

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON ETANOL- ÁCIDO  
E HIDRÓLISIS A LA MICROALGA *Chaetocerus gracilis* PARA LA  
OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.**

**LUIS CARLOS ARIAS CABALLERO  
GERSON YAMID RAMÍREZ CABALLERO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2010**

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON ETANOL- ÁCIDO  
E HIDRÓLISIS A LA MICROALGA *Chaetocerus gracilis* PARA LA  
OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.**

**LUIS CARLOS ARIAS CABALLERO  
GERSON YAMID RAMÍREZ CABALLERO**

**Trabajo de grado en la modalidad de investigación, presentado para optar  
al título de Ingeniero Químico**

**Directores**

**VIATCHESLAV KAFAROV KAFAROV  
Ingeniero Químico Ph. D**

**Codirector**

**LAURA LILIANA GARZÓN FUENTES  
Ingeniero Químico Msc.  
Instituto Colombiano de Petróleo**

**ANDRÉS FERNANDO BARAJAS  
Biólogo**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2010**

## CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN	
1. MARCO TEÓRICO	2
1.1. Microalga	2
1.1.1. Fases de crecimiento	2
1.1.2. Composición y estructura	3
1.1.3. Carbohidratos en microalgas	4
1.2. <i>Chaetoceros gracilis</i> (Pantocsek 1892)	5
1.2.1. Caracterización de la biomasa	5
1.3. Pretratamiento	6
1.4. Hidrólisis	7
1.4.1. Hidrólisis ácida.	8
1.5. Métodos Analíticos para la Cuantificación De Azúcares Reductores (Método del ácido dinitro-3,5 salicílico).	9
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	10
2.1. Materiales	10
2.1.1. Materia prima	10
2.1.2. Reactivos	10
2.1.3. Equipos	10
2.2. Procedimiento experimental.	11
2.2.1. Secado Materia Prima	12
2.2.2. Pretratamiento Etanol- Ácido	12
2.2.2.1. Preparación del licor	12
2.2.2.2. Mezcla Licor-Biomasa	12
2.2.2.3. Autoclavado	12
2.2.3. Separación del licor negro	12

2.2.4. Determinación de la concentración de azúcares reductores totales	12
ART	
2.2.4.1. Cuantificación de los ART	12
2.2.5. Hidrólisis ácida	13
2.2.5.1. Prehidrólisis	13
2.2.5.2. Hidrólisis	13
2.2.6. Separación del hidrolizado	13
3. RESULTADOS Y ANALISIS	14
3.1. Calculo de la humedad del alga <i>Chaetoceros gracilis</i>	14
3.2. Hidrólisis de <i>Chaetoceros gracilis</i> sin pretratar.	14
3.3. Estudio del efecto del floculante en la medición de la absorbancia.	14
3.4. Estudio de la relación de biomasa en el licor.	15
3.5. Diseño experimental de los pretratamientos.	15
3.5.1. Diseño factorial $2^3$ del pretratamiento con Etanol- Acido	15
3.6. Análisis de los efectos principales e interacción de las variables.	18
3.6.1 Curvas de nivel etanol-tiempo de reacción.	18
3.6.2 Curvas de nivel $H_2SO_4$ -tiempo de reacción.	18
3.6.3. Curvas de Nivel $H_2SO_4$ -etanol	19
3.6.4. Significancia de las variables.	20
3.7. Segundo diseño experimental para el pretratamiento.	20
3.7.1. Estudio del rango de tiempo de reacción.	20
3.7.2. Estudio del rango de concentración de etanol.	20
3.7.3. Estudio del efecto del $H_2SO_4$	22
3.7.4. Diseño experimental $2^2$ central compuesto.	22
3.7.4.1. Efecto de la interacción entre las variables.	23
3.7.4.2. Significancia de las variables.	25
CONCLUSIONES	26
RECOMENDACIONES	27

BIBLIOGRAFIA

28

ANEXOS

32

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Reacción de hidrólisis de un disacárido.	8
Figura 2. Reacción entre los azúcares y el ácido 3,5-dinitrosalicílico.	10
Figura 3. Procedimiento experimental	11
Figura 4. Efecto del floculante sobre la medición de absorbancia.	14
Figura 5. Porcentaje de masa solubilizada en cada ensayo.	16
Figura 6. Masa pretratada antes y después de la hidrólisis.	17
Figura 7. Curva de nivel Etanol-Tiempo para una concentración de $\text{H}_2\text{SO}_4$ de 0.025M.	18
Figura 8. Curva de nivel $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Tiempo de reacción para una concentración de etanol de 60% v/v.	19
Figura 9. Curva de nivel $\text{H}_2\text{SO}_4$ - Etanol, para un tiempo de reacción de 45 minutos.	19
Figura 10. Diagrama de Pareto de los efectos de las variables estandarizadas.	20
Figura 11. Superficie de respuesta del diseño experimental $2^2$ con punto central y su repetición.	24
Figura 12. Diagrama de Pareto de los efectos de las variables estandarizadas para el diseño experimental $2^2$ con 2 puntos central.	25

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición para diferentes especies de algas.	4
Tabla 2. Clasificación <i>Chaetoceros gracilis</i>	5
Tabla 3. Caracterización de la <i>Ch. gracilis</i> floculada con 150 ppm realizada en los laboratorios del Instituto Colombiano de Petróleo.	6
Tabla 4. Tipos de pretratamientos	7
Tabla 5. Reactivos utilizados en los experimentos.	10
Tabla 6. Rango de valores estudiados en el diseño factorial completo $2^3$	15
Tabla 7. Matriz de diseño factorial $2^3$ con dos puntos centrales.	16
Tabla 8. Matriz de diseño de experimentos con los resultados de masa de ART obtenidos.	17
Tabla 9. Pruebas del efecto de la variable tiempo sobre el pretratamiento.	20
Tabla 10. Pruebas del efecto del etanol sobre el pretratamiento.	21
Tabla 11. Pruebas del efecto del $H_2SO_4$ sobre el proceso.	22
Tabla 12. Rango de valores en el diseño experimental $2^2$ central compuesto.	22
Tabla 13. Matriz del diseño experimental $2^2$ con 2 puntos central	23
Tabla 14. Matriz de diseño experimental con los resultados de la masa de ART liberada en cada una de las corridas.	24

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Medio f/2 (Guillard y Ryther 1962, Guillard 1975)	33
ANEXO B. Determinación de humedad en la microalga <i>Ch gracilis</i> .	35
ANEXO C. Método del Ácido Dinitrosalicílico (DNS)	36
ANEXO D. Construcción de la curva glucosa para el reactivo DNS	38
ANEXO E. Determinación de Carbohidratos Estructurales y Lignina en Biomasa.	40
ANEXO F. Curvas de nivel Etanol	61
ANEXO G. Curvas de Nivel H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Tiempo de reacción.	62
ANEXO H. Curvas de Nivel H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - Etanol	63

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores expresan sus agradecimientos a:

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER por habernos brindado un espacio para nuestra formación integral.

MINISTERIO DE AGRICULTURA por su apoyo económico.

INSTITUTO COLOMBIANO DEL PETRÓLEO por su acompañamiento y asesoría.

INSTITUTO MORROSQUILLO por suministrarnos las microalgas.

Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov por habernos brindado su confianza para desarrollar esta investigación.

Msc. Laura Garzón por su invaluable apoyo y orientaciones que permitieron encaminar de forma adecuada el proyecto.

Biól. Andrés Barajas por su compromiso y gestión para la obtención de recursos.

Don Eduardo y Wilson por su colaboración y asesoramiento.

A todas aquellas personas que nos brindaron su apoyo durante nuestra formación profesional.

A Dios que me ha bendecido y ha iluminado mi camino.  
A mi familia, en especial a mis padres Mariela y Luis, por su inmenso apoyo e  
incansable amor.  
Luis Carlos Arias Caballero.

A Dios que nunca me ha dejado caminar solo, aunque yo insista.  
A mis padres y hermanos por su invaluable e incansable amor y apoyo.

A Luis Carlos.

A mis otros, no menos importantes, amigos.

A todo aquel que ayudó a que esto se hiciera posible.

Muchas gracias.

GERSON YAMID RAMÍREZ CABALLERO

## RESUMEN

**Título:** ESTUDIO DEL EFECTO DEL PRETRATAMIENTO QUÍMICO ETANOL-ÁCIDO E HIDROLISIS A LA MICROALGA *Chaetoceros Gracilis* PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.

**Autores:** LUIS CARLOS ARIAS CABALLERO, GERSON YAMID RAMÍREZ CABALLERO\*\*.

**Palabras claves:** Microalgas, biomasa, pretratamiento etanol- ácido, hidrólisis, azúcares reductores totales (ART).

### **Descripción:**

Este trabajo desarrolló un método para la extracción de azúcares reductores totales (ART) a partir de la microalga *Chaetoceros Gracilis*, para utilizarlos en una posterior etapa de fermentación en el proceso de producción de bioetanol, trabajo contemplado en el proyecto del Ministerio de Agricultura código 2008D32006-6710: Bioprospección de Microalgas Colombianas para la Producción de Biodiesel. Basado en el proceso de producción de bioetanol de segunda generación (a partir de material lignocelulósico) se sometieron las microalgas *Chaetoceros Gracilis* a un pretratamiento químico, en el cual, la pared celular, donde se concentra la mayor cantidad de carbohidratos, sea destruida, extrayendo así los azúcares reductores presentes. Durante el proceso la microalga se pretrató con una mezcla de etanol y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a 121°C y 29 psig, donde se estudiaron variables como Concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (M), concentración de Etanol (%v/v), y tiempo de pretratamiento (min) con diferentes valores; la variable de respuesta fue el porcentaje de ART en el licor de pretratamiento, utilizándose un diseño lineal y posterior diseño 2<sup>2</sup> central compuesto como herramienta de análisis. Los resultados muestran que altos valores de las variables tiempo de reacción y concentración de ácido, favorecen el rompimiento de la pared celular y extracción de azúcares reductores; mientras que el etanol no favorece la extracción de los ART.

---

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director PhD. Viatcheslav Kafarov, Codirectores: Biólogo Andrés Fernando Barajas Solano, Msc. Laura Liliana Garzón Fuentes ICP-ECOPETROL

## ABSTRACT

**Title:** STUDY OF EFFECT OF CHEMICAL PRETREATMENT ETHANOL-ACID AND HYDROLYSIS FOR MICROALGAE *Chaetoceros Gracilis* TO OBTAINING REDUCING SUGARS \*

**Authors:** LUIS CARLOS ARIAS CABALLERO, GERSON YAMID RAMÍREZ CABALLERO \*\*.

**Keywords:** Microalgae, biomass, Ethanol-Acid pretreatment, hydrolysis, Total reducing sugars.

### **Description:**

This paper presents an alternative for the extraction of total reducing sugars from microalgae *Chaetoceros Gracilis*, for its use at a later stage of fermentation included in process of bioethanol production, this work is part of the project of Agriculture Ministry 2008D32006-6710: "Bioprospección de Microalgas Colombianas para la Producción de Biodiesel". Based on the production process of second generation biofuels, microalgae *Chaetoceros gracilis* were subjected to a chemical pretreatment in which the cell wall, which concentrates the largest amount of carbohydrates, is destroyed, removing the reducing sugars present. During the process the biomass was treated with a mixture of ethanol and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, at 121°C and 29 psig, where were studied variables such as H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration (M) ethanol concentration (% v/v) and pretreatment time (min); the response variable was the percentage of ART in the pretreatment, using a linear design and latter a central composite 2<sup>2</sup> desing as an analysis tool. The results show that H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and pretreatment time has a positive effect on the pretreatment, destroy the cell membrane and allow the release of reducing sugars, however ethanol has an negative effect on the reducing sugars extraction.

---

\* Graduate Project

\*\* Faculty of Physicochemical Engineering, Chemical Engineering School. Director Dr. Sc.. Viatcheslav Kafarov Kafarov, Codirectors Msc. Laura Liliana Garzón Cifuentes. ICP-ECOPETROL. Biologist Andres Barajas Solano.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la comunidad científica está enfocando sus esfuerzos en el desarrollo de nuevos procesos de producción de biocombustibles que usen biomasa como recurso que reemplace gradualmente el uso de combustibles fósiles. Recientemente se viene estudiando el cultivo de microalgas como una opción con gran potencial para la producción de combustibles líquidos como el etanol ya que reducen las emisiones de gases de efecto invernadero y presentan una productividad muy elevada [1, 2].

Las microalgas son organismos acuáticos que capturan luz solar y el dióxido de carbono para realizar la fotosíntesis y así producir energía, al contrario que la soja u otros cultivos usados para la producción de biocombustibles, las Microalgas no necesitan extensos terrenos de cultivo ya que pueden crecer en casi cualquier espacio, y lo hacen de forma muy rápida, de este modo que podrían desarrollarse en tanques en cualquier localización. Además de su importante contenido de lípidos (7-23%) [3], que podría ser utilizados en la producción de biodiesel [4], las Microalgas contienen una cantidad de carbohidratos, entre 5 y 23% [3], que pueden ser procesados para la producción de bioetanol. Partiendo de esta idea se planteó desarrollar un pretratamiento químico a la microalga con el objetivo de facilitar la obtención de azúcares reductores, contemplado dentro del proyecto del Ministerio de Agricultura código 2008D32006-6710: Bioprospección de Microalgas Colombianas para la Producción de Biodiesel.

## 1. MARCO TEÓRICO

Las tecnologías existentes para la producción de bioetanol se basan en la fermentación de la glucosa, que a la vez es obtenido del procesamiento industrial de vegetales ricos en azúcares, almidones o celulosa [5]; los cuales en su mayoría son parte importante en la dieta de las personas. Estas tecnologías afectan las reservas de alimentos, además generan grandes impactos ambientales a sus ecosistemas, ya que se requieren elevadas extensiones de tierra que tendrían que destinarse a su cultivo [6]. Por esta razón se están estudiando nuevas posibilidades que hagan viable la producción de bioetanol, como es el caso de las microalgas las cuales ya se han utilizado como materia prima para la producción de energías renovables incluyendo metano producido por digestión anaerobia de biomasa [7, 8]; biodiesel a partir de aceite de microalga [4, 9, 10, 11, 12, 13, 14]; y biohidrógeno producido foto-biológicamente [15, 16, 17.].

### 1.1. Microalgas

Son organismos protistas fotosintéticos de morfología y fisiología extraordinariamente variadas, con una simple estructura celular que los hace los mas eficientes conversores de energía solar. Están ampliamente distribuidas en la biosfera, viven en aguas dulces y marinas, en ambientes terrestres y subterráneos; algunas viven en la interface entre el agua y la atmósfera, viven en varios protozoos y en el interior de otras plantas. También viven en el suelo y en superficies de tierra, en nieves persistentes y en las rocas antárticas [18].

Principalmente las Microalgas son autotróficas y solo requieren para su crecimiento de luz, CO<sub>2</sub>, nutrientes inorgánicos y agua; con un rendimiento por hectárea unas 30 veces superior al maíz o la soya [19]. Además, las Microalgas

tienen cantidades importantes de lípidos, clorofila, carotenoides, vitaminas, minerales y otros pigmentos [20, 21].

#### **1.1.1. Fases de crecimiento:**

Durante el crecimiento de las Microalgas en un sistema cerrado, estas presentan 7 fases de crecimiento [18]:

- Adaptación: durante esta etapa el cultivo de microalgas se ajusta a las condiciones iniciales del medio donde se inocula, las cuales son diferentes a las de donde fueron tomadas.
- Crecimiento acelerado y crecimiento exponencial: durante esta fase la intensidad de la luz no es limitada y hay cambios en la concentración de nutrientes y las células se dividen a una velocidad constante.
- Disminución del crecimiento logarítmico (lineal): en esta fase las células se han multiplicado a tal punto que entre ellas se obstruyen para captar la luz.
- Fase estacionaria: durante esta fase hay un equilibrio entre la pérdida y la generación de biomasa, además, se acumulan las biomoléculas en la célula.
- Muerte acelerada: en esta etapa se marca por la muerte de las células debido a las condiciones desfavorables del ambiente y el suplemento limitado de luz y nutrientes.
- Muerte logarítmica: finalmente la velocidad de mortalidad se vuelve exponencial, produciendo la completa descomposición de la población.

#### **1.1.2. Composición y estructura**

Las Microalgas tienen una proporción de proteínas de 6-52%, de lípidos de 7-23% y carbohidratos de 5-23%, de los cuales se pueden observar algunos ejemplos en la tabla 1; estos porcentajes dependen de la especie [3] y la composición bioquímica puede cambiar dependiendo de las condiciones ambientales y/o con la velocidad de crecimiento, además de la fase de su ciclo de vida en que se encuentre [22].

Los lípidos y carbohidratos son considerados como el combustible de la célula [23], además cumplen una importante función como componentes estructurales de la membrana celular [24]. Los lípidos presentes en las Microalgas pueden ser transesterificados para producir biodiesel [4, 9, 10, 11, 12, 13, 14] y los carbohidratos pueden ser hidrolizados y fermentados para la producción de bioetanol.

**Tabla 1.** Composición para diferentes especies de algas [25].

<b>Especies</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>Lípidos (%)</b>	<b>Carbohidratos (%)</b>
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-20	14-18
<i>Chaetoceros gracilis</i>	9-25	1-5	14-20
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	21	17
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	2	26
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	14-22	12-17
<i>Dunaliella salina</i>	57	6	32
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	6-7	13-16
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	4-9	8-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	12-14	10-17

### 1.1.1. Carbohidratos en microalgas

La composición de carbohidratos en las microalgas no es muy detallada. Los monosacáridos y oligosacáridos constituyen del 45-90% de la fracción total de carbohidratos. Los principales azúcares son la glucosa, galactosa, manosa, ribosa, con otros azúcares en proporciones variables. El perfil de carbohidratos varía significativamente en cada especie de Microalgas, como también depende de la etapa de crecimiento en que se encuentre [26].

Los carbohidratos presentes en las células de diatomeas son de tres tipos: polisacáridos que cumplen la función de reserva de energía, polisacáridos que constituyen elementos fibrosos en las paredes de las células y polisacáridos que forman la matriz amorfa de la pared celular incluyendo lo que frecuentemente se describe como mucílago y polisacáridos extracelulares. De este último tipo de polisacáridos en las microalgas, se puede decir que están compuestos en la especie *Chaetoceros* por glucosa, xilosa, rhamosa, fucosa, manosa y galactosa [27].

La forma y concentración de nitrógeno afectan el contenido de carbohidratos por la célula, cuando las concentraciones de nitrógeno se incrementan, el contenido total de carbohidratos de los cultivos se incrementa proporcionalmente a la concentración de nitrógeno. La intensidad de la luz es otro factor que afecta la composición bioquímica de las algas, se ha observado que la producción de carbohidratos se incrementa de manera proporcional a la intensidad de la luz [26].

### 1.2. *Chaetoceros gracilis* (Pantocsek 1892)

*Chaetoceros gracilis* (Pantocsek 1892), esta clasificada según la Tabla 2.

**Tabla 2.** Clasificación *Chaetoceros gracilis*.

<b>Empire</b>	<i>Eukaryota</i>
<b>Kingdom</b>	<i>Chromista</i>
<b>Subkingdow</b>	<i>Chromobiota</i>
<b>Infrakingdow</b>	<i>Heterokonta</i>
<b>Phylum</b>	<i>Bacillariophyta</i>
<b>Class</b>	<i>Coscinodiscophyceae</i>
<b>Subclass</b>	<i>Chaetocetotophyceae</i>
<b>Order</b>	<i>Chaetocerotales</i>
<b>Family</b>	<i>Chaetocerotaceae</i>
<b>Genus</b>	<i>Chaetoceros</i>

#### 1.2.1. Caracterización de la biomasa

La Universidad de Antioquia realizó la caracterización de las biomasa seca de *Ch. gracilis*, cosechada por floculación. Los resultados presentados en la tabla 3 indican que la biomasa floculada con 150 ppm de FeCl<sub>3</sub> presenta un contenido de ceniza (mayor al 60%) como resultado de la absorción y precipitación de hierro junto con la biomasa floculada (43% de la biomasa seca corresponde a hierro y 4% a silicio), 17% de carbohidratos (Extracto no nitrogenado), 12% de humedad, 9% de proteína y muy bajo contenido de lípidos (inferior al 1% de la biomasa seca). Estos resultados evidenciaron la necesidad de disminuir la dosis de floculante o buscar un método alternativo de concentración de la biomasa que la deje libre de contaminantes.

**Tabla 3.** Caracterización de *Ch. gracilis* floculada con 150 ppm.

<b>Análisis</b>	<b>Resultado</b>
Cenizas, %	59,88
Humedad, %	13,3
Proteína, %	9,88
Bulk, Roca total	NaCl, CaCl <sub>2</sub>
Silicio,%	4,64
Hierro,%	43,07
Calcio, %	0,7264
Nitrógeno, %	1,52
Pérdidas a 525 C-LC	37,75

### **1.3. Pretratamiento**

La etapa de pretratamiento se requiere para facilitar el acceso a los componentes de la célula para el posterior ataque químico [28]. El pretratamiento permite que los rendimientos de la hidrólisis de celulosa aumenten de menos del 20% de los rendimientos teóricos a valores mayores al 90%. La elección de una tecnología de pretratamiento está limitada al costo y el rendimiento de las siguientes etapas (hidrólisis y fermentación) [29]. El pretratamiento ideal se caracteriza porque no requiere de una reducción significativa de tamaño en la materia prima que se utiliza, no proporciona inhibidores para la fermentación, el tamaño y los costos de los reactores son

moderados; no produce residuos sólidos, y presenta un bajo consumo energético [30], En la tabla 4 se presentan los diferentes tipos de pretratamiento, de los cuales solo el pretratamiento de tipo fisicoquímico tiene precedentes en microalga [7]. Para el presente trabajo se partió de un pretratamiento de tipo químico, basado en una mezcla de Etanol-ácido, de las cuales el Etanol es recuperable e inofensivo para los equipos a las condiciones de trabajo, y el ácido se trabaja en cantidades moderadas.

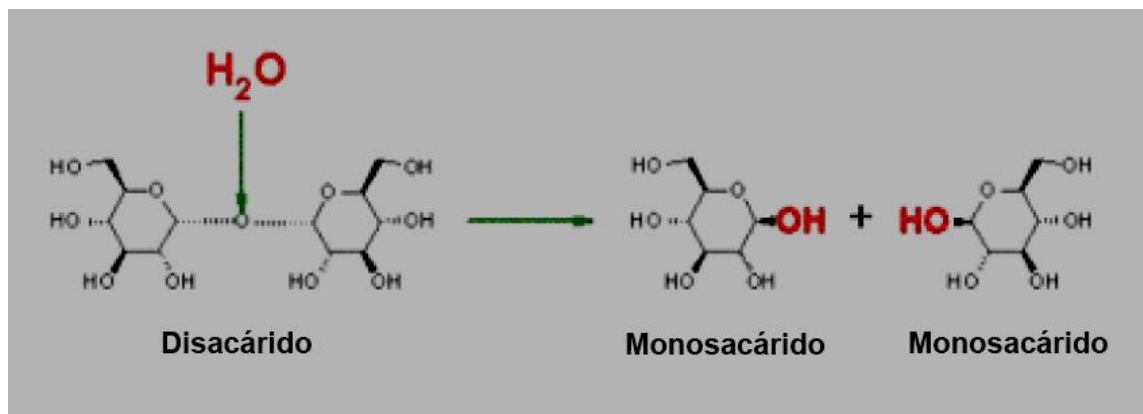
**Tabla 4.** Tipos de pretratamientos [31].

<b>Físicos</b>	Mecánicos	Reducción de astillas, trituración, molienda.
	Térmicos	Pirólisis ( $T > 300^{\circ}\text{C}$ )
	Radioactivos	Irradiación de alta energía
<b>Químicos</b>	Oxidantes	Ozonólisis, $\text{H}_2$ .
	Gases	$\text{ClO}_2$ , $\text{NO}_2$ , $\text{O}_2$ .
	Extracción con órgano-solventes catalizada o no catalizada.	Etanol, Metanol Catalizadores: $\text{H}_2\text{SO}_4$ , $\text{NaOH}$ .
<b>Fisicoquímicos</b>	Autohidrólisis	Vapor
	Explosión por vapor.	Vapor saturado a $160\text{-}260^{\circ}\text{C}$ , $p=0.69\text{-}4.85$ MPa por varios segundos o minutos, luego descompresión hasta atmosférica.
<b>Biológicos</b>	Microorganismos degradadores de biomasa	Maceración pectinolítica.
		Maceración xilanolítica
		Biopulpado

#### 1.4. Hidrólisis

La hidrólisis es la reacción química del agua con alguna sustancia. En el caso de un polisacárido, la hidrólisis del enlace glucosídico se lleva a cabo mediante la disociación de una molécula de agua del medio, donde el hidrógeno del agua se une al oxígeno del extremo de una de las moléculas de azúcar y el  $-OH$  se une al carbono libre del otro residuo de azúcar [32].

El resultado de esta reacción, es la liberación de un monosacárido y el resto de la molécula que puede ser monosacárido si se trata de un disacárido o bien un polisacárido restante si se trata de un polisacárido mas complejo. En la figura 1 podemos apreciar la hidrólisis de un disacárido:



**Figura 1.** Reacción de hidrólisis de un disacárido [32].

#### 1.4.1. Hidrólisis ácida.

El proceso de hidrólisis ácida se puede considerar como un método antiguo. En 1890 Klason desarrolló un análisis para la determinación de la lignina, el cual es utilizado en la industria de la madera utilizando  $H_2SO_4$ , con una concentración de 72%, para disolver la fracción celulósica de la materia prima, dejando la lignina como residuo. La celulosa disuelta separada de la lignina es hidrolizada para obtener azúcares que luego se pueden fermentar [33]. El otro ácido que se utiliza es el ácido clorhídrico conocido en el proceso de Bergius, a concentraciones de 40%, el cual se neutraliza con soda cáustica.

En el proceso con ácido concentrado generalmente, se obtienen altas producciones de azúcar y etanol, sin embargo genera condiciones muy corrosivas, requiriendo aleaciones costosas especializadas como guarnición de

cerámica, lo que hace que los costos se incrementen reduciendo el potencial comercial para estos procesos [32].

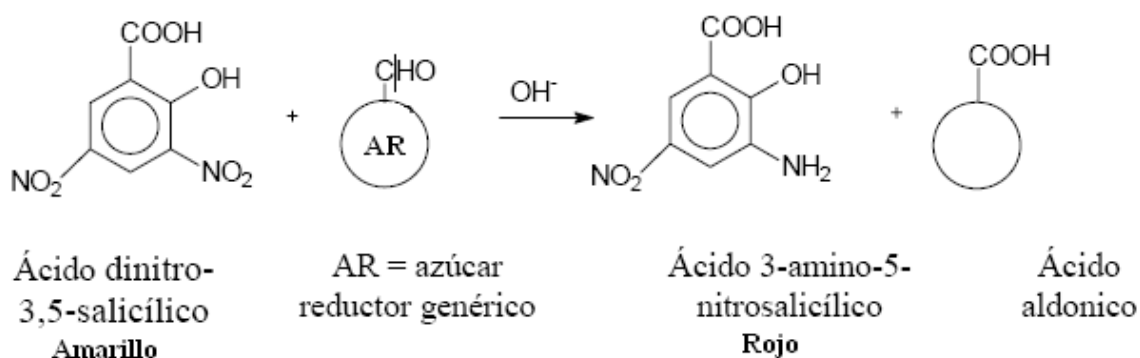
La tecnología para la hidrólisis ácida utilizando ácido sulfúrico diluido en presiones y temperaturas elevadas fue desarrollada por Scholler antes de la segunda guerra mundial, y fue probada en países como Alemania, Rusia y Estados Unidos, pero su implementación generaba grandes problemas de corrosión y altos costos de limpieza lo que limitaba su comercialización [34, 35, 36].

Dentro de los procesos de hidrólisis ácida más desarrollados, se encuentra el proceso de dos fases de Purdue, el cual utiliza la combinación de ácido diluido y ácido concentrado. El ácido diluido es usado bajo condiciones suaves para la pre-hidrólisis de la hemicelulosa, (donde el xilano es el principal componente) logrando altas recuperaciones de la xilosa al evitar o reducir su descomposición a furfural ( $C_5H_4O_2$ ). Mientras el ácido concentrado se utiliza para la extracción de la celulosa en donde el ácido destruye los enlaces de hidrógeno que unen las cadenas adyacentes a la glucosa anhidra perdiendo su estructura cristalina; de esta forma la celulosa aumenta su porosidad, facilita la introducción de agua en su estructura y presenta el efecto de hinchamiento [37,38].

Otra versión que se ha presentado sobre la hidrólisis ácida fue desarrollada en la universidad de Dartmouth [39,40], la cual consta de una hidrólisis en dos fases del ácido diluido a altas temperaturas por tiempos muy cortos. La primera etapa maneja un tiempo y temperatura ajustada para hidrolizar la hemicelulosa, mientras que la segunda etapa se fija en temperaturas más altas y tiempos de residencia más largos para hidrolizar la celulosa.

### **1.5 Métodos Analíticos para la Cuantificación de Azúcares Reductores (Método del ácido dinitro-3,5 salicílico)**

El método del ácido dinitro-3,5 salicílico descrito por Miller (1959), se basa en la reducción del ácido dinitro-3,5 salicílico a ácido 3-amino-5 nitro salicílico al mismo tiempo en el que el grupo aldehído del azúcar es oxidado al grupo carboxílico con el desenvolvimiento de la coloración rojiza leída espectrofotométricamente a 540nm.



**Figura 2.** Reacción entre los azúcares y el ácido 3,5-dinitrosalicílico [49].

## 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Materia prima

La microalga *Ch. gracilis* fue proporcionada por el Instituto Morrosquillo, quienes la cultivaron en tanques abiertos de 1m<sup>3</sup>, durante 10 días en medio F/2 (Anexo A), y fue floculada, para su recolección, con 150 ppm de FeCl<sub>3</sub> y secada a exposición del sol.

#### 2.1.2. Reactivos

En los experimentos realizados se utilizó agua destilada y los reactivos enlistados en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Reactivos utilizados en los experimentos.

Reactivo	Fórmula Molecular	Masa molecular(g.mol <sup>-1</sup> )
Ácido Sulfúrico	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	98,08
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	46,07
Ácido di-nitro-3,5-salicílico (DNS)	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	228,12
Hidróxido de sodio	NaOH	39,98
Hexano	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	86,30
Carbonato de Calcio	CaCO <sub>3</sub>	100,10
Tartrato de Sodio y Potasio	KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> *4H <sub>2</sub> O	282,22
D-(+)- glucosa	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180,16

### 2.1.3. Equipos

Los equipos utilizados para el desarrollo de los experimentos fueron:

- Espectrofotómetro marca Pharo 300 de Merk.
- Centrifuga de pie, modelo 5-25, marca M.L.W.
- Balanza analítica marca Precisa Gravimetrics AG
- Autoclave cilíndrica de 25 Litros Mod 25-X
- pH-metro Schooh-Intruments Gmbh.
- Estufa con recirculación de aire WTC, marca Binder
- Bomba de inmersión serie 305335 marca Cole-Parmer
- Micropipetas.
- Plancha de calentamiento.
- Rotoevaporador marca Hahnshin scientific Co.
- Horno mufla modelo L-100, marca M.L.W.

### 2.2. Procedimiento Experimental

El procedimiento experimental desarrollado se presenta en la figura 3.

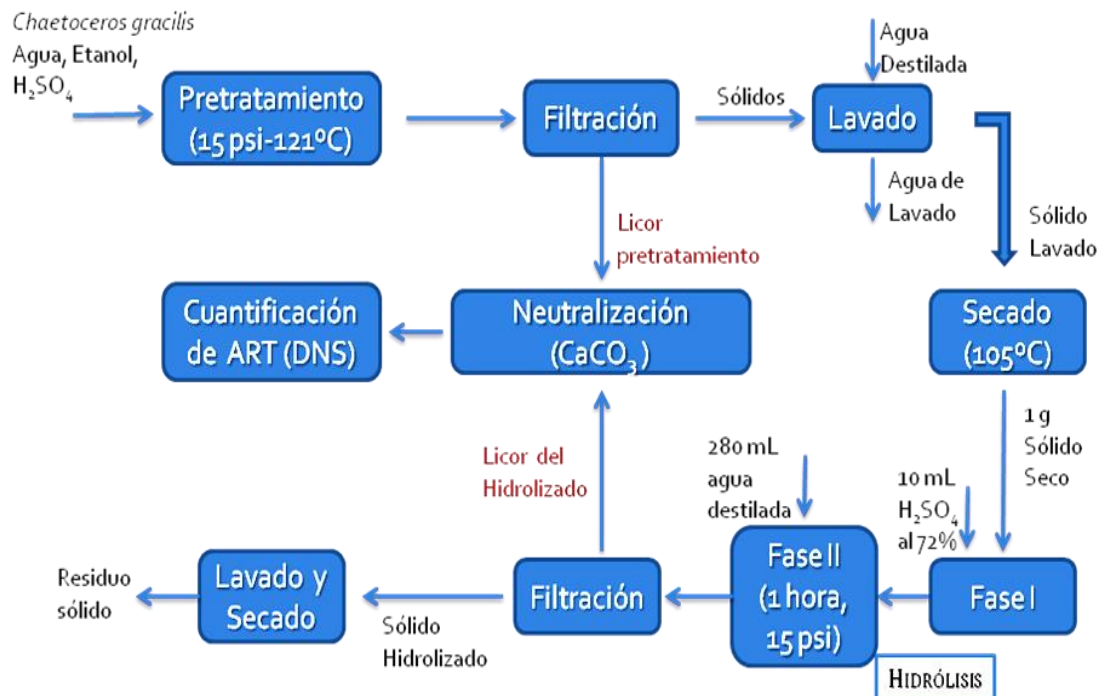


Figura 3. Procedimiento experimental

### **2.2.1. Secado Materia Prima**

Se agrega floculante ( $\text{FeCl}_3$ ) a la microalga *Ch. gracilis* en suspensión, después de que precipite se separa y se expone al sol.

### **2.2.2. Pretratamiento Etanol- Ácido**

Se lleva a cabo en un autoclave a 15psi-121°C durante tiempos variables de acuerdo al diseño de experimentos.

#### **2.2.2.1. Preparación del licor**

Se prepara una solución de 200 ml de etanol, ácido sulfúrico y agua destilada en concentraciones de acuerdo al diseño de experimentos.

#### **2.2.2.2. Mezcla Licor-Biomasa**

Al licor se le adiciona 20g de biomasa y se lleva al autoclave.

#### **2.2.2.3. Autoclavado**

El proceso se realiza a 15psi-121°C durante el tiempo que corresponda a cada corrida según el diseño experimental.

### **2.2.3. Separación del licor negro**

Se centrifuga la solución que sale de la autoclave a 5000 rpm durante 15 min. Posteriormente se toman muestras del licor para su análisis de azúcares reductores totales (ART), se realizan lavadas a los sólidos y se ponen a secar en la estufa según la norma NREL/TP-510-42621 (Anexo B).

### **2.2.4. Determinación de la concentración de azúcares reductores totales (ART)**

Las concentraciones de azúcares reductores totales (ART) fueron determinadas de acuerdo con el método del ácido Dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959) (Referirse al Anexo C).

#### **2.2.4.1. Cuantificación de los ART**

Para la cuantificación de los ART, se adicionó 1,0 mL de las muestras de cada tubo de ensayo y 1,0 mL de DNS. Los tubos fueron mantenidos en un baño a 95°C por 5 minutos para el desarrollo de la coloración rojiza. Después de este tiempo reaccional, las muestras fueron enfriadas inmediatamente por la inmersión de los tubos en un baño de hielo, adicionando enseguida 10mL de agua destilada. Los tubos fueron agitados para homogenizar la solución y las lecturas de absorbancia efectuadas en el espectrofotómetro. Para calibrar el espectrofotómetro, se preparó un tubo donde un volumen de la muestra fue sustituido por agua destilada, el cual fue llamado tubo blanco de reacción.

### **2.2.5. Hidrólisis ácida**

Este procedimiento se realiza de acuerdo al numeral 10.1 la norma NREL/TP-510-42618 (Anexo E); este procedimiento consta de dos fases y se hizo con el fin de liberar los azúcares reductores totales en el sólido pretratado para su cuantificación

#### **2.2.5.1. Prehidrólisis**

Se pesa 1,0 g de muestra, se mezcla en un tubo de ensayo con 10 mL de solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72%, en un baño de agua a 30°C, agitando cada 10 minutos durante una hora.

#### **2.2.5.2. Hidrólisis:**

Se diluye la mezcla con 280 mL de agua destilada, se autoclava a 15 psi durante una hora.

### **2.2.6. Separación del hidrolizado:**

Se filtra al vacío en papel previamente seco y pesado, se toma muestra del licor del hidrolizado para cuantificación de ART y el papel de filtro se pone a secar en la estufa siguiendo la norma NREL/TP-510-42621 (Anexo B).

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

#### 3.1. Cálculo de la humedad de Microalga *Chaetoceros gracilis*

Se pesó 1 g de *Ch gracilis*, se llevó al horno por 48 horas hasta peso constante siguiendo el procedimiento del Anexo B. Al desarrollarse por triplicado se obtuvo una humedad de  $\pm 14,84\%$  la cual se tuvo en cuenta en todos los cálculos.

#### 3.2. Hidrólisis de *Ch. gracilis* sin pretratar.

Se realizó hidrólisis a una muestra de *Ch. gracilis* sin pretratar siguiendo el procedimiento del numeral 2.2.5., obteniendo una concentración de 17% g ART/g de biomasa seca.

#### 3.3. Estudio del efecto del floculante en la medición de la absorbancia.

Se realizaron pruebas con concentraciones de 50, 150 y 300 ppm de  $\text{FeCl}_3$  y 200 ppm de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  para observar como afecta la medición de la absorbancia como se observa en la Figura 4, donde se observa que no influye sobre la medición de absorbancia.

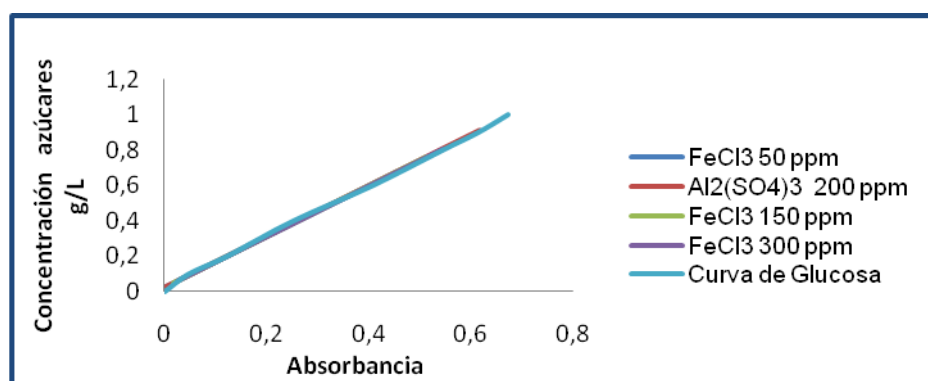


Figura 4. Efecto del floculante sobre la medición de absorbancia.

### 3.4. Estudio de la relación de biomasa en el licor.

Se realizaron dos pruebas con la misma composición de la mezcla del pretratamiento ( $H_2SO_4$  0.025 M, Etanol 60% v/v) y durante un mismo tiempo de reacción (45 min), pero con diferente relación de sólidos 1:10 y 1:5 P:V y se observó que se obtienen mejores resultados con la relación de sólidos 1:10 P:V (2,79 g ART/g Biomasa Seca) que con la relación de sólidos 1:5 P:V (2,29 g ART/g Biomasa Seca).

### 3.5. Diseño experimental del pretratamiento.

#### 3.5.1. Diseño factorial completo $2^3$ del pretratamiento con Etanol- Acido

Se inició un diseño factorial donde fueron estudiadas 3 variables: Tiempo de reacción (min), concentración de  $H_2SO_4$  (M) y concentración de Etanol (% v/v). Se presentan en la Tabla 6 los valores de los niveles de cada una de las variables de los experimentos.

**Tabla 6.** Rango de valores estudiados en el diseño factorial completo  $2^3$

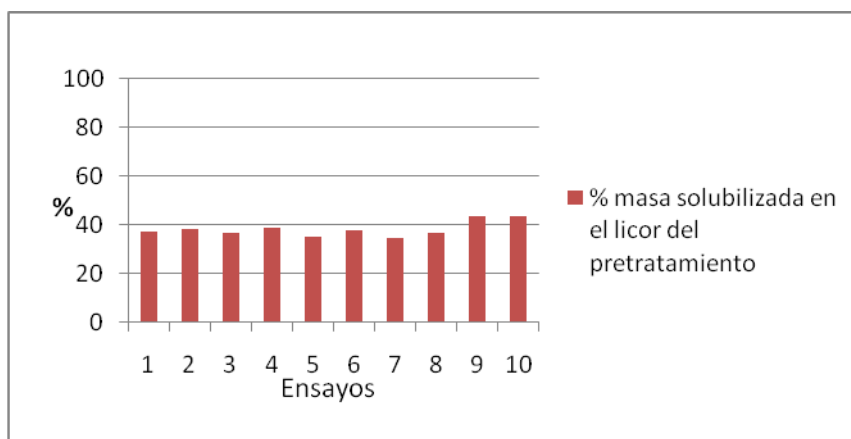
Factores	Niveles		
	-1	0	1
Tiempo de contacto (min)[41]	30	45	60
Concentración de $H_2SO_4$ (M)[42]	0,01	0,025	0,04
Concentración de Etanol (%v/v)[43, 44]	50	60	70

La metodología experimental del pretratamiento se realizó siguiendo el procedimiento del numeral 2.2. Las combinaciones de los rangos de las variables se encuentran en la tabla 7.

**Tabla 7.** Matriz de diseño factorial  $2^3$  con dos puntos centrales.

Ensayo	Tiempo (min)	Etanol (%v/v)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (M)
1	30,0	50,0	0,01
2	60,0	50,0	0,01
3	30,0	70,0	0,01
4	60,0	70,0	0,01
5	30,0	50,0	0,04
6	60,0	50,0	0,04
7	30,0	70,0	0,04
8	60,0	70,0	0,04
9 (C)	45,0	60,0	0,025
10 (C)	45,0	60,0	0,025

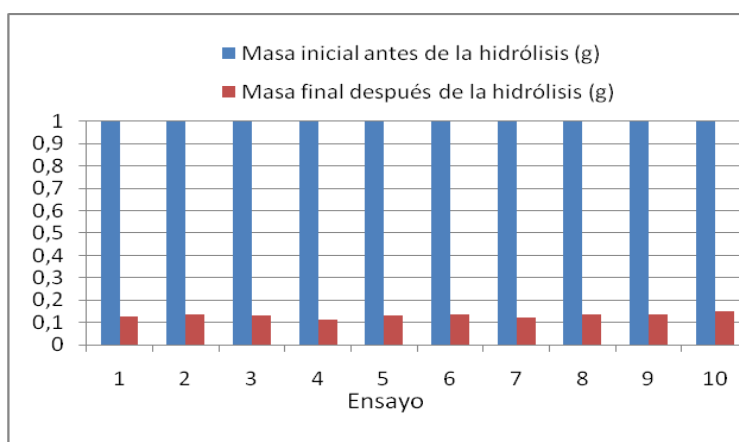
En la Figura 5 se puede observar que hubo solubilización de biomasa menores al 50% en todas las corridas del diseño experimental. En todas las corridas inicialmente había 20 g de biomasa en 200 ml de licor. Estas diferencias en la solubilización es debida a las diferencias en las condiciones del pretratamiento, beneficiando el mismo.



**Figura 5.** Porcentaje de masa solubilizada en cada ensayo.

En la Figura 6 se observa que en la hidrólisis se solubilizó más del 80 % de la masa inicial el cual correspondía a 1 g de masa pretratada, la menor cantidad de masa residual se encontró en la corrida 4, donde las condiciones de

pretratamiento eran mas drásticas ( 60 min, 70% Etanol y 0.01 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Las condiciones de los 10 ensayos se encuentran en la tabla 7.



**Figura 6.** Masa pretratada antes y después de la hidrólisis.

En la Tabla 8 se puede observar mayor liberación de ART en el licor del pretratamiento de las corridas 9 y 10 que corresponden a los puntos centrales, cuyas condiciones son de 45 minutos, 60 % de Etanol y 0,025 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**Tabla 8.** Matriz de diseño de experimentos con los resultados de masa de ART obtenidos.

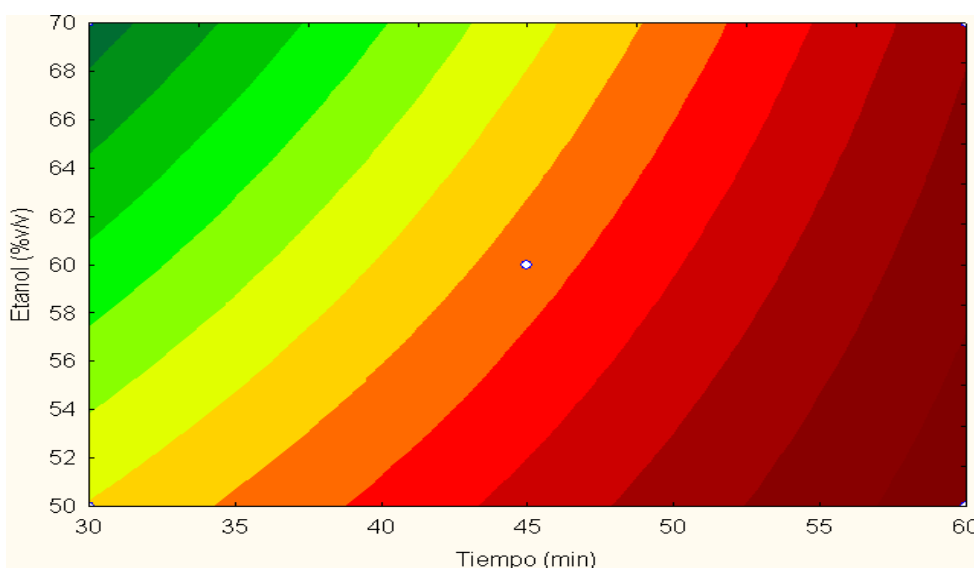
Corrida	Tiempo (min)	Etanol (%v/v)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (M)	%ART Licor negro (gART/gBSeca)	%ART Hidrolizado (gART/gBSeca)	%ART totales (gART/gBSeca)
1	30	50	0,01	0,39	4,63	5,02
2	60	50	0,01	1,08	7,04	8,12
3	30	70	0,01	0,44	8,11	8,55
4	60	70	0,01	0,88	5,81	6,69
5	30	50	0,04	2,32	4,12	6,44
6	60	50	0,04	2,46	5,02	7,48
7	30	70	0,04	0,84	4,76	5,60
8	60	70	0,04	2,39	5,64	8,03
9 (C)	45	60	0,025	2,80	5,66	8,46
10 (C)	45	60	0,025	2,79	5,65	8,44

### 3.6. Análisis de los efectos principales e interacción de las variables.

El análisis de los efectos principales e interacción de las variables fue realizado utilizando el software *STATISTICA 7.0* tomando como variable de respuesta las concentraciones de ART del pretratamiento y todo el análisis estadístico se desarrolló con un nivel de confianza de 90%.

#### 3.6.1. Curvas de Nivel Etanol-Tiempo de reacción.

En la figura 7 se observa una tendencia de mayor liberación de ART cuando se pretrata la microalga con altos tiempos de reacción y bajas concentraciones de etanol para una concentración de  $H_2SO_4$  de 0.025M (nivel medio). El mismo comportamiento se observa en la curvas de nivel etanol- tiempo, para los niveles máximo y mínimo de  $H_2SO_4$  (Anexo F).

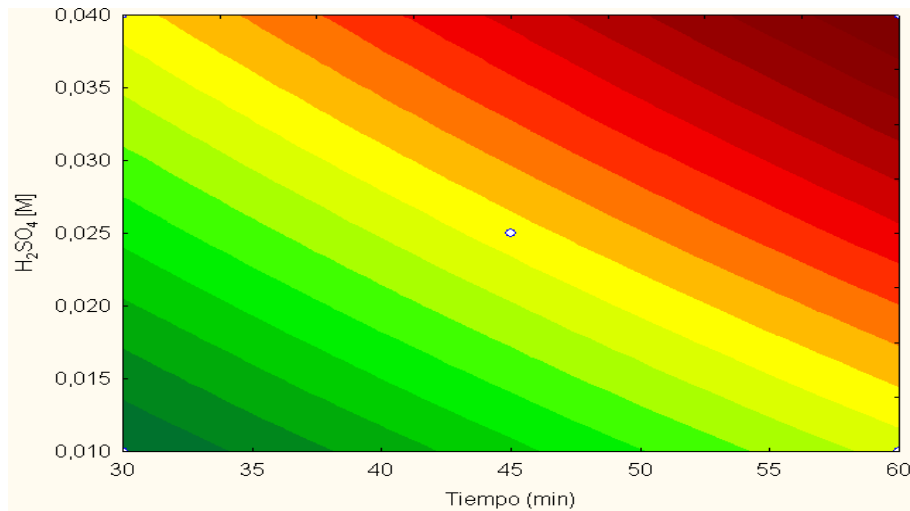


**Figura 7.** Curva de nivel Etanol-Tiempo para una concentración de  $H_2SO_4$  de 0.025M.

#### 3.6.2. Curvas de Nivel $H_2SO_4$ -Tiempo de reacción.

En la figura 8 se observa una mayor liberación de ART cuando se pretrata la microalga con altos tiempos de reacción, altas concentraciones de  $H_2SO_4$  para una concentración de Etanol de 60 %v/v. El mismo comportamiento se observa

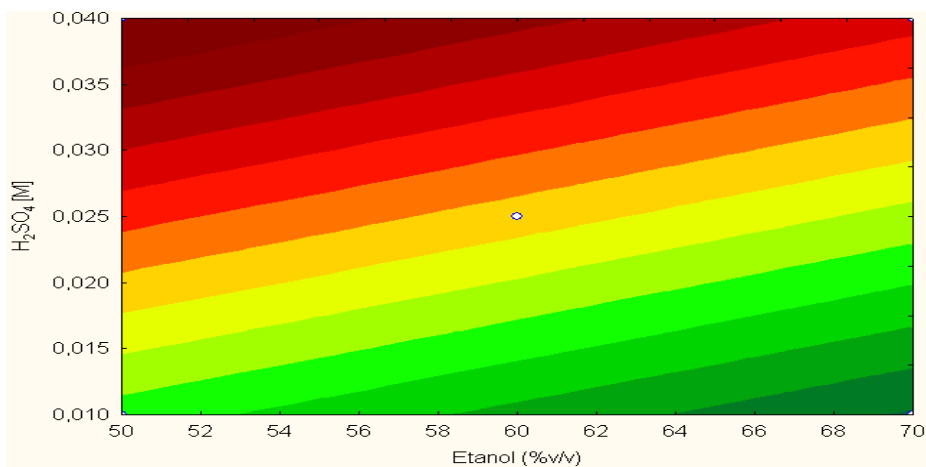
en la curvas de nivel  $H_2SO_4$ -tiempo, para los niveles máximo y mínimo de concentración de etanol (Anexo G).



**Figura 8.** Curva de nivel  $H_2SO_4$ -Tiempo de reacción para una concentración de etanol de 60% v/v.

### 3.6.3. Curvas de Nivel $H_2SO_4$ - Etanol

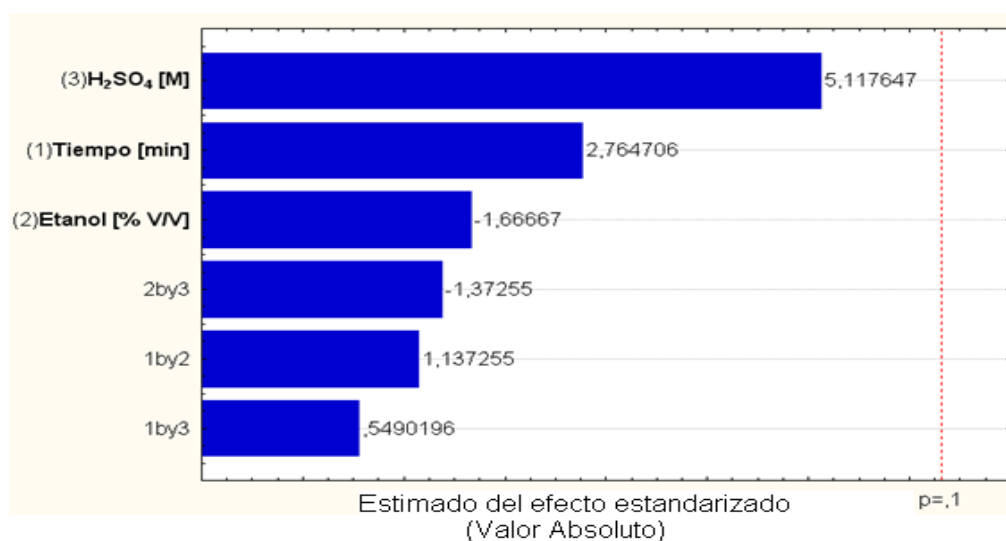
En la figura 9 se observa una mayor liberación de ART cuando se pretrata la microalga con el mínimo valor de concentración de etanol, altas concentraciones de  $H_2SO_4$ , a 45 minutos de reacción. El mismo comportamiento se observa en la curvas de nivel  $H_2SO_4$ - Etanol, para los niveles máximo y mínimo de tiempo de reacción (Anexo H).



**Figura 9.** Curva de nivel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>- Etanol, para un tiempo de reacción de 45 minutos.

### 3.6.4. Significancia de las variables

En la Figura 10, se presenta el diagrama de Pareto en el que se puede observar que ninguna de las variables ni las interacciones entre ellas es significativa para el proceso; por lo que se pasó a hacer otro diseño experimental.



**Figura 10.** Diagrama de Pareto de los efectos de las variables estandarizadas.

### 3.7. Segundo Diseño experimental para el pretratamiento

De acuerdo al diseño realizado anteriormente se pudo observar que se obtiene mayor liberación de ART durante el pretratamiento cuando se trabaja a bajas concentraciones de etanol (menor a 50%), altos tiempos de reacción y altas concentraciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Este diseño no permite ubicar un rango óptimo debido a que la mayor liberación de azúcares ocurre en el valor extremo de concentración de ácido estudiado, por lo que se decide realizar nuevos experimentos que permitan ubicar una mayor liberación de ART.

#### 3.7.1. Estudio del rango del tiempo de reacción.

Según el diseño inicial, la variable tiempo favorece el proceso liberando altos valores de ART, por lo que se hicieron pruebas para encontrar un rango adecuado de tiempo para realizar un posterior diseño experimental de optimización. Los resultados obtenidos, expuestos en la Tabla 9, mostraron que valores altos de tiempo siempre favorecían el proceso, sin embargo, para tiempos cercanos a 5 horas el licor se evaporaba y no se obtenía licor suficiente para realizar análisis de ART.

**Tabla 9.** Pruebas del efecto de la variable tiempo de reacción sobre el pretratamiento.

Tiempo [min]	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [M]	Etanol [% v/v]	%ART <sub>LICOR NEGRO</sub> (g/g BS)
60	0,08	50	5,30
180	0,08	50	6,79

### 3.7.2. Estudio del rango de la concentración de etanol.

De acuerdo al diseño anterior se observó que altas concentraciones de etanol influenciaban negativamente el pretratamiento por la menor liberación de ART, por tal razón, se hicieron pruebas con concentraciones menores de etanol manteniendo las otras variables constantes, como se muestra en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Pruebas del efecto del etanol sobre el pretratamiento.

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (M)	Etanol % v/v	Tiempo(min)	ART <sub>LICOR NEGRO</sub> (g *100/gBS)
0,08	20	30	2,35
0,08	0	30	2,36

Se puede observar en la Tabla 10 que se obtienen valores semejantes de ART para concentraciones de 0 y 20 %v/v de Etanol, de lo que se concluye que el

etanol no tiene ningún efecto positivo sobre la variable respuesta, por lo que se procedió a eliminarlo en la etapa de pretratamiento y se determinó trabajar con 100% agua como solvente.

### 3.7.3. Estudio del efecto del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

De acuerdo al diseño experimental inicial, valores altos de concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> favorecen el proceso, por tal razón se hicieron pruebas para encontrar un rango para utilizar en el segundo diseño, como se muestra en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Pruebas del efecto del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre el proceso.

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (M)	Etanol % v/v	Tiempo(min)	ART LICOR NEGRO (g *100/gBS)
0,08	0	30	2,35
0,15	0	30	1,78

Como se observa en la Tabla 11 el valor óptimo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se encuentra entre 0,08 y 0,15 M, ya que se espera que para valores mayores de 0,15 M disminuya la concentración de ART.

### 3.7.4. Diseño experimental 2<sup>2</sup> central compuesto

Para el segundo diseño experimental del proceso, se realizó un diseño experimental 2<sup>2</sup> central compuesto con 1 repetición en el punto central. Este método estadístico se eligió debido a que barre una mayor área de respuesta. El diseño estudió dos variables del proceso: Tiempo de reacción (min) y concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (M), y los rangos escogidos son los presentados en la tabla 12. El solvente utilizado fue agua pura.

**Tabla 12.** Rango de valores en el diseño experimental 2<sup>2</sup> central compuesto.

Factores	Niveles		
	-1	0	1
Concentración	0,080	0,115	0,150

de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (M).			
Tiempo (min)	60	150	240

Con los valores de la Tabla 12 se obtiene, en STATISTICA 7.0 se generan las combinaciones de los niveles para obtener los experimentos reportados en la tabla 13.

**Tabla 13.** Matriz del diseño experimental 2<sup>2</sup> con punto central y su repetición.

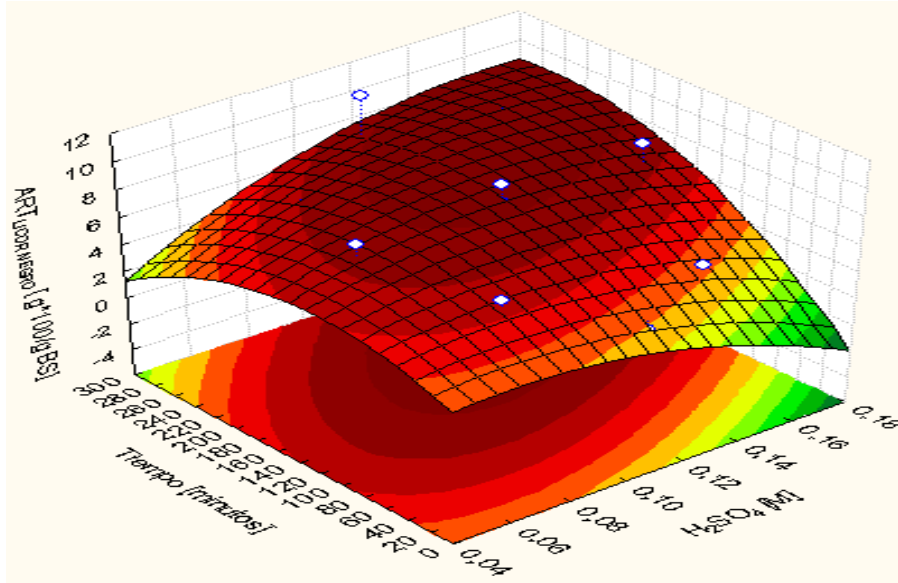
Corrida	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [M]	Tiempo [min]
1	0,080	60,00
2	0,080	240,0
3	0,150	60,00
4	0,150	240,0
5	0,066	150,0
6	0,164	150,0
7	0,115	22,72
8	0,115	277,3
9(C)	0,115	150,0
10(C)	0,115	150,0

#### 3.7.4.1. Efectos de interacción entre las variables

Como se puede observar en la Tabla 14, se alcanzó una concentración máxima de 10,69% g ART/g Biomasa seca a las condiciones del ensayo 8 (0,115 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 277,3 minutos). De este diseño experimental y los resultados de las corridas se generó una superficie de respuesta (figura 11) en STATISTICA 7.0 de la que se puede observar que la región del máximo (roja) se encuentra para valores mayores 0,12M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> combinados con tiempos mayores de 200 minutos.

**Tabla 14.** Matriz de diseño experimental con los resultados de la masa de ART liberada en cada una de las corridas.

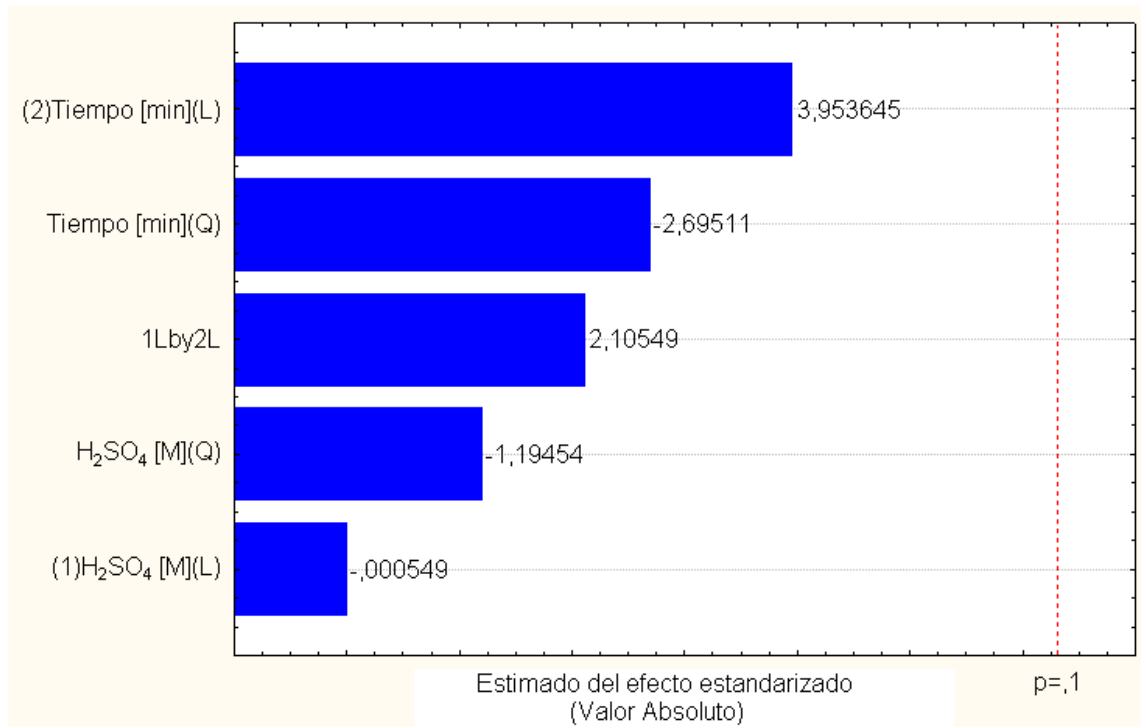
Corridas	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [M]	Tiempo [min]	%ART <sub>LICOR</sub>	%ART	%ART <sub>TOTALES</sub>
			NEGRO (g/gBS)	HIDROLIZADO (g/gBS)	(g/gBS)
1	0,08	60	6,65	2,48	9,13
2	0,08	240	4,89	2,16	7,05
3	0,15	60	4,23	3,10	7,33
4	0,15	240	6,46	2,10	8,56
5	0,07	150	8,14	3,21	11,35
6	0,17	150	8,74	2,45	11,19
7	0,12	22,72	3,53	3,00	6,53
<b>8</b>	<b>0,12</b>	<b>277,28</b>	<b>10,69</b>	<b>1,85</b>	<b>12,44</b>
9(C)	0,12	150	7,72	2,33	10,05
10(C)	0,12	150	9,06	2,33	11,39



**Figura 11.** Superficie de respuesta del diseño experimental  $2^2$  con punto central y su repetición.

### 3.7.4.2. Significancia de las variables

En la Figura 12, se presenta el diagrama de Pareto en el que se puede observar que ninguna de las variables ni las interacciones entre ellas es significativa para el proceso; por lo que a partir de este diseño no se puede generar un modelo que sirva para predecir los resultados del pretratamiento.



**Figura 12.** Diagrama de Pareto de los efectos de las variables estandarizadas para el diseño experimental  $2^2$  con 2 puntos central.

## CONCLUSIONES

Se desarrolló un pretratamiento químico sin antecedentes en biomasa de microalga, como parte del proceso de producción de bioetanol, a la especie *Ch. gracilis* con licores de hasta 10.69% g ART/g Biomasa seca (rendimiento de 62,88% en base al 17% de carbohidratos reportados en la caracterización de la especie utilizada), a tiempos de reacción mayor a 4 horas y concentraciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 0.1451, realizado en un autoclave a 15 psi y 121 °C.

A partir de los resultados del pretratamiento se puede inferir que es necesario el pretratamiento como parte esencial en la producción de Azúcares Reductores Totales, ya que los valores de ART obtenidos en el pretratamiento son significativos como para omitir la etapa de hidrólisis la cual aumenta los costos y complejidad del proceso.

El análisis estadístico permite concluir que el pretratamiento desarrollado en este proyecto no requiere como solvente el etanol, sin embargo requiere de concentraciones de ácido cercano a 0.14 M, lo que lo convierte en un pretratamiento químico tipo hidrólisis.

## RECOMENDACIONES

Por limitaciones de equipos no se pudo estudiar el pretratamiento a mayores temperaturas, se recomienda hacerlo y estudiar el pretratamiento con diferentes ácidos, ya que posiblemente reduciría los costos de neutralización y corrosión de los equipos y el tiempo de contacto requerido.

El pretratamiento desarrollado se aplicó sobre la microalga *Ch. gracilis* por lo que se recomienda validar para otras especies de microalga.

Para que este trabajo tenga importancia, se recomienda continuar los estudios en las posteriores etapas del proceso como fermentación del licor obtenido para la producción de bioetanol a partir de microalgas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ryohei et al, "Process for the production of ethanol from microalgae", U.S. Patent 5.578.472 , fecha nov 26, 1996.
2. Chisti, Y., Biodiesel from microalgae beats bioethanol, Trends in Biotechnology Vol.26, pag 126-130, No.3,2008.
3. Brown MR, Jeffrey SW, Volkman JK, Dunstan GA. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*;151:315–31, 1997.
4. Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306.
5. Camps Michelena M. y Marcos Martín F.. Los biocombustibles. Mundi-Prensa. Madrid, 2002.
6. Biocombustibles: el biodiesel de soja destruye nuestros bosques.(s. f.). Recuperado el 21 de Octubre del 2009 de <http://www.greenpeace.org.ar/biocombustibles/argentina/informacion.html>.
7. Sialve, et al. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Journal Biotechnology Advances*.2009
8. Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng*;101:87–96, 2006.
9. Roessler PG, Brown LM, Dunahay TG, Heacox DA, Jarvis EE, Schneider JC, et al. Genetic-engineering approaches for enhanced production of biodiesel fuel from microalgae. *ACS Symp Ser*;566:255–70, (1994).
- 10.Sawayama S, Inoue S, Dote Y, Yokoyama S-Y. CO2 fixation and oil production through microalga. *Energy Convers Manag*;36: 729–31, 1995.
- 11.Dunahay TG, Jarvis EE, Dais SS, Roessler PG. Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. *Appl Biochem Biotechnol*;57–58:223–31, 1996.
- 12.Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P. A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program—biodiesel from

- algae. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO; Report NREL/TP-580-24190, 1998.
13. Banerjee A, Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Crit Rev Biotechnol* 22:245-79, 2002.
  14. Gavrilescu M, Chisti Y. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv*;23:471-99, 2005.
  15. Ghirardi ML, Zhang JP, Lee JW, Flynn T, Seibert M, Greenbaum E, et al. Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub>. *Trends Biotechnol*;18:506-11, 2000.
  16. Fedorov AS, Kosourov S, Ghirardi ML, Seibert M. Continuous H<sub>2</sub> photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* using a novel two-stage, sulfate-limited chemostat system. *Appl Biochem Biotechnol*;121:124:403-12, 2005.
  17. Kapdan IK, Kargi F. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb Technol*;38:569-82, 2006.
  18. Becker W. E. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 51-55, 1994.
  19. Cortés, X. (7 de Mayo, 2007). Centro de Biotecnología estudia obtención de biodiésel a partir de microalgas. *Panorama*, 602. Recuperado el día 10 de Mayo del 2009 de <http://www2.udec.cl/panorama/p602/p05.htm>.
  20. Venkataraman, I.V., Somasekaran, T., Becker, E.W., Replacement value of blue-green alga (*Spirulina platensis*) for fishmeal and a vitamin-mineral premix for broiler chicks. *Br. Poult. Sci.* 35. 373-381, 1994.
  21. Kay, R.A., Microalgae as food and supplement. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30. 555-573, 1994.
  22. Droop M.R. 25 years of algal growth kinetics. *Bot. mar* 1983;26:99-112.
  23. *Biological Macromolecules*. (s.f.). Recuperado el 14 de Noviembre del 2009 de [http://biology.unm.edu/ccouncil/Biology\\_124/Summaries/Macromol.html](http://biology.unm.edu/ccouncil/Biology_124/Summaries/Macromol.html).
  24. Thompson, P. A., Harrison, P.J., “Effects of monospecific algal diets of varying biochemical composition on the growth and survival of Pacific

- oyster (*Crassostrea gigas*) larvae”, Marine Biology Journal113,645-654,1992.
25. Becker EW. Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond A, editor. Handbook of microalgal culture. Oxford: Blackwell Publishing; p. 312–51, 2004.
  26. Benezra, C. (1995). Extracción y cuantificación máxima de proteínas de la microalga marina, *isochrysis sp*, Capítulo 2. Universidad de Sonora, Hermosillo, México. Recuperado el 20 de Julio del 2009 de <http://www.biblioteca.uson.mx/digital/tesis/docs/1297/Capitulo2.pdf>
  27. Haug, A. et al. Polysaccharides of Marine Diatoms with Special Reference to *Chaetoceros* Species. *Marine Biology* 34, 217-222 (1976)
  28. Sialve, et al. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Journal Biotechnology Advances*.2009
  29. Cuevas, C.M Ellenrieder, G.V. La Hidrólisis acida. Etanol de lignocelulósicos. Tecnología y perspectiva. ISBN81-8121-114-1. Programa CYTED. Pag 61-95.1994
  30. Lee R. Lynd. OVERVIEW AND EVALUATION OF FUEL ETHANOL FROM CELLULOSIC BIOMASS: Technology, Economics, the Environment, and Policy Biochemical Engineering Program, Thayer School of Engineering, Dartmouth College, Hanover, New Hampshire 03755(1996).
  31. Medel, F. (s.f.) Recuperado el 14 de mayo del 2009 de [http://www.nest.unifei.edu.br/portugues/pags/novidades/curso\\_cyted/files/pdf/Tema%205%20-%20Producao%20e%20Uso%20do%20Etanol%20como%20CombustiveI/PossibilidadesPersapectivasIndustriaCana2.pdf](http://www.nest.unifei.edu.br/portugues/pags/novidades/curso_cyted/files/pdf/Tema%205%20-%20Producao%20e%20Uso%20do%20Etanol%20como%20CombustiveI/PossibilidadesPersapectivasIndustriaCana2.pdf).
  32. CONTRERAS, Edgar. Bioquímica y biología molecular en línea [en línea].recuperado 20 de julio del 2009 de <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/hidrolisis%20polisacaridos.htm>.
  33. Locke et, al 196, *Forest Products Journal*, August, pag 380
  34. Hajny, G. US. Forest Products Laboratory, FPL 385, 1981.

35. Harris, E.E. et al. *Industrial & Engineering Chemistry* 38(1946):896
36. Saeman, J.F. *American Chemical Society, JCS Symposium* (1979), p. 472
37. Cuevas, C.M. Ellenrieder, G.V., *La Hidrólisis ácida. Etanol de lignocelulósicos. Tecnología y perspectiva.* ISBN81-8121-114-1. Programa CYTED. Pag 61-95, 1994.
38. Tena, M.,(s.f.) *Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería.* Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa. 14071-Córdoba. Recuperado el 3 de Octubre del 2009 de <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/practicasgenerales.htm>
39. Grethlein, H.E. et al 1990; *National Technical Information Service USDOE/SERI, EG-77-S-01-4061*, 1980.
40. Lynd, L.R. et al. *Science* 251(1991):1318
41. Kleinert, T. *Organosolv Pulping with Aqueous Alcohol.* TAPPI Journal, Vol 57, 8 pp. 99-102, (1974).
42. Sarkanen, K. *Chemistry of Solvent Pulping.* TAPPI Journal, pp. 215-219, Octubre 1990.
43. Oliet, M., et al. *Organosolv Delignification of Eucalyptus globulus: Kinetic Study of Autocatalyzed Ethanol Pulping.* *Ind. Eng. Chem. Res.* (2000), 39,pp. 34-39
44. Arato, C. et al. *The Lignol Approach to Biorefining of Woody Biomass to Produce Ethanol and Chemicals.* *Applied Biochemistry and Biotechnology Journal*, Vol. 121–124, 2005. pp. 871-882.

**ANEXO A. Medio f/2**  
**(Guillard y Ryther 1962, Guillard 1975)**

Este es un medio común enriquecido con agua de mar, utilizado extensamente para el cultivo de algas marinas costeras, especialmente diatomeas. Las concentraciones de la formulación original, llamada “f médium” (Guillard y Ryther 1962), han sido reducidas a la mitad (Guillard 1975). El medio original (Guillard y Ryther 1962) se usaba sequestrene férrico, el cual se sustituyó por NaEDTA · 2H<sub>2</sub>O y FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O. En 950 mL de agua natural de mar filtrada, agregar los siguientes componentes. Llevar el volumen final a 1 litro con agua natural de mar filtrada. Autoclavar. Si no se requiere el silicato, omitir para reducir precipitación.

Componente	Solución Stock (g.L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Cantidad usada	Concentración final en el medio (M)
NaNO <sub>3</sub>	75	1 mL	8.82 × 10 <sup>-4</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	5	1 mL	3.62 × 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	30	1 mL	1.06 × 10 <sup>-4</sup>
Solución de trazas de metal	(Mirar siguiente tabla)	1 mL	-
Solución de Vitaminas	(Mirar siguiente tabla)	0.5 mL	-

***Solución de trazas de metal f/2***

En 950 mL de dH<sub>2</sub>O, disolver el EDTA y otros componentes. Llevar el volumen final a 1 litro con dH<sub>2</sub>O.

Componente	1° Solución Stock (g.L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Cantidad usada	Concentración final en el medio (M)
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	-	3.15 g	1.17 × 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	-	4.36 g	1.17 × 10 <sup>-5</sup>
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	180.0	1 mL	9.10 × 10 <sup>-7</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22.0	1 mL	7.65 × 10 <sup>-8</sup>
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.0	1 mL	4.20 × 10 <sup>-8</sup>
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	9.8	1 mL	3.93 × 10 <sup>-8</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	6.3	1 mL	2.60 × 10 <sup>-8</sup>

### ***Solución de vitaminas f/2***

En 950 mL de dH<sub>2</sub>O, disolver la tiamina · HCl, y agregar 1 mL del stock primario. Llevar a 1 litro el volumen final con dH<sub>2</sub>O. Filtrar, esterilizar y almacenar en un lugar refrigerado.

Componente	1° Solución Stock (g.L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Cantidad usada	Concentración final en el medio (M)
Tiamina · HCl (Vitamina B1)	-	200 mg	2.96 × 10 <sup>-7</sup>
Biotina (Vitamina H)	1.0	1 mL	2.05 × 10 <sup>-9</sup>
Cianocobalamina (Vitamina B12)	1.0	1 mL	3.69 × 10 <sup>-10</sup>

## ANEXO B. Determinación de humedad en la microalga *Ch gracilis*

Para la determinación de la humedad se utilizó como referencia la norma para la determinación de sólidos totales (NREL/TP-510-42621), en la cual se sugería tomar 2 g de biomasa, los cuales eran colocados en crisoles con peso conocido y previamente secados a 105°C durante 4 h. La biomasa contenida en los crisoles era llevada a la estufa en la cual se secaba a 105°C durante mínimo 4 horas. Pasado este tiempo las muestras se retiraban del horno y se llevaban a un desecador hasta que alcanzara temperatura ambiente. Se les tomó el peso de cada una de las muestras y se llevaron nuevamente al horno durante 1 hora. Este procedimiento se repitió hasta que la variación entre los pesos tomados fuera más o menos del 0,1%.

Para el cálculo de la humedad teórica en la muestra se utilizó la siguiente ecuación:

$$a.s \% = \frac{(W_{Biomasa\ húmeda} - W_{Biomasa\ seca})}{W_{Biomasa\ húmeda}} \times 100$$

Masa de microalgas	Masa de microalgas seco	% de microalgas seco	% de humedad
2.001	1.7001	91,8982	15.0374
2.000	1.700	90,4788	15.001
2.000	1.7100	92,0921	14,5
Media		91,4944	14.8461

### **ANEXO C. Método Del Ácido Dinitrosalicílico (DNS)**

El método del ácido dinitro-3,5 salicílico descrito por Miller (1959), se basa en la reducción del ácido dinitro-3,5 salicílico a ácido 3-amino-5 nitro salicílico al mismo tiempo en el que el grupo aldehído del azúcar es oxidado al grupo carboxílico (Miller 1959) con el desenvolvimiento de la coloración rojiza leída espectrofotométricamente a 540nm.

·PASOS PARA PREPARAR DNS.

- Disolver 1.6g de NaOH en H<sub>2</sub>O destilada.
- Adicionar 30g de tartrato de Na y K
- Adicionar 1g de DNS
- Aforar a 100ml con H<sub>2</sub>O destilada.
- Almacenar en frascos ámbar a 4°C.

Se debe mantener un stock de glucosa (patrón) 4mg/ml y almacenarlo a 4°C.

A partir de la solución de glucosa se preparan las soluciones para hacer la curva patrón con las siguientes concentraciones (g/l) : 0.25-0.5-1-2y 4.

Procedimiento:

- Tomar 0.5ml de cada solución y agregar 0.5ml de reactivo DNS.
- Preparar una muestra blanco por dilución de 0.5ml de H<sub>2</sub>O destilada a 0.5ml del reactivo DNS.
- Agitar todas las muestras.
- Colocar a ebullición las muestras en baño de maría por 5 minutos.
- Enfriar con hielo.
- Adicionar 5ml de H<sub>2</sub>O destilada.
- Agitar y dejar en reposo 15min.

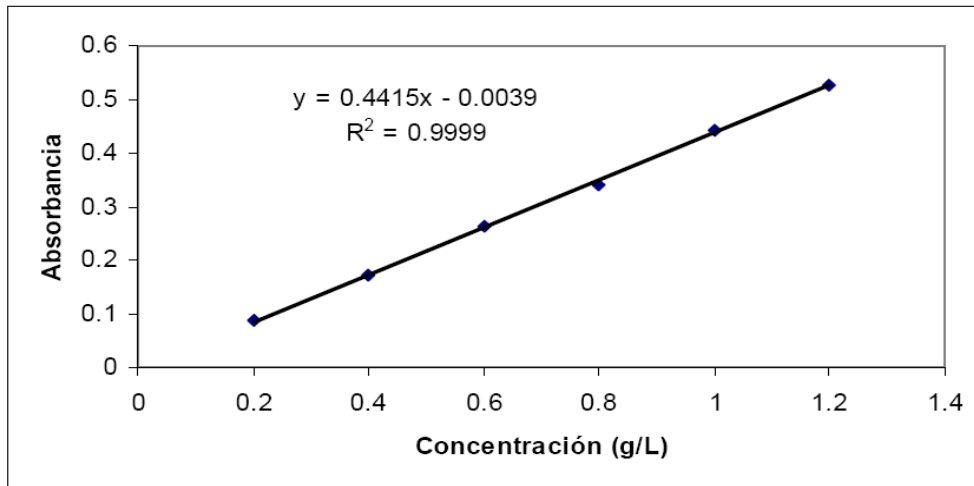
- Leer a 540nm.

Realizar la curva de absorvancia versus concentración. Debe tener un coeficiente de correlación de 0.991 a0.999.

- Preparación de la curva de calibración

Nº Dilución	Blanco	1	2	3	4	5	6
Glucosa mil stock	0.0	0.025	0.050	0.075	0.100	0.125	0.150
H2O destilada mil	0.500	0.475	0.450	0.425	0.400	0.375	0.350
Gr./l de glucosa	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2

### Curva de Calibración DNS



Normativa:

- La curva de calibración deber ser comparable con la validada por el laboratorio, lo contrario se debe repetir el ensayo corrigiendo las posibles fallas cometidas. ( Verificar que el DNS este en buen estado y que el stock de glucosa no esté vencido o fermentado)
- La ley de Beer-Lambert solo es aplicable a bajas concentraciones al elaborar la curva de calibración para garantizar la linealidad, por lo tanto las muestras deben ser diluidas adecuadamente para poder leerlas dentro de la curva sin necesidad de extrapolar. Los rangos de linealidad de las curvas de absorvancia vs concentración para el caso de la glucosa está entre 0.0-1.2 g/l.
- Se debe hacer una curva de calibración cada vez que se haga un ensayo.
- Tanto la curva de calibración como las muestras se deben hacer por duplicado.

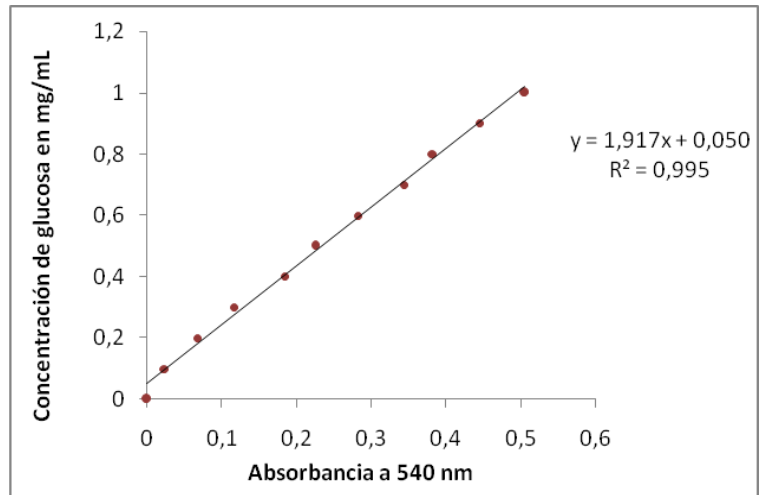
- Para muestras con altas concentraciones de azúcares reductores no es consistente la relación lineal entre absorbancia y concentración, por lo tanto las muestras deben ser diluidas según el contenido de azúcares; algunas diluciones pueden ser al 5%, 10% y 20%.

#### **ANEXO D. Construcción de la Curva Glucosa para el Reactivo DNS**

En la construcción de la curva de glucosa se utilizó el método DNS descrito en el anexo C. Inicialmente se preparó una solución de glucosa con concentración de 1 mg/mL, en tubos de ensayos se colocaron muestras diluidas de 0,5 mL con concentraciones desde 0 a 1 mg/mL. Se hizo reaccionar cada una de las muestras en los tubos con 0,5 mL de reactivo DNS. Terminada la reacción fueron leídas en el espectrofotómetro, obteniéndose absorbancia para cada concentración de glucosa, tal como se observa en la tabla 21. Se graficaron los datos de concentración contra los de absorbancia para cada muestra, obteniéndose una línea recta con ecuación:  $[Glucosa] = 1,917*(Abs) + 0,050$ .

**Tabla 1:** Absorbancia para diferentes concentraciones de glucosa, después de la reacción con DNS.

<b>[Glucosa]</b>	<b>Absorbancia</b>
0	0
0,1	0,0237
0,2	0,0677
0,3	0,1167
0,4	0,1843
0,5	0,2253
0,6	0,2817
0,7	0,3433
0,8	0,3823
0,9	0,4453
1	0,5060



**Figura D1.** Curva de glicose.

## **Anexo E. Determinación de Carbohidratos Estructurales y Lignina en Biomasa**

### **PROCEDIMIENTO ANALÍTICO EN EL LABORATORIO (LAP-NREL)**

#### **1. Introducción**

- 1.1. Los carbohidratos y la lignina componen la mayor parte de muestras de las muestras de biomasa. Estos constituyentes deben ser medidos como parte de un análisis exhaustivo de biomasa. Los carbohidratos pueden ser estructurales o no estructurales. Los carbohidratos estructurales están enlazados a la matriz de la biomasa, mientras que los carbohidratos no estructurales usando una extracción o algunos pasos de lavado. La lignina es un complejo polímero fenólico.
- 1.2. Partes de este procedimiento son substancialmente similares a la norma ASTM E1758-01 “Standar Method For The Determination Of Carbohidrates By HPLC”.
- 1.3. Este procedimiento es adecuado para muestras que no contienen extractivos. Este procedimiento utiliza una hidrólisis de dos pasos para fraccionar la biomasa en formas que son más fáciles de cuantificar. La lignina se fracciona en material soluble y no soluble en ácido. El material insoluble en el ácido puede incluir cenizas y proteínas, las cuales deben ser cuantificadas por análisis gravimétrico. La lignina soluble en ácido es medida por espectroscopía UV-Vis. Durante la hidrólisis, los carbohidratos poliméricos son hidrolizados en formas monomericas, cuales se solubilizan en el licor de la hidrólisis. Ellos son medidos por HPLC. Las proteínas pueden también haberse hidrolizado en el licor hidrolizado. El acetato es medido por HPLC.

#### **2. Alcance.**

- 2.1. Este procedimiento es apropiado para biomasa libre de extractivos, lo que incluye biomasa que haya sido extraída usando el LAP del NREL

“Determination Of Extractives In Biomass”, también sólidos de proceso que no contenga extractivos. Los resultados están reportados en base seca. Los resultados pueden ser reportados sobre una base recibida o sobre una base libre de extractivos, depende del tipo de biomasa usada. Se debe llevar a cabo, antes que este procedimiento, el LAP del NREL “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis”.

- 2.2. Este procedimiento es apropiado para biomasa que constituida por los componentes listados a lo largo de toda la metodología. Cualquier componente de la biomasa que no se mencione debe ser después investigado.
- 2.3. Todos los análisis deben ser llevados a cabo de acuerdo con un plan específico para la garantía en el laboratorio (Quality Assurance Plan-QAP).

### 3. Terminología

- 3.1. *Peso seco (ODW)*- el peso de la biomasa matemáticamente corregida por la cantidad de humedad presente en la muestra en el tiempo del pesado.
- 3.2. *Biomasa preparada* – es la biomasa preparada de acuerdo a la LAP del NREL “Preparation of samples for Biomass Compositional Analysis”.
- 3.3. *Biomasa libre de extractivos* – es la biomasa resultante de una exhaustiva extracción con agua y etanol (ver LAP del NREL “Determination of Extractives in Biomass”)
- 3.4. *Lignina insoluble en ácido* – el residuo que queda en el crisol con medio poroso de filtración después de los dos pasos de hidrólisis, con la corrección de la ceniza y proteína insoluble en ácido, si es necesario.
- 3.5. *Carbohidratos estructurales* – Carbohidratos poliméricos, llamado celulosa y hemicelulosa.
- 3.6. Componentes no estructurales- componentes unidos por enlaces no químicos a la biomasa, que incluye pero no limita sucrosa, nitratos/nitritos, proteínas, cenizas, clorofila, o cera.

### 4. Uso e importancia

- 4.1. Este procedimiento es utilizado, posible mente en conjunto con otros procedimientos, para determianr la cantidad de carbohidratos estructurales y lignina en una muestra de biomasa sólida.

## 5. Interferencias

- 5.1. Este procedimiento ha sido optimizado para una rango de diámetro de partícula especificado en el LAP del NREL "Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis". La desviación a un tamaño de partícula menor puede resultar en una baja tendencia en el contenido de carbohidratos (por consiguiente una alta tendencia de lignina) debido a la excesiva degradación de los carbohidratos. La desviación a una partícula mas grande puede resultar en una baja tendencia en el contenido de carbohidratos (por consiguiente una alta tendencia de lignina) debido a la hidrólisis incompleta de azúcares poliméricos a azúcares monoméricos.
- 5.2. Muestras que contengan extractivos no son apropiados para aplicarles este procedimiento. Los extractivos pueden dividirse e impedir la reproducibilidad, resultando una alta tendencia de lignina.
- 5.3. Muestras con un contenido de cenizas mayor al 10% en peso, pueden no ser apropiadas para este procedimiento, pues la muestra puede contener suciedad u otros minerales que interferirán con concentraciones apropiadas de ácido, y así catalizarían reacciones secundarias.
- 5.4. Muestras con un contenido mayor al 10% en peso no serían apropiadas para este procedimiento, pues el exceso de humedad interferirá con concentraciones apropiadas de ácido. Las muestras deben ser secadas antes de este procedimiento (secadas al aire o en estufa al menos a 40°C).
- 5.5. Las muestras que contengan proteínas tenderán a un alto contenido de lignina insoluble en ácido, al menos que se halle el contenido de proteína mediante una determinación gravimétrica del material insoluble en ácido. Un análisis independiente de nitrógeno es necesario para estimar el contenido proteico en el residuo. La separación física de la proteína insoluble en ácido de la lignina insoluble ácido está mas allá del alcance de este procedimiento.

- 5.6. Este procedimiento no es apropiado para muestras a las que se las han agregado ácido, base o un catalizador.
- 5.7. Ciertas columnas guardas para la cuantificación de carbohidratos pueden generar picos artefactos. Carbohidratos puros deben ser analizados en las nuevas columnas y en las de guarda para verificar la ausencia de picos artefactos.

## 6. Equipos

- 6.1. Balanza analítica, exactitud de 0.1 mg
- 6.2. Horno de secado por convección, con control de temperatura de  $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 6.3. Horno mufla, equipado con un termostato, ajustado a  $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$ .
- 6.4. Baño termostático, fijado a  $30 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 6.5. Autoclave, apropiada para autoclavar líquidos, fijado a  $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 6.6. Montaje para filtración, equipado con fuente de vacío y adaptadores para erlenmeyer de filtración al vacío.
- 6.7. Desecador con material desecante
- 6.8. Sistema HPLC, equipado con: detector de índice de refracción y las siguientes columnas:
  - 6.8.1. *Shodex sugar SP0810* o *Biorad Aminex HPX-87P column* (o equivalentes) con columna de guarda para *deashing*, de forma iónica  $\text{H}^+/\text{CO}_3^-$
  - 6.8.2. *Biorad Aminex HPX-87H column* (o equivalente) equipada con la columna de guarda apropiada.
- 6.9. Espectrofotómetro de UV-Visible, con selección de diodo o longitud de onda única, con cubetas de cuarzo de alta pureza con longitud de recorrido de 1 cm
- 6.10. Bureta automática, capaz de dispensar 84 mL de agua, opcional.

## 7. Reactivos y Materiales

- 7.1. Reactivos
  - 7.1.1. Ácido sulfúrico con pureza del 72% p/p (gravedad específica 1.6338 at  $20^{\circ}\text{C}$ , disponible también como reactivo para determinación de fluorina, de Fluka #00647)
  - 7.1.2. Carbonato de calcio, reactivo grado ACS

- 7.1.3. Agua destilada y filtrada a través de poro 0.2  $\mu\text{m}$
- 7.1.4. Patrones de alta pureza: D-celubiosa, D-(+)glucosa, D-(+)xilosa, D-(+)galactosa, L-(+)arabinosa, y D(+)-manosa
- 7.1.5. Un segundo set de los anteriores reactivos de alta pureza de diferente origen (manufactura o lote), para usarlo como patrones para calibración (CVS).
- 7.2. Materiales
- 7.2.1. Patrones con garantía de calidad, bien caracterizado, como los patrones de biomasa del National Institute of Standards and Technology (NIST) u otra muestra bien caracterizada de similar composición a las muestras que están siendo analizadas.
- 7.2.2. Tubos de vidrio que soporten presión, mínimo de 90 mL de capacidad, con rosca, tapones de teflón y sellos de anillos 'o' (Vidrio Ace, tubo #8648-30 con tapón de enchufe, o equivalente)
- 7.2.3. Una varilla de agitación de teflón adecuada para el tubo de presión.
- 7.2.4. Un crisol de filtración, 25 mL, de porcelana y medio poroso, coors # 60531 o equivalente
- 7.2.5. Botellas de boca ancha, 50 mL
- 7.2.6. Matraz de filtración, 250 mL
- 7.2.7. Matraz erlenmeyer, 50 mL
- 7.2.8. Pipetas ajustables, que cubran rangos desde 0.02 a 5.00 mL y 84.00 mL
- 7.2.9. Papel tornasol, rango: 4-9
- 7.2.10. Jeringas desechables, 3 mL, hecho a medida para filtros de jeringa de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
- 7.2.11. Ampolletas para muestreo con sellos de rosca en la boca, para encajar.

## 8. Consideraciones y peligros

- 8.1. El ácido sulfúrico es corrosivo y debe ser manejado con cuidado

- 8.2. Sea precavido cuando este manejando los tubos de presión calientes después de removerlos del autoclave, pues estos tubos pueden causar una explosión.
- 8.3. Cuando se este poniendo o removiendo los crisoles del horno mufla se debe tener puesto todo el equipo de protección personal necesario, incluyendo guantes resistentes al calor.
- 8.4. Opere todos los equipos de acuerdo con el manual de operación segura de los procesos del NREL
- 8.5. Use los procedimientos para el manejo de químicos recomendados por la NREL.

## **9. Muestreo, especímenes y unidades de prueba**

- 9.1. De debe tener cuidado para asegurar que muestras representativas son tomadas para el análisis.
- 9.2. Se debe desarrollar, antes que el presente, el LAP del NREL “Preparation of Samples of Biomass Compositional Analysis”. Las muestras deben tener un mínimo de 85% de contenido de sólidos.
- 9.3. Se debe desarrollar, antes que el presente y si hay extractivos presentes, el LAP del NREL “Determination of Extractives in Biomass”
- 9.4. Se debe llevar a cabo, al tiempo de cuando se este pesando la biomasa para este análisis, el LAP del NREL “Determination of Solids in Biomass”
- 9.5. Este procedimiento es apropiado para muestras que han sido secadas al aire o han sido liofilizadas. Las muestras secadas a temperaturas iguales o mayores a 45°C, no son apropiadas para este procedimiento.
- 9.6. Los pasos 9.2 a 9.4 deben ser aplicados a los patrones de calidad garantizada.

## **10. PROCEDIMIENTO**

### **10.1. Preparar la muestra para el análisis y el hidrolizado**

- 10.1.1. Ponga una apropiada cantidad de crisoles para filtración en el horno mufla a  $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$  por mínimo 4 horas. Remueva los crisoles del horno directamente a un desecador y enfríe por una específica cantidad de tiempo, se recomienda una hora. Pese los crisoles lo mas

cercano a 0.1 mg y registre este peso. Es importante mantener los crisoles en un orden específico, si no están marcado con identificador. Calcomanías de marca permanente están disponibles en la marca del aparato. No marque el crisol de filtración en la parte baja con un marcador de porcelana, pues este puede impedir la filtración.

- 10.1.2. Devuelva el crisol de vuelta al interior del horno mufla a  $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$  y repita el procedimiento hasta peso constante. El peso constante es definido como un cambio de  $\pm 0.1\%$  en el porcentaje de sólidos después de una hora de re-calentamiento del crisol.
- 10.1.3. Pese  $300.0 \pm 10.0$  mg de la muestra o patrón de calidad garantizada dentro del tupo de presión tarado. Registre el peso lo mas cercano a 0.1 mg. Etiquete los tubos de presión con un marcador permanente. El LAP del NREL "Determination of Total Solids in Biomass", debe ser efectuado al mismo tiempo, para tener una medida exacta para la corrección del porcentaje de humedad. Cada muestra debe ser analizada en duplicado, mínimo. El tamaño del lote se recomienda ser de 3 a 6 muestras y un patrón de garantía asegurada, todas corridas en duplicado.
- 10.1.4. Agregue  $3.00 \pm 0.01\text{mL}$  (o  $4.92 \pm 0.01$  g) de ácido sulfúrico al 72% a cada uno de los tubos de presión. Use un agitador de teflón para mezclar por un minuto, o hasta que la muestra esté completamente mezclada.
- 10.1.5. Ponga los tubos de presión en un baño de agua a  $30 \pm 3^{\circ}\text{C}$  e incube la muestra por  $60 \pm 5$  minutos. Usando el agitador de teflón, agite la muestra de cada entre 5 a 10 minutos sin remover la muestra del baño. La agitación es esencial para asegurar al menos el contacto ácido-partícula y una hidrólisis uniforme.
- 10.1.6. Después de completada la hidrólisis de 60 minutos, remueva los tubos del baño de agua. Diluya el ácido a una concentración del 4 % agregando  $84.00 \pm 0.04\text{mL}$  de agua des-ionizada usando una bureta automática. La dilución puede hacerse también agregando  $84.00 \pm 0.04$  g de agua purificada usando una balanza de 0.01 g de exactitud.

Enrosque los tapones de teflón firmemente. Mezcle la muestra invirtiendo el tubo varias veces para eliminar fases de separación entre capas de alta y baja concentración de ácido.

10.1.7. Prepare un set de patrones de recuperación de azúcares (SRS-sugar recovery standards) que serán hidrolizados de igual manera y usados para corregir las pérdidas debido a la destrucción de azúcares durante la hidrólisis de ácido diluido. Los SRS deben incluir D-(+) glucosa, D-(+) xilosa, D-(+) galactosa, D-(+) arabinosa, y D-(+) manosa. Las concentraciones de los azúcares SRS deben ser escogidas lo más cercanamente parecidas a las concentraciones de los azúcares en la muestra a evaluar. Pese las cantidades necesarias de cada azúcar, lo más cercano a 0.1 mg, y agregue 10.0 mL de agua desionizada. Y agregue 348 µL de ácido sulfúrico al 72 %. Transfiera los SRS a los tubos de presión y tápelos fuertemente.

10.1.7.1. Un SRS fresco no es necesario para cada análisis. Una gran lote de SRS puede ser preparado, filtrarlo a través de filtros de 0.2 µm de diámetro de poro, y administrar en alícuotas de 10.0 mL dentro de contenedores sellados y etiquetados. Se pueden almacenar en el congelador y sacarlos cuando se necesiten. Descongelar y agitar los SRS congelados antes de usar. Si se usa lo SRS congelados, la cantidad apropiada de ácido debe ser agregada a la muestra descongelada y agitar antes de transferir al tubo de presión.

10.1.8. Poner los tubos en la rejilla de seguridad de la autoclave. Autoclavar las muestras selladas y los SRS por una hora a 121°C. después de completar el ciclo de autoclavado, permita que el hidrolizado se enfríe lentamente hasta cerca de la temperatura del laboratorio, antes de remover las tapas. (si el paso 10.2 no se desarrolló, sacar una alícuota de 10 mL de licor para usar en el paso 10.5)

## 10.2. **Analizar la muestra por lignina insoluble en ácido, como sigue**

10.2.1. Filtrar al vacío la solución del hidrolizado a través de los crisoles para filtración previamente pesados.

- 10.2.2. Transfiera una alícuota, aproximadamente 50 mL, dentro de una botella de almacenamiento de muestra. Esta muestra puede usarse también para hallar lignina soluble en ácido así como los carbohidratos, y acetilo si es necesario. La determinación de lignina soluble en ácido debe ser hecha a las 6 horas de la hidrólisis. Si el licor de la hidrólisis debe ser almacenado, se debe almacenar en un refrigerador por máximo 2 semanas. Es importante tomar la alícuota del licor antes de proceder al paso 10.2.3.
- 10.2.3. Usar agua desionizada para transferir cuantitativamente todos los sólidos remanentes en el tubo de presión al crisol de filtración. Enjuague los sólidos con al menos 50 mL de agua fresca desionizada. Agua desionizada caliente puede ser usada en lugar del agua a temperatura del lugar para disminuir el tiempo de filtración.
- 10.2.4. Seque el crisol y el residuo insoluble en ácido a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  hasta que se logre el peso constante. Usualmente mínimo 4 horas.
- 10.2.5. Retire las muestras de la estufa y enfríe en un desecador. Registre el peso del crisol más el residuo seco lo más cercano a 0.1 mg.
- 10.2.6. Poner los crisoles y el residuo en el horno mufla a  $575 \pm 25^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 6$  horas.
- 10.2.7. Retire cuidadosamente el crisol del horno directamente a un desecador y enfríe por la cantidad específica de tiempo igual al tiempo inicial en que se enfriaron los crisoles. Pese los crisoles y las cenizas lo más cercano a 0.1 mg y registre el peso. Se pone de nuevo los crisoles en el horno mufla y se quema hasta peso constante. (La cantidad de ceniza insoluble en ácido no es igual a la cantidad total de cenizas en la muestra de biomasa. Consultar el LAP del NREL "Determination of Ash in Biomass" si la cantidad total de ceniza no ha sido determinada.)
- 10.3. Analizar la muestra por lignina soluble en ácido, como sigue:**
- 10.3.1. En un espectrofotómetro UV-Visible, correr una prueba de agua desionizada o ácido sulfúrico al 4%.

10.3.2. Usando las alícuotas del hidrolizado obtenidas en el paso 10.2.2., medir la absorbancia de la muestra a la apropiada longitud de onda. Consultar la sección 11.3 para los valores de longitud de onda sugeridos. Diluya la muestra si es necesario para llevar la media de absorbancia a un valor de 0.7-1.0, registrando la dilución. Agua desionizada o ácido sulfúrico al 4% puede ser usada para la muestra diluida, pero el mismo solvente debe ser usado en el blanco. Registre la absorbancia hasta tres decimales. La reproducibilidad debe ser  $\pm 0.05$  unidades de absorbancia. Analice cada muestra mínimo en duplicado. (este paso debe hacerse dentro de las 6 horas siguientes a la hidrólisis)

10.3.3. Calcule la cantidad de lignina soluble en ácido presente en la muestra usando los cálculos de la sección 11.3.

**10.4. Analizar la muestra por carbohidratos estructurales**

10.4.1. Prepare una serie de patrones de calibración que contengan los componentes que van a ser cuantificados, consultar la Tabla 1 para el rango de concentraciones sugerido. Use una calibración de 4 puntos. Si los patrones se preparan afuera de los rangos sugeridos, el nuevo rango debe ser validado.

10.4.1.1. Tabla 1- Rangos de concentraciones sugeridos para los estándar de calibración del numeral 10.4.1.

Componente	Rango de concentraciones sugerido (mg/mL)
D-celubiosa	0.1-4.0
D(+)glucosa	0.1-4.0
D(+)xilosa	0.1-4.0
D(+)galactosa	0.1-4.0
L(+)arabinosa	0.1-4.0

D(+)	manosa	0.1-4.0
CVS		En el medio del rango lineal, concentración diferente a la utilizada como punto de calibración (se sugiere 2.5)

- 10.4.1.2. Un set de soluciones patrón frescas no es necesario para todos los análisis. Una cochada de gran número de soluciones patrón pueden ser producidas, filtradas a través de filtros de 0.2 µm dentro de ampollas de muestreo, selladas y marcadas. Los patrones y muestras CVS pueden ser almacenadas en un congelador y sacarlas cuando se necesiten. Descongelar y agitar hasta el vórtice antes de usar. Durante todo uso, las soluciones patrón y muestras de CVS deben ser vigilados por un comportamiento inusual. Concentraciones inusuales significa que las muestras están comprometidas o componentes volátiles se han perdido. Asumiendo un volumen suficiente, las soluciones patrón y las muestras de CVS no deben tener más de 12 inyecciones para cada ampolla. En una cámara de automuestreo helada, el tiempo de vida de los patrones y muestras de CVS es de aproximadamente tres a cuatro días.
- 10.4.2. Preparar un patrón de calibración y verificación (CVS) por cada set de patrones de calibración. Usar reactivos de lote o manufactura diferente a los usados en las soluciones patrón. Preparar los CVS a una concentración que esté en el medio de los rangos validados de las curvas de calibración. Los CVS deben ser analizados en el HPLC después de cada set de calibración y en intervalos regulares de principio a fin de la secuencia, agrupando las muestras. El CVS es

usado para verificar la calidad y estabilidad de la curva de calibración a través de la corrida de la prueba.

- 10.4.3. Usando el licor de la hidrólisis obtenido en el paso 10.2.2., transferir una alícuota de cada licor de aproximadamente 20 mL a un erlenmeyer de 50 mL.
- 10.4.4. Neutralice cada una de las muestras usando carbonato de calcio hasta un pH de 5-6. Evite la neutralización hasta un pH mayor de 6 usando papel tornasol o un medidor de pH. Agregue el carbonato de calcio despacio después de alcanzar un pH de 4. Agite la muestra frecuentemente. Después de alcanzar un pH de 5-6, pare la adición de carbonato de calcio, deje que se precipite y decante el sobrante líquido. El pH después de la decantación puede ser de 7. (no se debe permitir que las muestras excedan un pH de 9, pues puede resultar una pérdida de azúcar.)
- 10.4.5. Preparar las muestras para el análisis HPLC pasándolas a través de un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  a una ampolla de muestreo. Sellar y marcar la ampolla. Preparar doble muestra si se desea. Si un análisis de muestra cae por fuera del rango de calibración validado, diluir lo necesario y analizar la muestra otra vez. La concentración debe ser corregida después de la corrida del experimento.
- 10.4.6. Analice los patrones de calibración, CVS, y las muestras por HPLC usando *Shodex sugar SP0810* o *Biorad Aminex HPX-87P* con su respectiva columna de guarda.

Condiciones del HPLC:

Volumen de inyección: 10-50  $\mu\text{L}$

Fase móvil: Agua grado HPLC, filtrada por 0.2  $\mu\text{M}$  y desgasificada.

Velocidad de flujo: 0.6 mL/minuto

Temperatura de la columna: 80-85°C

Temperatura del detector: tan cerca de la temperatura de la columna como se pueda

Detector: Refractómetro

Tiempo de la corrida: 35 minutos

Nota: la columna *deashing* de guarda debe ser instalada fuera de la unidad de calentamiento y mantenida a temperatura ambiente. Esto prevendrá la presencia de picos artefactos en el cromatograma.

10.4.7. Revisar los cromatogramas de las muestras a evaluar por presencia de celubiosa y azúcares oligoméricos. Los niveles de celubiosa mayores de 3 mg/mL indica una hidrólisis incompleta. Muestras frescas deben ser hidrolizadas y analizadas.

10.4.8. Revisar los cromatogramas de las muestras a evaluar por presencia de solvente antes de la celubiosa (tiempo de retención de 4 a 5 minutos usando las condiciones recomendadas). Estos picos pueden indicar altos niveles de productos de degradación de azúcares en la muestra anterior, lo cual indica excesiva hidrólisis. Todas las muestras de los lotes que muestran evidencia de excesiva hidrólisis deberían tener muestras frescas para ser analizadas e hidrolizadas.

#### **10.5. Analizar la muestra por el contenido de acetilo, si es necesario**

10.5.1. Preparar una solución de ácido sulfúrico 0.005M (0.01N) para usarlo como la fase móvil en el HPLC. En un matraz aforado de 2 litros, agregue 2.00 mL de ácido sulfúrico 10 N estandarizado, y llévelo al volumen del matraz con agua grado HPLC. Filtrar a través de un filtro 0.2 µL y desgasificar antes de usar. Si no está disponible una solución de ácido sulfúrico 10 N, ácido concentrado puede ser también usado. También se puede producir una solución de ácido sulfúrico 0.005 N llevando 278 µL de ácido sulfúrico concentrado a 1 litro en un matraz aforado con agua grado HPLC.

10.5.2. Prepare una serie de patrones de calibración que contenga los componentes que vana ser cuantificados. El ácido acético, ácido fórmico y el ácido levulinico se recomiendan como presentes en el licor. Se sugiere un rango de 0.02 a 0.5 mg/mL. Se recomiendan cuatro puntos de calibración igualmente espaciados. Si los patrones son preparados por fuera de los rangos sugeridos, los nuevos rangos para esa curva de calibración deben ser validados.

- 10.5.3. Prepare el patrón de verificación y calibración (CVS) para cada set de patrones de calibración, usando compuestos de otro recurso de los que fueron preparados los patrones de calibración. Los CVS deben contener las cantidades conocidas de cada patrón de calibración., a una concentración que caiga en el medio del rango validado de la curva de calibración. Los CVS deben ser analizados en el HPLC después de cada set de calibración y en intervalos regulares de principio a fin de la secuencia, separando grupos de muestras. Los CVS son usados para verificar la calidad y estabilidad de la curva de calibración a través de la corrida.
- 10.5.4. Prepare la muestra para el análisis de HPLC pasando una pequeña alícuota del licor colectado en el paso 10.2.2. a través de un filtro 0.2  $\mu\text{m}$  a una ampolla de muestreo. Selle y etiquete la ampolla. Si se sospecha que la concentración de la muestra puede exceder el rango de calibración, diluya la muestra lo necesario, registrando esa dilución. La concentración debe ser corregida por dilución después de la corrida.
- 10.5.5. Analice los patrones de calibración, CVS, y las muestras e HPLC usando una columna Biorad AminexHPX-87H con su apropiada columna de guarda.
- Condiciones del HPLC:  
Volumen de muestra: 50  $\mu\text{L}$   
Fase móvil: ácido sulfúrico 0.005 M, filtrada por 0.2  $\mu\text{m}$  y desgasificado  
Velocidad de flujo: 0.6 mL/minuto  
Temperatura de la columna: 55 - 65°C  
Temperatura del detector: tan cerca de la temperatura de la columna como sea posible  
Detector: Refractómetro  
Tiempo de la corrida: 50 minutos

## 11. Cálculos

11.1. Calcule el peso seco (ODW) de la muestra libre de extractivos, usando el contenido promedio de sólidos totales determinado por el LAP del NREL “Standard Method for the Determination of Total Solids in Biomass”.

$$ODW = \frac{W_{\text{Muestra secada al aire}} \times \% \text{Sólidos Totales}}{100}$$

11.2. Calcule y registre el porcentaje en peso del residuo insoluble en ácido (AIR) y de la lignina insoluble en ácido (AIL) en una base libre de extractivos

$$\%AIR = \frac{W_{\text{crisol+AIR}} - W_{\text{crisol}}}{ODW_{\text{Muestra}}} \times 100$$

$$\%AIL = \frac{(W_{\text{crisol+AIR}} - W_{\text{crisol}}) - (W_{\text{crisol+ceniza}} - W_{\text{crisol}}) - W_{\text{Proteinas}}}{ODW_{\text{Muestra}}} \times 100$$

Donde:

$W_{\text{Proteinas}}$  = cantidad de proteínas presentes en el residuo insoluble en ácido, y determinado por el LAP del NREL “Determination of Protein Content in Biomass”. Esta medición es solo necesaria si la biomasa contiene una gran cantidad de proteínas.

11.3. Calcule la cantidad de lignina soluble en ácido (ASL) en base libre de extractivos

$$\%ASL = \frac{UVabs \times Volumen_{\text{Filtrado}} \times Dilución}{\epsilon \times ODW_{\text{muestra}}} \times 100$$

Donde:

$UVabs$  = promedio de la absorbancia UV-Vis para la muestra a 320 nm

$Volumen_{\text{Licor de hidrólisis}}$  = volumen de filtrado, 87 mL

$$Dilución = \frac{Volumen_{\text{muestra}} + Volumen_{\text{solvente}}}{Volumen_{\text{muestra}}}$$

$\epsilon$  = absorbencia de la biomasa a una longitud de onda especifica (revisar la Tabla 2)

Tabla 2. Constantes de absorbencia para la medida de lignina soluble en ácido para selectos tipos de biomasa

Tipo de biomasa	Lambda máxima (nm)	Absorbencia al Lambda máxima (L/g cm)	Longitud de onda sugerida (nm)	Absorbencia a la longitud de onda sugerida (L/g cm)
Pinus Radiata- NIST SRM 8493	198	25	240	12
Bagasse- NIST SRM 8491	198	40	240	25
Corn Stover- NREL supplied feedstock	198	55	320	30
Populus deltoides NIST SRM 8492	197	60	240	25

Nota: los valores de lambda frecuentemente contienen picos que interfieren de los productos de degradación de carbohidratos. Los valores recomendados de longitud de onda han sido escogidos para disminuir estas interferencias.

11.4. Calcular la cantidad total de lignina en una base libre de extractivos.

$$\%Lignina_{Libre\ de\ extractivos} = \%AIL + \%ASL$$

11.5. Calcular el valor total de lignina en base a como se recibió, si es necesario

$$\%Lignina_{Como\ se\ recibe} = (\%Lignina_{Libre\ de\ extractivos}) \times \frac{(100 - \% Extractivos)}{100}$$

Donde:

%Extractivos= es el porcentaje de extractivos en la muestra de biomasa preparada, el cual es determinada en el LAP de NREL “Determination of Extractives in Biomass”

11.6. Cree una curva de calibración para cada analito a ser cuantificado usando regresión lineal. A partir de estas curvas, determine la concentración mg/mL de cada componente presente en las muestras analizadas por HPLC, corrigiendo por dilución si fuese necesario.

11.7. Calcule y registre la cantidad de cada Patrón de Verificación de Calibración (CVS) recuperado en el análisis de HPLC.

$$\%CVS_{Recuperado} = \frac{\text{concentración detectada por HPLC, mg/mL}}{\text{concentración conocida del patrón, mg/mL}} \times 100$$

11.8. Para los patrones de recuperación de azúcares (SRS), calcule la cantidad de cada componente azúcar recuperado después de la hidrólisis de ácido diluido, considerando cualquier dilución hecha previamente al análisis en HPLC. Promedie cualquier valor de replica (%R<sub>azúcar</sub>) obtenido para cada azúcar individualmente y reportar %R<sub>Azúcar Promedio</sub>.

$$\%R_{azúcar} = \frac{\text{concentración detectada por el HPLC, mg/mL}}{\text{concentración conocida del azúcar antes de la hidrólisis, mg/mL}} \times 100$$

11.9. Use los valores de los porcentajes de la recuperación de azúcares hidrolizados calculados en el paso 11.8. para corregir los valores correspondientes de concentración de azúcar obtenidos por HPLC para cada muestra de hidrolizado (C<sub>muestra corr.</sub>), teniendo en cuenta cualquier dilución previa al análisis de HPLC.

$$C_x = \frac{C_{HPLC} \times \text{factor de dilución}}{\%R_{azúcar promedio} / 100}$$

Donde:

C<sub>HPLC</sub>= concentración de los azúcares determinada por el HPLC, mg/mL

%R<sub>Azúcar Promedio</sub>= promedio de recuperación de un componente SRS específico.

C<sub>x</sub> = C<sub>muestra corr.</sub>, concentración en mg/mL de azúcar en la muestra del hidrolizado después de la corrección por pérdidas en la hidrólisis al 4%

11.10. Calcule la concentración de los azúcares poliméricos de la concentración de los correspondientes azúcares monoméricos, usando una corrección anhidro de 0.88 (o 132/150) para azúcares c-5 (xilosa y arabinosa) y una corrección de 0.90 (o 162/180) para azúcares c-6 (glucosa galactosa o manosa)

$$C_{anidro} = C_{corr} \times \text{Corrección anidro}$$

11.11. Calcular el porcentaje de cada azúcar en una base libre de extractivos

$$\%Azucar_{\text{Libre de extractivos}} = \frac{C_{anidro} \times V_{filtrado} \times \frac{1g}{1000mg}}{ODW_{muestra}} \times 100$$

Donde:

$V_{filtrado}$  = volumen del filtrado, 87.00 mL

11.12. Calcule el porcentaje de cada azúcar sobre la base que fue recibida, si es necesario

$$\%Azucar_{\text{como se recibe}} = (\%Azucar_{\text{libre de extractivos}}) \times \frac{(100 - \%Extractivos)}{100}$$

Donde:

$\%Extractivos$  = porcentaje de extractivos presentes en la muestra preparada, y determinada con el LAP del NREL "Determination of Extractives in Biomass"

11.13. Calcular el porcentaje de acetato en una base libre de extractivos.

$$\%Acetato_{\text{Libre de extractivos}} = \frac{C_{AA,HPLC} \times Volumen_{filtrado} \times \text{factor de conversión}}{ODW_{muestra}}$$

Donde:

$C_{AA,HPLC}$  = Concentración en mg/mL de ácido acético determinada por HPLC

$Volumen_{licor de hidrólisis}$  = volumen del filtrado, 87 mL

Factor de conversión=0.683, la conversión de ácido acético a acetato en biomasa

11.14. Calcular el porcentaje de acetilo sobre la base que se recibió, si es necesario.

$$\%Acetilo_{\text{como se recibe}} = (\%Acetilo_{\text{libre de extractivos}}) \times \frac{(100 - \%Extractivos)}{100}$$

11.15. Para reportar o calcular la diferencia relativa porcentual (RPD) entre dos muestras, haga el siguiente cálculo:

$$RPD = \left[ \frac{(X_1 - X_2)}{\bar{X}} \right] \times 100 ;$$

donde  $X_1$  y  $X_2$  son los valores medidos, y el  $\bar{X}$  es el promedio de las mediciones

11.16. Para reportar o calcular la desviación estándar de las muestras, utilice los siguientes cálculos:

- Primero encuentre la raíz cuadrada promedio de la muestra (RMS), usando:

$$RMS = x_p = \text{promedio} = \sqrt{\left( \frac{\sum_1^n x}{n} \right)^2}$$

- Ahora encuentre la desviación estándar usando:

$$\sigma = \sqrt{\left( \frac{\sum_1^n (x_i - x_p)^2}{n} \right)} ; \text{ donde:}$$

$x_p$  = la raíz cuadrada promedio de todos los valores de  $x$

$n$  = número de muestras

$x_i$  = valor medido

## 12. Formato de reporte

12.1. Reporte el porcentaje en peso de lignina, cada azúcar y acetato. Reporte en base a como se recibió, corrigiendo por extractivos si es necesario.

12.2. Para análisis por replicado de la misma muestra, reporte el promedio, desviación estándar y %RPD.

## 13. Precisión y sesgo

13.1. *Ensayo interlaboratorio* – para reportar documentación para ensayos interlaboratorios de métodos de análisis de biomasa , mirar Milne et al., 1992.

#### **14. Control de calidad**

14.1. Cifras significativas reportadas o lugares decimales: esta determinado por los objetivos de la calidad de datos y por el plan específico para la garantía en el laboratorio (Quality Assurance Plan- QAP), ver LAB de la NREL “Rounding and Significant Figures”

14.2. Replicas: experimente todas las corridas y lo patrones de métodos de verificación, si es aplicable, mínimo al duplicado.

14.3. Blanco: ninguno

14.4. Criterio relativo de la diferencia de porcentajes: determinado por los objetivos de calidad de datos y por plan específico para la garantía en el laboratorio (Quality Assurance Plan- QAP)

14.5. Patrones para verificación de calibración (CVS): los CVS deben ser preparados y analizados independientemente como se debe, por el procedimiento

14.6. Tamaño de muestra: 4g, mínimo, de muestra, extraída si es necesario (incluyendo la cantidad de sólidos totales)

14.7. Almacenamiento de la muestra: los licores de hidrólisis pueden ser almacenados en un refrigerador por poco más de 2 semanas.

14.8. Almacenamiento de patrones: los patrones de HPLC deberían ser almacenados en un congelador y retirados para cuando se necesite.

14.9. Reparación de patrones: los patrones deben ser preparados como se describe en el procedimiento, incluyendo los patrones tipo QA

14.10. Definición de un lote: cualquier número de muestras que son analizadas y registradas juntas. La máxima talla del lote se recomienda ser de 3 a 6 muestras con patrones QA, todos corridos en duplicado.

14.11. Cuadros de control: todos los CVS, SRS

#### **15. Apéndices**

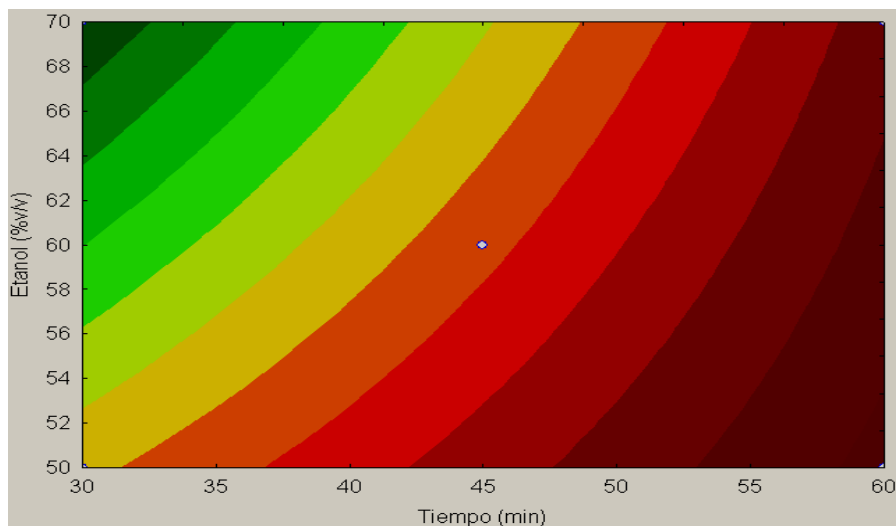
15.1. Ninguno

#### **16. Referencias**

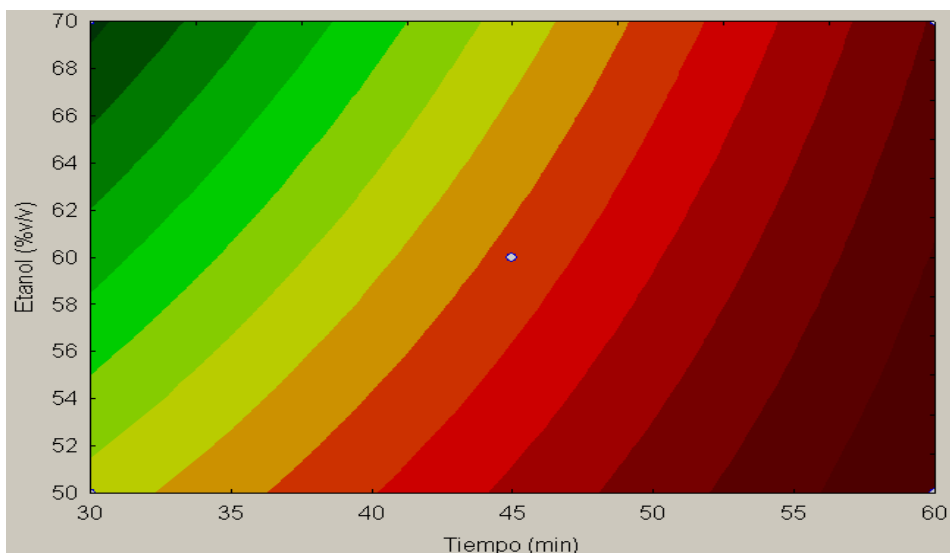
16.1. NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure "Determination of Total Solids in Biomass".

- 16.2. NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure "Determination of Ash in Biomass".
- 16.3. NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure "Determination of Extractives in Biomass".
- 16.4. NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#002 "Determination of Structural Carbohydrate Content in Biomass by High Performance Liquid Chromatography".
- 16.5. NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#003 "Determination of Acid Insoluble Lignin in Biomass".
- 16.6. NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#017 "Determination of o-Acetyl Groups in Biomass by High Performance Liquid Chromatography".
- 16.7. NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#019 "Hydrolysis of Corn Stover for Compositional Analysis".
- 16.8. Moore, W., and D. Johnson. 1967. Procedures for the Chemical Analysis of Wood and Wood Products. Madison, WI: U.S. Forest Products Laboratory, U.S. Department of Agriculture.
- 16.9. ASTM E1758-01 "Standard method for the Determination of Carbohydrates by HPLC: In *2003 Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.05*. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, International.
- 16.10. Milne, T. A.; Chum, H. L.; Agblevor, F. A.; Johnson, D. K. (1992). "Standardized Analytical Methods" Biomass & Bioenergy. Proceedings of International Energy Agency Bioenergy Agreement Seminar", 2-3 April 1992, Edinburgh, U.K.. Vol. 2(1-6), 1992; pp. 341-366

**Anexo F. Curvas de nivel Etanol- Tiempo de reacción para los niveles máximo y mínimo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

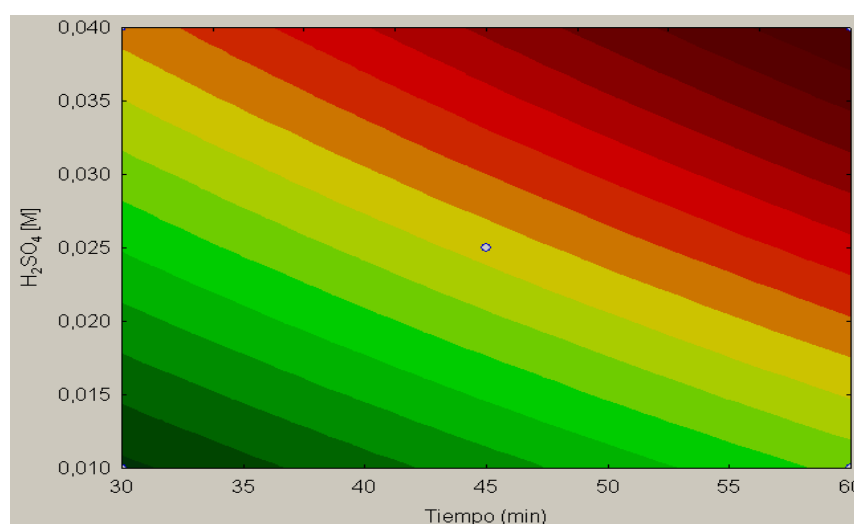


**Figura F1.** Curva de nivel de etanol vs tiempo de reacción con variable de respuesta % ART de pretratamiento manteniendo concentración H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en el punto mínimo (0,01 M).

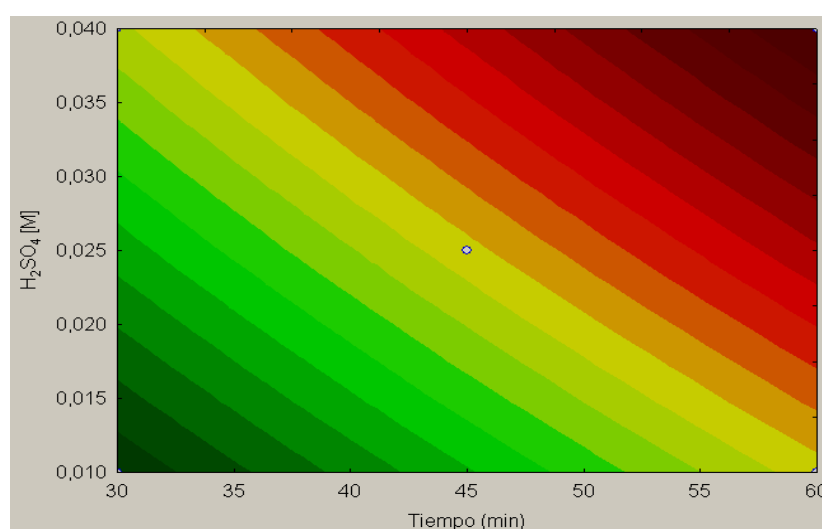


**Figura F2.** Curva de nivel de etanol vs tiempo de reacción con variable de respuesta % ART de pretratamiento manteniendo concentración H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en el punto máximo (0,04 M).

**Anexo G. Curvas de Nivel  $H_2SO_4$ -Tiempo de reacción, para los niveles máximo y mínimo de concentración de etanol**

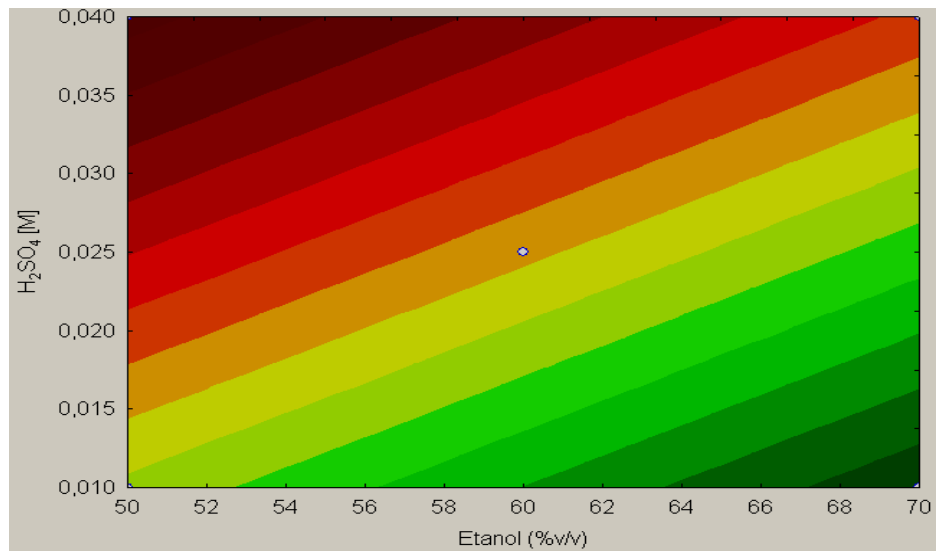


**Figura G1.** Curva de nivel de  $H_2SO_4$ -Tiempo de reacción con variable de respuesta % ART de pretratamiento manteniendo concentración de etanol en el punto mínimo (50 % v/v).

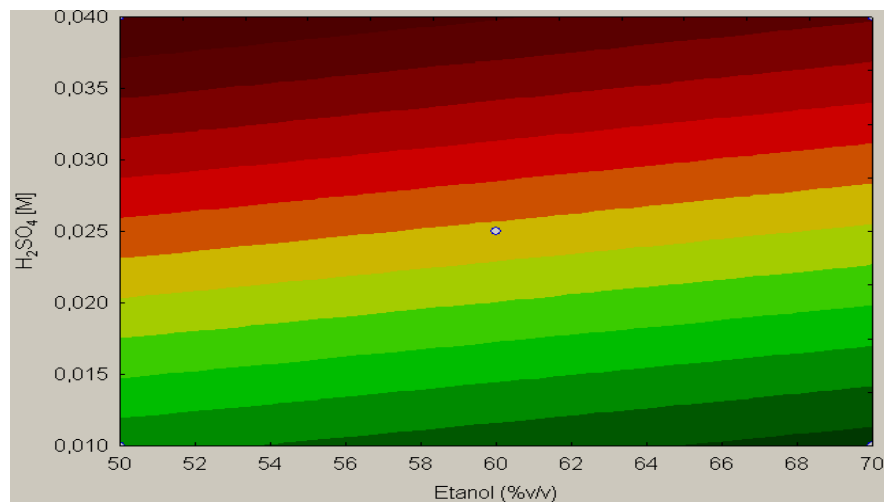


**Figura G2.** Curva de nivel de  $H_2SO_4$ -Tiempo de reacción con variable de respuesta % ART de pretratamiento manteniendo concentración de etanol en el punto máximo (70 % v/v).

**Anexo H. Curvas de Nivel  $H_2SO_4$ - Etanol, para los niveles máximo y mínimo de tiempo de reacción**



**Figura H1.** Curva de nivel de  $H_2SO_4$ - Etanol con variable de respuesta % ART de pretratamiento manteniendo el tiempo de reacción en el punto mínimo (30 min).



**Figura H2.** Curva de nivel de  $H_2SO_4$ - Etanol con variable de respuesta % ART de pretratamiento manteniendo el tiempo de reacción en el punto máximo (60 min).