polymers*, 100, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.052>
- Phillips, J., & Pollard, A. (1953). Degradation of Sugars on Ion-Exchange Columns of 'Amberlite IRA 400 (OH')'. *Nature*, 171, 41–42. <https://doi.org/10.1038/171041b0>
- Pritchard, M., Howell, J. A., & Field, R. W. (1995). The ultrafiltration of viscous fluids. *Journal of Membrane Science*, 102, 223–235.
- Puls, J., & Saake, B. (2003). Industrially Isolated Hemicelluloses. In P. Gatenholm & M. Tenkanen (Eds.), *Hemicelluloses: Science and Technology Science and Technology Downloaded* (First Ed., pp. 24–37). Washington: American Chemical Society.
- Puro, L., Tanninen, J., & Nyström, M. (2002). Analyses of organic foulants in membranes fouled by pulp and paper mill effluent using solid-liquid extraction. *Desalination*, 143(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00215-1](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00215-1)
- Rabelo, S. C., Andrade, R. R., Maciel Filho, R., & Costa, A. C. (2014). Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. *Fuel*, 136, 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.07.033>
- Rabelo, S. C., Andrade, R. R., Maciel Filho, R., Costa, A. C., Filho, R. M., & Costa, A. C. (2014). Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. *Fuel*, 136, 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.07.033>
- Rafiqul, I. S. M., & Sakinah, A. M. M. (2013). Processes for the Production of Xylitol-A Review. *Food Reviews International*, 29(2), 127–156. <https://doi.org/10.1080/87559129.2012.714434>
- Ragauskas, A. J., Nagy, M., Kim, D. H., Eckert, C. A., Hallett, J. P., & Liotta, C. L. (2006). From wood to fuels: Integrating biofuels and pulp production. *Industrial Biotechnology*, 2(1), 55–65. <https://doi.org/10.1089/ind.2006.2.55>
- Rangel, J., Hornus, M., Felissia, F. E., & Area, M. C. (2016). Hydrothermal treatment of eucalyptus sawdust for a forest biorefinery. *Cellulose Chemistry and Technology*, 50, 521–528.
- Rao Ravella, S., Gallagher, J., Fish, S., & Prakasham, R. S. (2012). Overview on Commercial

Production of Xylitol, Economic Analysis and Market Trends. In S. Silveira da Silva & A. K. Chandel (Eds.), *D-xylitol* (pp. 291–307). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0_13

Reina, L. (2010). *Influencia de la composición química de la madera de Eucalyptus grandis y Eucalyptus globulus en los parámetros de pulpeo Kraft*. Universidad de la República. Retrieved from <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/1800/1/0037rei.pdf>

Reis, D., Vian, B., & Roland, J.-C. (1994). Cellulose-glucuronoxylans and plant cell wall structure. *Micron*, 25(2), 171–187.

Romani, A., Garrote, G., Ballesteros, I., & Ballesteros, M. (2013). Second generation bioethanol from steam exploded Eucalyptus globulus wood. *Fuel*, 111, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.076>

Ruiz, E., Cara, C., Manzanares, P., Ballesteros, M., & Castro, E. (2008). Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(2), 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.09.002>

Rydholm, S. A. (1965). *Pulping Processes* (1st Ed.). John Wiley & Sons, Ltd.

Santiago, A. S., & Pascoal Neto, C. (2008). Impact of Kraft Process Modifications on Eucalyptus globulus Pulping Performance and Polysaccharide Retention. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 47, 7433–7440. <https://doi.org/10.1021/ie071488g>

Sanz, M. L., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2005). Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5192–5199. <https://doi.org/10.1021/jf050276w>

Sassner, P., Galbe, M., & Zacchi, G. (2008). Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*, 32(5), 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.10.014>

Saxena, A., Elder, T. J., Pan, S., & Ragauskas, A. J. (2009). Novel nanocellulosic xylan composite film. *Composites Part B: Engineering*, 40(8), 727–730. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2009.05.003>

Schnell, C. N., Galván, M. V., Peresin, M. S., Inalbon, M. C., Vartiainen, J., Zanuttini, M. A., & Mocchiutti, P. (2017). Films from xylan/chitosan complexes: preparation and characterization. *Cellulose*, 24(10), 4393–4403. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1411-x>

Schönberg, C., Oksanen, T., Suurnäkki, A., Kettunen, H., & Buchert, J. (2001). The importance of xylan for the strength properties of spruce kraft pulp fibres. *Holzforschung*, 55(6), 639–644. <https://doi.org/10.1515/HF.2001.104>

Schwartz, T. J., & Lawoko, M. (2010). Removal of acid-soluble lignin from biomass extracts using Amberlite XAD-4 resin. *BioResources*, 5(4), 2337–2347.

Seader, J. D., Henley, E. J., & Roper, D. K. (2011). *Separation Process Principles: Chemical and Biochemical Operations*. (John Wiley & Sons Inc., Ed.) (3rd Ed.). USA: John Wiley & Sons, Inc.

Shimizu, F. L., Monteiro, P. Q., Ghiraldi, P. H. C., Melati, R. B., Pagnocca, F. C., Souza, W. de, ... Brienzo, M. (2018). Acid, alkali and peroxide pretreatments increase the cellulose accessibility and glucose yield of banana pseudostem. *Industrial Crops and Products*, 115(January), 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.024>

Sigma-Aldrich. (n.d.). Xylan from beechwood ≥90% (HPLC), cell wall polysaccharide | Sigma-Aldrich. Retrieved November 20, 2018, from

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/x4252?lang=en&region=UY>

Sigma Aldrich. (n.d.). Xylan from oat spelts Xylose $\geq 70\%$ by HPAE (after hydrolysis) | Sigma-Aldrich. Retrieved November 20, 2018, from https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/x0627?lang=en&region=UY&cm_sp=Insite_-_prodRecCold_xviews_-_prodRecCold5-3

Silveira, M. H. L., Morais, A. R. C., Da Costa Lopes, A. M., Oleksyszzen, D. N., Bogel-Lukasik, R., Andreus, J., & Pereira Ramos, L. (2015). Current Pretreatment Technologies for the Development of Cellulosic Ethanol and Biorefineries. *ChemSusChem*, 8(20), 3366–3390. <https://doi.org/10.1002/cssc.201500282>

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3).

Sixta, H. (2006). *Handbook of Pulp*. (H. Sixta, Ed.) (First Ed., Vol. Volume 1). Weinheim, Alemania: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527619887>

Sjöström, E. (1993). *Wood Chemistry - Fundamentals and Applications* (2nd Ed.). California: Academic Press, Inc.

Smart, C. L., & Whistler, R. (1949). Films from Hemicellulose Acetates. *Science*, 110(2870), 713–714. <https://doi.org/10.1126/science.110.2870.713-a>

Smook, G. A. (2003). *Handbook for Pulp and Paper Technologists* (3rd Editio).

Sousa, S., Ramos, A., Evtuguin, D. V., & Gamelas, J. A. F. (2016). Xylan and xylan derivatives — Their performance in bio-based films and effect of glycerol addition. *Industrial Crops & Products*, 94, 682–689. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.031>

Stenius, P., Gullichsen, J., & Paulapuro, H. (2000). *Forest Products Chemistry*. (J Gullichsen & H. Paulapuro, Eds.) (1era Ed., Vol. 3). Jyväskylä: Fapet Oy.

Stoffel, R. B. (2016). *Fraccionamiento de aserrín de pino destinado a una biorrefinería forestal*. Universidad Nacional de La Plata-Argentina. Retrieved from <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/52523>

Stoffel, R. B., Neves, P. V., Felissia, F. E., Ramos, L. P., Gassa, L. M., & Area, M. C. (2017). Hemicellulose extraction from slash pine sawdust by steam explosion with sulfuric acid. *Biomass and Bioenergy*, 107(September), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.09.019>

Stoklosa, R. J., & Hodge, D. B. (2012). Extraction, recovery, and characterization of hardwood and grass hemicelluloses for integration into biorefining processes. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 51(34), 11045–11053. <https://doi.org/10.1021/ie301260w>

Sun, R, Tomkinson, J., Wang, Y. x., & Xiao, B. (2000). Physico-chemical and structural characterization of hemicelluloses from wheat straw by alkaline peroxide extraction. *Polymer*, 41(7), 2647–2656. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00436-X](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00436-X)

Sun, Run-cang, Sun, X. F., & Tomkinson, J. (2004). Hemicelluloses and Their Derivatives. In P. Gatenholm & M. Tenkanen (Eds.), *Hemicelluloses: Science and Technology* (First Ed., pp. 2–22). Orlando, FLA: ACS Symposium Series 864.

Sun, S. L., Wen, J. L., Ma, M. G., & Sun, R. C. (2013). Successive alkali extraction and structural characterization of hemicelluloses from sweet sorghum stem. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 2224–2231. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.098>

Sun, X F, Xu, F., Sun, R. C., Geng, Z. C., Fowler, P., & Baird, M. S. (2005). Characteristics of

degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw, *60*, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.11.012>

Sun, Xiao Feng, Wang, H. H., Jing, Z. X., & Mohanathas, R. (2013). Hemicellulose-based pH-sensitive and biodegradable hydrogel for controlled drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, *92*(2), 1357–1366. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.032>

Svärd, A., Brännvall, E., & Edlund, U. (2015). Rapeseed straw as a renewable source of hemicelluloses: Extraction, characterization and film formation. *Carbohydrate Polymers*, *133*, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.023>

Svärd, A., Moriana, R., Brännvall, E., & Edlund, U. (2019). Rapeseed Straw Biorefinery Process. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, *7*(1), 790–801. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b04420>

Swatloski, R. P., Spear, S. K., Holbrey, J. D., & Rogers, R. D. (2002). Dissolution of cellulose with ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, *124*(18), 4974–4975. <https://doi.org/10.1021/ja025790m>

Takahashi, S., Tanifuji, K., Shiell, K., Fatehi, P., Sarwar Jahan, M. S., Ohi, H., & Ni, Y. (2013). Removal of acetic acid from spent sulfite liquor using anion exchange resin for effective xylose fermentation with *pichia stipitis*. *BioResources*, *8*(2), 2417–2428. <https://doi.org/10.15376/biores.8.2.2417-2428>

Tenkanen, M., Alakalunmaa, S., Martin, J., Diaz, R., Parikka, K., & Mikkonen, K. S. (2016). Advanced Materials : Barrier Films , Hydrogels , and Aerogels from Wood Hemicelluloses. In *Insights & strategies towards a biomass economy Workshop*. Montevideo, Uruguay. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-1010-2>.Workshop

Testova, L. (2014). *Isolation of birch xylan as a part of pulping-based biorefinery*. Aalto University, Doctoral Dissertation. Retrieved from <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-60-6016-3>

Testova, L., Chong, S. L., Tenkanen, M., & Sixta, H. (2011). Autohydrolysis of birch wood. *Holzforschung*, *65*(4), 535–542. <https://doi.org/10.1515/HF.2011.073>

Testova, L., Roselli, A., Costabel, L., Kovasin, K., Tenkanen, M., & Sixta, H. (2014). Combined Production of Polymeric Birch Xylan and Paper Pulp by Alkaline Pre-extraction Followed by Alkaline Cooking. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *53*, 8302–8310. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/ie500694c>

Thuvander, J. (2018). *Recovery of Hemicelluloses Extracted from Spruce and Wheat Bran*. Lund University.

Thuvander, Johan, Lipnizki, F., & Jönsson, A. S. (2019). On-Site Recovery of Hemicelluloses from Thermomechanical Pulp Mill Process Water by Microfiltration and Ultrafiltration. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, *39*(3), 214–223. <https://doi.org/10.1080/02773813.2019.1565865>

Timell, T. E. (1964). Wood hemicelluloses: Part I. *Adv Carbohydr Chem.*, *19*, 247–302. [https://doi.org/10.1016/S0096-5332\(08\)60284-2](https://doi.org/10.1016/S0096-5332(08)60284-2)

Trajano, H. L., & Wyman, C. E. (2013). Fundamentals of Biomass Pretreatment at Low pH. In C. E. Wyman (Ed.), *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals* (1st Ed., pp. 103–123). United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470975831>

Treybal, R. E. (1988). *Operaciones de Transferencia de Masa* (2da Ed.). Mexico: McGraw-Hill

Education.

Tunc, M. Sefik, & Van Heiningen, A. R. P. (2008). Hemicellulose extraction of mixed southern hardwood with water at 150 °C: Effect of time. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 47(18), 7031–7037. <https://doi.org/10.1021/ie8007105>

Tunc, Mehmet Sefik. (2008). *HEMICELLULOSE EXTRACTION OF MIXED SOUTHERN HARDWOODS*. University of Maine.

Tunc, Mehmet Sefik, & van Heiningen, A. R. P. (2008). Hydrothermal dissolution of mixed southern hardwoods. *Holzforschung*, 62(5), 539–545. <https://doi.org/10.1515/HF.2008.100>

Um, B., Friedman, B., Peter, G., & Walsum, V. (2011). Conditioning hardwood-derived pre-pulping extracts for use in fermentation through removal and recovery of acetic acid using trioctylphosphine oxide (TOPO). *Holzforschung*, 65, 51–58. <https://doi.org/10.1515/HF.2010.115>

Uruguay XXI. (2017). Sector Forestal- Oportunidades de Inversión. Retrieved October 15, 2017, from <http://www.uruguayxxi.gub.uy/inversiones/wp-content/uploads/sites/3/2014/09/Sector-Forestal-Uruguay-XXI-2014.pdf>

Valero-Valdivieso, M. F., Ortigón, Y., & Uscategui, Y. (2013). BIOPOLÍMEROS: AVANCES Y PERSPECTIVAS. *DYNA*, 80(181), 171–180.

Vallejos, M. E. & Area, M. C. (2017). Xylitol as Bioproduct From the Agro and Forest Biorefinery. In A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Food Bioconversion* (pp. 411–432). London: Academic Press, Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811413-1/00012-7>

Vallejos, Maria E., Felissia, F. E., & Area, M. C. (2017). Hydrothermal Treatments Applied to Agro- and Forest- Industrial Waste to Produce High Added-Value Compounds. *Bioresources*, 12(1), 2058–2080.

Vallejos, María Evangelina, Chade, M., Mereles, E. B., Bengoechea, D. I., Brizuela, J. G., Felissia, F. E., & Area, M. C. (2016). Strategies of detoxification and fermentation for biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, 91, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.007>

Vallejos, María Evangelina, Felissia, F. E., Krueyanski, J., & Area, M. C. (2015). Kinetic study of the extraction of hemicellulosic carbohydrates from sugarcane bagasse by hot water treatment. *Industrial Crops and Products*, 67, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.058>

Van Craeyveld, V., Swennen, K., Dornez, E., Van de Wiele, T., Marzorati, M., Verstraete, W., ... Courtin, C. M. (2008). Structurally Different Wheat-Derived Arabinoxyloligosaccharides Have Different Prebiotic and Fermentation Properties in Rats. *The Journal of Nutrition*, 138(12), 2348–2355. <https://doi.org/10.3945/jn.108.094367>

Van Heiningen, A., Asuquo, G., Dwyer, B., Ronneberg, D., Ramsey, T., Paper, I., ... Heiningen, A. Van. (2010). *Integrated Forest Products Refinery (IFPR)*. Orono, Maine.

van Heiningen, A., Genco, J., Yoon, S., Tunc, M. S., Zou, H., Juo, L., ... Pendse, H. (2011). Integrated Forest Biorefineries ; Near-Neutral Process. In J. Zhu, X. Zhang, & X. Pan (Eds.), *Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Fibers from Forest Biomass* (First, pp. 443–473). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2011-1067>

van Heiningen, A. R. P. (2006). Converting a kraft pulp mill into an integrated forest biorefinery. *Pulp & Paper Canada*, 107(6), 38–43.

Vázquez, M. J., Garrote, G., Alonso, J. L., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2005). Refining of

autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: evaluation of operational strategies. *Bioresource Technology*, 96(8), 889–896. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.08.013>

Vega, B., Grigoray, O., Gustafsson, J., & Fardim, P. (2016). Advances in Sugar-based Polymers : Xylan and its Derivatives for Surface Modification of Pulp Fibres. In Dmitry Murzin and Olga Simakova (Ed.), *Biomass Sugars for Non-Fuel Applications* (pp. 134–158). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781782622079>

Vena, P. F., García-Aparicio, M. P., Brienzo, M., Görgens, J. F., & Rypstra, T. (2013). Effect of alkaline hemicellulose extraction on kraft pulp fibers from eucalyptus grandis. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 33(3), 157–173. <https://doi.org/10.1080/02773813.2013.773040>

Vertès, A. A. (2014). Biorefinery Roadmaps. *Biorefineries: Integrated Biochemical Processes for Liquid Biofuels*, (1), 59–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59498-3.00003-8>

Villarreal, M. L. ., Prata, a. M. R., Felipe, M. G. ., & Almeida E Silva, J. B. (2006). Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by Candida guilliermondii. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.032>

Viñals Verde, M., Maciel De Mancilha, I., Almeida, J. S. E. B. De, & Solenar, a. I. N. (2006). Métodos de purificación de hidrolizados de bagazo de caña de azúcar para la obtención de xilitol. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(2), 129–134. <https://doi.org/10.1080/11358120609487683>

Wallberg, O., Al-Rudainy, B., Galbe, M., & Schagerlöf, H. (2018). Antisolvent precipitation of hemicelluloses, lignosulfonates and their complexes from ultrafiltrated spent sulfite liquor (SSL). *Holzforschung*, 72(10), 839–850. <https://doi.org/10.1515/hf-2017-0218>

Wallberg, O., Jönsson, A. S., & Wimmerstedt, R. (2003). Fractionation and concentration of kraft black liquor lignin with ultrafiltration. *Desalination*, 154(2), 187–199. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(03\)80019-X](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(03)80019-X)

Wallberg, O., Linde, M., & Jönsson, A. S. (2006). Extraction of lignin and hemicelluloses from kraft black liquor. *Desalination*, 199(1–3), 413–414. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.03.094>

Walton, Sara L., Hutto, D., Genco, J. M., Walsum, G. P. Van, & Heiningen, A. R. P. Van. (2010). Pre-Extraction of Hemicelluloses from Hardwood Chips Using an Alkaline Wood Pulping Solution Followed by Kraft Pulping of the Extracted Wood Chips. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(24), 12638–12645. <https://doi.org/10.1021/ie100848p>

Walton, Sara Lynn. (2009). *Biological Conversion of Hemicellulose Extract into Value-Added Fuels and Chemicals*. University of Maine. Retrieved from www.library.umaine.edu/theses/pdf/waltonsl2009.pdf

Wang, Y., Cao, X., Zhang, R., Xiao, L., Yuan, T., Shi, Q., & Sun, R. (2018). Evaluation of xylooligosaccharide production from residual hemicelluloses of dissolving pulp by acid and enzymatic hydrolysis. *RSC Advances*, 8(61), 35211–35217. <https://doi.org/10.1039/c8ra07140c>

Weil, J. R., Dien, B., Bothast, R., Hendrickson, R., Mosier, N. S., & Ladisch, M. R. (2002). Removal of Fermentation Inhibitors Formed during Pretreatment of Biomass by Polymeric Adsorbents. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 41, 6132–6138.

Willför, S., & Holmbom, B. (2004). Isolation and characterisation of water soluble polysaccharides from Norway spruce and Scots pine. *Wood Science and Technology*, 38(3), 173–179. <https://doi.org/10.1007/s00226-003-0200-x>

- Williams, D. L., & Dunlop, A. P. (1948). Kinetics of Furfural Destruction in Acidic Aqueous Media. *Industrial & Engineering Chemistry*, 40(2), 239–241. <https://doi.org/10.1021/ie50458a012>
- Winkler. (n.d.). Potasio acetato- Ficha de seguridad química. Retrieved March 27, 2020, from <http://iio.ens.uabc.mx/hojas-seguridad/Acetato de potasio.pdf>
- Wolfson, M. ., & Stuart Tipson, R. (1955). *Advances in carbohydrate chemistry* (Vol. 10). Academic Press, Inc.
- Xiao, L. P., Song, G.-Y., & Sun, R. (2017). Effect of Hydrothermal Processing on Hemicellulose Structure. In H. A. Ruiz, M. Hedegaard Thomsen, & H. L. Trajano (Eds.), *Hydrothermal Processing in Biorefineries-Production of Bioethanol and High Added-Value Compounds of Second and Third Generation Biomass* (1st Ed., pp. 45–94). Springer International Publishing AG.
- Yoon, S., Macewan, K., & van Heiningen, A. R. P. (2008). Hot-water pre-extraction from loblolly pine (*Pinus taeda*) in an integrated forest products biorefinery. *Tappi Journal*, (june), 27–31.
- Yoon, S. Y., Han, S. H., & Shin, S. J. (2014). The effect of hemicelluloses and lignin on acid hydrolysis of cellulose. *Energy*, 77, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.01.104>
- You, X., Wang, X., Liang, C., Liu, X., & Wang, S. (2019). Purification of hemicellulose from sugarcane bagasse alkaline hydrolysate using an aromatic-selective adsorption resin. *Carbohydrate Polymers*, 225(April), 115216. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115216>
- Yu, Y., & Christopher, L. P. (2017). Detoxification of hemicellulose-rich poplar hydrolysate by polymeric resins for improved ethanol fermentability. *Fuel*, 203, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.04.118>
- Zeitsch, K. J. J. (2000). *The Chemistry and Technology of Furfural and its Many By-Products. Sugar Series Vol. 13, Elsevier, The Netherlands (2000)* (1st Ed.). Amsterdam: Elsevier Science. [https://doi.org/10.1016/S1385-8947\(00\)00182-0](https://doi.org/10.1016/S1385-8947(00)00182-0)
- Zhang, J., & Hu, B. (2013). Liquid-Liquid Extraction (LLE). In S. Ramaswamy, H. Huang, & B. V. Ramarao (Eds.), *Separation and Purification Technologies in Biorefineries* (1st. Ed, pp. 61–78). Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118493441.ch3>
- Zhang, K., Pei, Z., & Wang, D. (2016). Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. *Bioresource Technology*, 199, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.102>
- Zhang, Y., Pitkänen, L., Douglade, J., Tenkanen, M., Remond, C., & Joly, C. (2011). Wheat bran arabinoxylans: Chemical structure and film properties of three isolated fractions. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 852–859. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.05.036>
- Zhao, C., Shao, Q., & Chundawat, S. P. S. (2020). Recent advances on ammonia-based pretreatments of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 298(November 2019), 122446. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122446>
- Zhao, Xin-qing, Zi, L., Bai, F., Lin, H., Hao, X., Yue, G.-J., & Ho, N. W. Y. (2012). Bioethanol from Lignocellulosic Biomass. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* (, 128(December 2011), 25–51. https://doi.org/10.1007/10_2011_129
- Zhao, Xuebing, Li, S., Wu, R., & Liu, D. (2017). Organosolv fractionating pre-treatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification: chemistry, kinetics, and substrate structures. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 11, 567–590. <https://doi.org/10.1002/bbb.1768>; Biofuels, Bioprod. Bioref. 11:567–590 (2017)
- Zhao, Xuebing, Zhang, L., & Liu, D. (2012). Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of

different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose Xuebing. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(5), 561–579. <https://doi.org/10.1002/bbb.1350>

Zheng, J., & Rehmann, L. (2014). Extrusion pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 18967–18984. <https://doi.org/10.3390/ijms151018967>

Zhu, J. Y., Pan, X., & Zalesny, R. S. (2010). Pretreatment of woody biomass for biofuel production: energy efficiency, technologies, and recalcitrance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 847–857. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2654-8>

Ziesig, R., Tomani, P., & Theliander, H. (2014). Production of a pure lignin product part 2: Separation of lignin from membrane filtration permeates of black liquor. *Cellulose Chemistry and Technology*, 48(9–10), 805–811.