

**ESTUDIO DEL PROCESO DE PRETRATAMIENTO TERMOMECÁNICO  
CONTINUO UTILIZANDO BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR IMPREGNADO  
CON ÁCIDO SULFÚRICO DILUIDO AL 1% P/P EN EL REACTOR  
DESARROLLADO POR UIS-ECOPETROL**

**ÁLVARO ENRIQUE LÓPEZ VERA  
YADIRA VIVIANA PIRATEQUE LAYTON**

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

**2017**

**ESTUDIO DEL PROCESO DE PRETRATAMIENTO TERMOMECAÁNICO  
CONTINUO UTILIZANDO BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR IMPREGNADO  
CON ÁCIDO SULFÚRICO DILUIDO AL 1% P/P EN EL REACTOR  
DESARROLLADO POR UIS-ECOPETROL**

**ÁLVARO ENRIQUE LÓPEZ VERA**

**YADIRA VIVIANA PIRATEQUE LAYTON**

**Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico**

**Director**

**VIATCHESLAV KAFAROV**

**Ph-D. Ingeniería química**

**Co-Director:**

**Neila Milena Mantilla Barbosa**

**Ingeniera química**

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

**2017**

*A Dios y a la Virgen, porque en los momentos más difíciles siempre me tendieron su mano y me ayudaron a cumplir este sueño.*

*A mis padres y hermanos, por su dedicación, apoyo en todo momento y porque son mi ejemplo a seguir.*

*A mis docentes, por brindarme su conocimiento a lo largo de la carrera para mi formación profesional y personal.*

*A mis amigos, que de una u otra forma hicieron parte de este proceso.*

*A Jhoan, por sus consejos, su apoyo y su amor incondicional.*

*Yadira Viviana Pirateque Layton*

*A mi madre, Raquel.*

*Álvaro Enrique López Vera*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Doctor Viatcheslav Kafarov, por su interés y dedicación con este proyecto.

A la Ingeniera Neila Mantilla, por ser una guía para nosotros y por su apoyo.

A los técnicos del Laboratorio de Operaciones Unitarias y Laboratorio

Especializado de la Escuela de Ingeniería Química, Eduardo Carreño, Wilson Carreño y Guillermo Acero por su colaboración en el proceso de este proyecto.

Al grupo del laboratorio de biomasa y al grupo del laboratorio de digestión anaeróbica, por su compañía y apoyo.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>pag</b>
INTRODUCCIÓN .....	16
1. METODOLOGÍA.....	22
1.1 FASE 1: DETERMINACIÓN DE RANGOS DE LAS VARIABLES DE OPERACIÓN EN LA ZONA DE ALIMENTACIÓN .....	22
1.2 FASE 2: ADECUACIÓN Y PUESTA EN MARCHA DEL EQUIPO DE PRETRATAMIENTO TERMOMECAÁNICO.....	24
1.3 FASE 3: DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE TIEMPOS DE RESIDENCIA.....	25
1.4 FASE 4: CARACTERIZACIÓN BIOMASA PRETRATADA .....	25
1.5 FASE 5: BALANCE DEL EQUIPO DE PRETRATAMIENTO TERMOMECAÁNICO.....	27
2. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	28
2.1 FASE 1: DETERMINACIÓN DE RANGOS DE LAS VARIABLES DE OPERACIÓN EN LA ZONA DE ALIMENTACIÓN .....	28
2.2 FASE 2: ADECUACIÓN Y PUESTA EN MARCHA DEL EQUIPO DE PRETRATAMIENTO TERMOMECAÁNICO.....	32
2.3 FASE 3: DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE TIEMPOS DE RESIDENCIA .....	34
2.3 FASE 4: CARACTERIZACIÓN BIOMASA PRETRATADA Y FASE 5: BALANCE DEL EQUIPO DE PRETRATAMIENTO TERMOMECAÁNICO .....	36
3. CONCLUSIONES.....	41
4. RECOMENDACIONES .....	42

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXOS.....	50

## LISTA DE FIGURAS

	<b>pag</b>
Figura 1. Esquema de las secciones en el equipo de referencia. ....	18
Figura 2. Diagrama de la metodología desarrollada durante este proyecto.....	22
Figura 3. Comportamiento del amperaje del motor de alimentación en función del tiempo para las pruebas del diseño experimental.....	28
Figura 4. Pruebas adicionales para establecer flujo de alimentación. ....	30
Figura 5. a) Prueba de alimentación después de modificaciones, N°11 b) Prueba N°1.....	31
Figura 6. Prueba 30 g/min equipo de pretratamiento termomecánico .....	33
Figura 7. a) Biomasa de alimentación impregnada con y sin trazador. b) Biomasa pretratada con y sin trazador. ....	35

## LISTA DE CUADROS

	<b>Pag</b>
Cuadro 1. Variables independientes y niveles utilizados en el estudio. ....	23
Cuadro 2. Combinaciones del arreglo experimental. ....	23
Cuadro 3. Tiempos de residencia determinados experimentalmente. ....	34
Cuadro 4. Datos de caracterización: a) Sólidos (Biomasa de entrada y salida). b) Licor (Licor de entrada y de salida).....	39
Cuadro 5. Balance de carbono en el reactor de pretratamiento. ....	40

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pag</b>
Anexo A. Descripción del equipo de pretratamiento termomecánico.....	50
Anexo B. Protocolo caracterización. ....	56
Anexo C. Protocolo para la elaboración de curvas de calibración. ....	69
Anexo D. Gráficas de las pruebas en todo el equipo. ....	83
Anexo E. Balance de carbono.....	85

## ABREVIATURAS

PTM: Pretratamiento termomecánico

TR: Tiempo de residencia

STe: Sólidos totales entrada

STs: Sólidos totales salida

w: Velocidad angular

ṁ: Flujo másico

$\sigma$ =desviación estándar.

## RESUMEN

**TÍTULO:** ESTUDIO DEL PROCESO DE PRETRATAMIENTO TERMOMECAÁNICO CONTINUO UTILIZANDO BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR IMPREGNADO CON ÁCIDO SULFÚRICO DILUIDO AL 1% P/P EN EL REACTOR DESARROLLADO POR UIS-ECOPETROL\*

**AUTORES:** Álvaro Enrique López Vera y Yadira Viviana Pirateque Layton.\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Bioetanol, pretratamiento, caracterización, caña de azúcar, lignocelulosa, hemicelulosa, celulosa, balance de carbono.

### DESCRIPCIÓN:

Este trabajo se realizó con el objetivo de evidenciar la influencia de la etapa de pretratamiento en el bagazo de caña de azúcar impregnado con ácido sulfúrico diluido al 1% p/p, utilizado como materia prima para la producción de bioetanol. Para cumplir el objetivo planteado, en primer lugar, fue necesario llevar a cabo la puesta en marcha del reactor. Para esto, se realizaron las pruebas del diseño experimental 2<sup>2</sup> con puntos centrales y se determinó el rango de flujo másico junto con la velocidad adecuada del motor en la sección de alimentación. Posteriormente, se eligieron combinaciones de flujo y velocidades de los tres motores del equipo, se realizaron pruebas y se eligieron las que permitieron el flujo continuo de biomasa. Con los parámetros de operación establecidos, se halló experimentalmente el tiempo de residencia con los extremos del flujo de alimentación del rango seleccionado anteriormente (30 y 80 g/min); los tiempos determinados fueron 15 y 9 min, respectivamente. Finalmente, para el análisis de la influencia del pretratamiento, se caracterizó la biomasa de salida del equipo y se comparó con la biomasa alimentada. Se encontró que el proceso afecta en mayor medida la hemicelulosa, puesto que la reducción de xilano y el aumento de xilosa en los licores son considerables. Además, se realizó el balance de carbono al pretratamiento y se determinó que el porcentaje de recuperación de carbono en las corrientes de salida del proceso es de 96,9%.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Viatcheslav Kafarov. Co-director: Ing. Neila Milena Mantilla Barbosa.

## ABSTRACT

**TITLE:** STUDY OF A CONTINUOUS TERMOMECHANIC PRETREATMENT PROCESS USING SUGAR CANE BAGASSE IMPREGNATED WITH 1% P/P SULFURIC ACID IN A REACTOR DEVELOPED BY UIS-ECOPETROL.

**AUTHORS:** Álvaro Enrique López Vera and Yadira Viviana Pirateque Layton. \*\*

**KEY WORDS:** Bioethanol, Pretreatment, characterization, sugar cane, lignocellulose, hemicellulose, cellulose, Carbon Balance.

### DESCRIPTION:

The main goal of this work was to observe the pretreatment step's influence over sugar cane impregnated with 1% wt diluted sulfuric acid, which will later be employed as a raw material for ethanol production. To achieve this goal, it was necessary to put the pretreatment reactor into operation. Some tests following a 2<sup>2</sup> factorial design with central points were carried out in order to determine a range of mass flow and the loop screw motor's angular velocity in the feeding section hence, flow continuity can be attained. Subsequently, other equipment's sections were adapted as well, choosing appropriate loop screw motors' angular velocities. Once the operation parameters were established, residence time was found for mass flows of 30 g/min and 80 g/min, being 15 and 9 minutes respectively. Finally, fed biomass (incoming) and pretreated biomass (outgoing) were characterized and compared each other. Hemicellulose in the biomass was highly affected, it was found a xylan reduction in solids then transformed into xylose in liquor. A carbon balance in the reactor was performed, obtaining a carbon recuperation percentage of 96,9%.

---

\*\*Physicochemical Engineering Faculty. Chemical Engineering School. Director: Ph.D. Viatcheslav Kafarov. Co-director: Ing. Neila Milena Mantilla Barbosa.

## INTRODUCCIÓN

La economía del mundo actualmente depende en gran medida de los combustibles fósiles, sin embargo, el consumo excesivo de ellos ha generado altos niveles de contaminación durante las últimas décadas. A causa de esto, la sociedad ha enfocado sus esfuerzos en la búsqueda de alternativas más limpias a partir de recursos renovables. Los biocombustibles, como el bioetanol, pueden reemplazar los combustibles fósiles y la gasolina que es particularmente usada en el sector de transporte [1]. Comparado a la gasolina, el bioetanol posee grandes ventajas como lo es su elevado octanaje, menor emisión de  $\text{SO}_2$  Y  $\text{CO}_2$ , mayores límites de flama y mayores calores de vaporización [2].

El bioetanol puede ser producido a partir de diferentes materias primas, las cuales se clasifican en tres categorías: azúcares simples, almidones y lignocelulosa. La biomasa lignocelulósica es una materia prima prometedora, considerando su gran disponibilidad y bajo costo [3]. Esta biomasa contiene polímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina; ligados entre sí, formando una compleja estructura [4].

La producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica vía bioquímica está compuesta de cinco etapas principales. La primera de ellas es el pretratamiento de la biomasa, la cual es fundamental, puesto que en ella se busca modificar la estructura química y física de la biomasa, para reducir la cristalinidad de la celulosa e incrementar el área superficial y la porosidad del material con el objetivo de que sea más accesible a las enzimas hidrolíticas. Posteriormente, la biomasa es sometida a un proceso de hidrólisis en el cual la celulosa es degradada hasta glucosa (sacarificación) usando ácidos o enzimas. Una vez la hidrólisis es completada, la glucosa y xilosa hidrolizada resultante es fermentada y convertida en etanol con ayuda de microorganismos, para finalmente realizar una separación y purificación al etanol [5].

A través de los años y con el objetivo de mejorar el rendimiento del proceso se han desarrollado varios métodos de pretratamiento, los cuales pueden ser clasificados en termoquímicos, físicos, físicoquímicos y biológicos [6]. Entre los métodos termoquímicos se pueden encontrar el pretratamiento ácido, pretratamiento alcalino, oxidación húmeda y pretratamiento con solvente orgánico; entre los métodos físicos se encuentran la reducción mecánica de tamaño, pretratamiento por horno microondas e irradiación con rayos de electrones; entre los métodos físicoquímicos se encuentran la autohidrólisis o explosión de vapor, pretratamiento con agua caliente líquida, explosión por fibra de amonio y los métodos biológicos, que se fundamentan en el uso de microorganismos [7].

Por esta razón, dentro del marco de la tesis doctoral de la Ingeniera Neila Mantilla, se diseñó un reactor de pretratamiento termomecánico (PTM) que combina tres de estos pretratamientos:

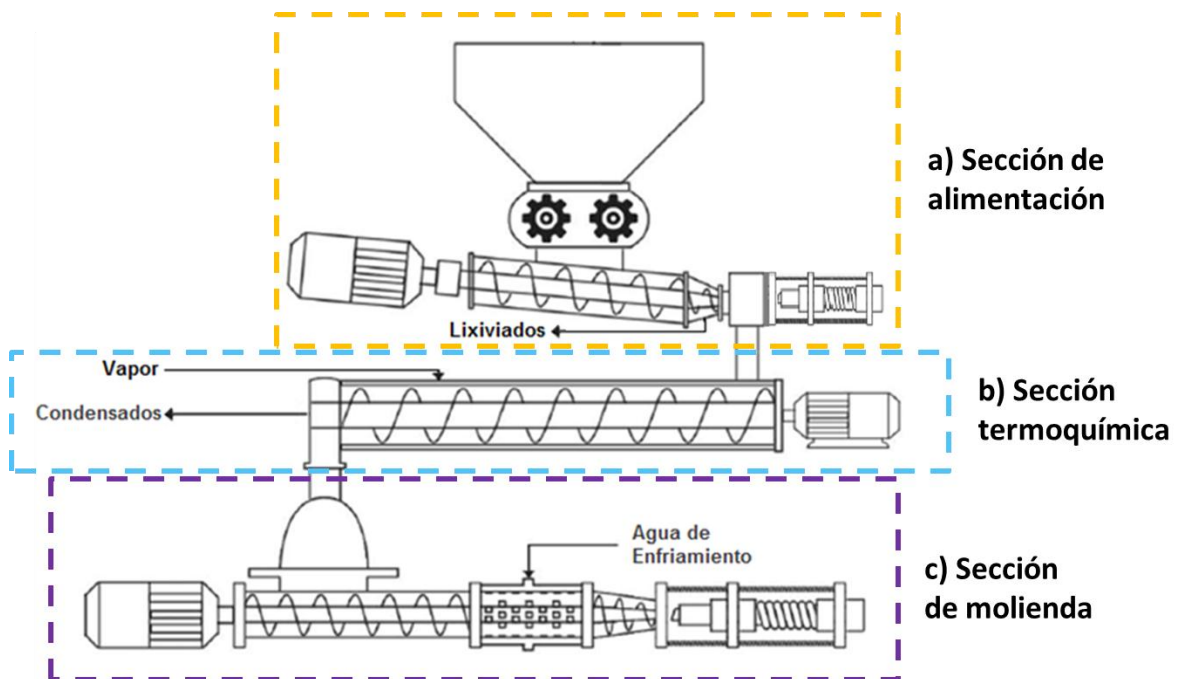
- Reducción mecánica de tamaño: Este método se basa en la conminación de la biomasa por medio del triturado, la molienda y astillado. Esto reduce a cristalinidad de la celulosa y aumenta la eficiencia de etapas siguientes [8].

- Pretratamiento ácido: El pretratamiento ácido es considerado como uno de las más importantes técnicas con las que se logra tener altos rendimientos de azúcares a partir de material lignocelulósico [9]. Este pretratamiento usa ácidos como el sulfúrico, nítrico y clorhídrico para la remoción de componentes hemicelulósicos en la biomasa y la exposición de celulosa a la digestión enzimática [10]. El pretratamiento puede realizarse con ácidos diluidos o fuertes, aunque el pretratamiento con ácidos muy fuertes es poco atractivo por el riesgo de formación de inhibidores [11], siendo típicamente concentraciones entre 1 y 10% peso y con rangos de temperatura entre 100 y 150°C [12].

•Explosión de vapor: La explosión de vapor es un pretratamiento sin catalizador en el cual la biomasa lignocelulósica es rápidamente calentada por vapor a una alta presión. Esta mezcla se mantiene por un periodo de tiempo que promueva la hidrólisis de la hemicelulosa y termina con una descompresión explosiva. Con maderas blandas (con alto contenido de lignina), el pretratamiento con vapor necesita la adición de sustancias como ácido sulfúrico o dióxido de sulfuro que permitan alcanzar altos rendimientos de azúcares [13].

Este equipo está diseñado con tres secciones conformadas por transportadores tipo tornillo sin-fin (Ver Anexo A), buscando desarrollar un proceso de pretratamiento combinado que ofrezca una alternativa promisoriosa con respecto a la sostenibilidad técnica y económica del proceso.

**Figura 1. Esquema de las secciones en el equipo de referencia.**



Fuente ACUÑA, Fabian y CONTRERAS, Oscar. Análisis teconómico del proceso de producción de etanol, implementando un pretratamiento termomecánico con ácido sulfúrico diluido y su comparación con el caso base del NREL.

Este equipo consta de tres secciones, en la sección de alimentación (Figura 1, a) ingresa la biomasa impregnada con ácido sulfúrico diluido a 1% p/p, la cual es transportada por un tornillo sin fin con cambio de diámetro, lo que permite un aumento en el porcentaje de sólidos. El líquido extraído evacua el equipo por unos orificios ubicados en la parte final de la sección. Además, hay una preno-estopa que, junto con el tornillo sin fin, crean un tapón de biomasa que ayuda a que el equipo se mantenga presurizado cuando ingrese vapor.

En la sección termoquímica (figura 1, b) ingresa vapor a 130°C y 25 psi tanto por el interior del cilindro como la chaqueta que lo rodea. Los condensados producidos en la sección son evacuados por una salida al final del cilindro. Finalmente, en la sección de molienda (Figura 1, c), la biomasa es sometida a una trituración mecánica, esto produce un aumento de temperatura, la cual es controlada con agua de enfriamiento. Al igual que en la sección de alimentación, ésta cuenta con otra preno-estopa, cumpliendo la misma función

Para poder describir la efectividad del proceso de PTM, es necesario saber cómo éste influye sobre la estructura lignocelulósica de la biomasa. Para este análisis, es útil realizar una caracterización de la biomasa del bagazo de caña de azúcar antes y después del pretratamiento. Para la caracterización de la biomasa, el Laboratorio Nacional de Energía Renovable de los Estados Unidos (NREL, por sus siglas en inglés) ha desarrollado una serie de procedimientos analíticos de laboratorio, los cuales, además, permiten realizar un balance de masa de materias primas e intermedias de proceso. Para lograrlo, se fracciona la muestra de biomasa en componentes que sumen el 100% en peso. Algunos de estos constituyentes son componentes individuales, como carbohidratos, y algunos son grupos de compuestos, como material extraíble [14].

De igual manera, el tiempo de residencia (TR) toma gran importancia, puesto que se deben controlar las transformaciones transitorias tales como el calentamiento, enfriamiento, secado, mezcla o reacción química del material sólido [15] que influyen considerablemente en el perfil del producto, el rendimiento total del proceso y la continuidad del mismo [16].

Normalmente, el TR es hallado experimentalmente al introducir una sustancia inerte (llamado trazador) en el reactor en algún tiempo ( $t=0$ ) y luego medir la concentración en el efluente del mismo. Gran parte de las partículas saldrán del reactor después de un periodo de tiempo similar, siendo viable calcular un tiempo promedio mediante el primer momento estándar de la distribución, el cual es llamado tiempo de residencia principal ( $t_m$ ) [17]. Sin embargo, el TR también puede ser determinado de forma más simplificada al registrar un cambio en el material a la salida del reactor, ya sea por medio de un trazador (identificado visualmente) o por medio de un cambio en el flujo de alimentación (identificado en el flujo de salida hasta que éste alcanza un nuevo estado estable) [18].

En la selección del trazador se debe tener en cuenta tres cualidades principales: en primer lugar, sus propiedades deben ser similares a las de la biomasa, con el fin de evitar el mayor número de perturbaciones posibles. Debe ser inerte, sorteando así los cambios de composición en su paso por el reactor; por último, debe ser un material que sea fácilmente detectable al estar en contacto con la biomasa, lo cual permite monitorear su salida del proceso [19]. Para el caso de este proyecto el equipo de PTM se encuentra en la etapa de puesta en marcha, la cual tiene como fin encontrar las condiciones de operación y realizar los ajustes mecánicos necesarios para su correcto funcionamiento.

Cabe resaltar que para la determinación del tiempo de residencia es necesario establecer previamente las condiciones de operación del reactor de PTM (flujo de alimentación y velocidad de cada uno de los tornillos del equipo), de forma tal que garanticen un flujo continuo. Éste se diseñó de esta manera, debido a que los procesos continuos poseen varias ventajas: alta productividad, especialmente cuando la fabricación está dedicada a un número limitado de productos; bajo tiempo de residencia, particularmente cuando la materia prima es de alta densidad y ser más fáciles de controlar [20].

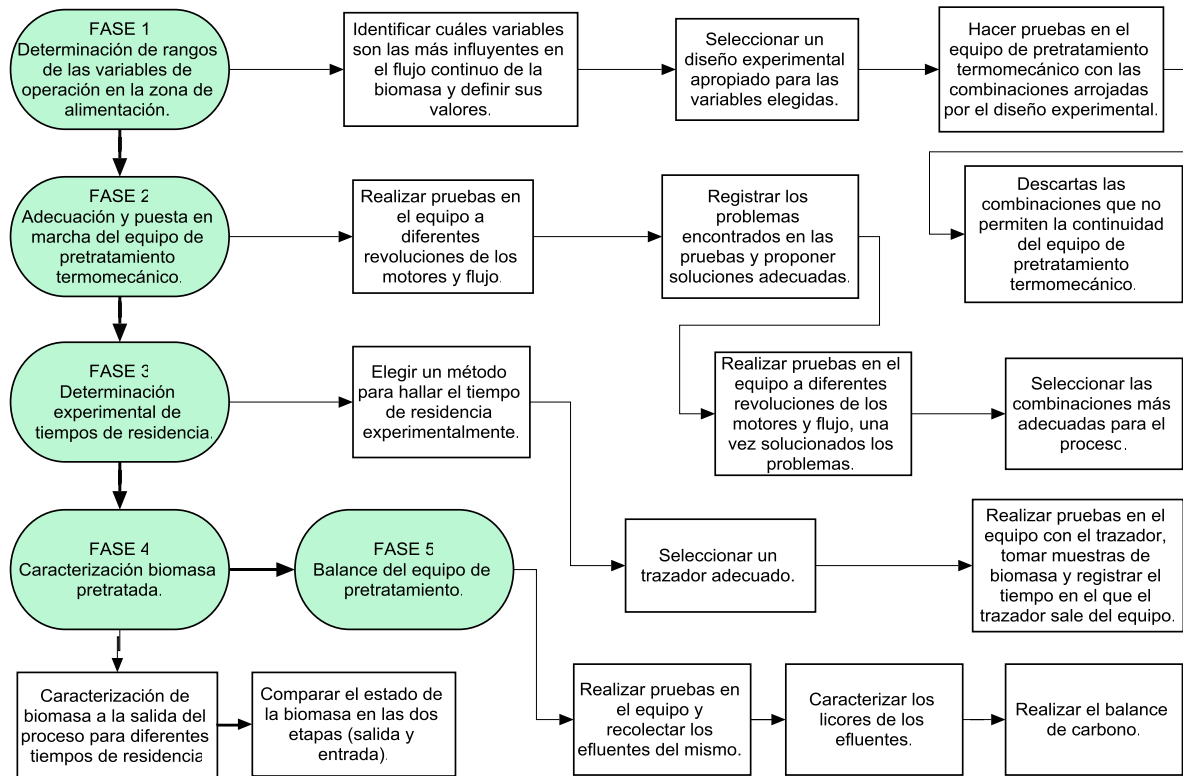
Por otra parte, el balance de masa en el proceso de pretratamiento es importante para la evaluación del mismo y para la revisión de la masa en su totalidad y de sus componentes individuales, en términos de carbono. De esta forma se puede evitar complicaciones con el balance de agua, reacciones de hidratación y deshidratación, y se puede seguir la distribución de carbono entre las fases líquidas y sólidas [21]. En conjunto, la caracterización y el balance darán una base adecuada para juzgar el mecanismo de pretratamiento trabajado.

Por consiguiente, el objetivo principal de este trabajo es conocer el efecto del proceso de pretratamiento en la biomasa impregnada con ácido sulfúrico operando con diferentes tiempos de residencia en el equipo de PTM, para lo cual fue necesario determinar experimentalmente la capacidad del equipo mediante la correlación entre el flujo de biomasa alimentada y las velocidades de los motores del equipo; una vez establecidas las condiciones de operación se halló el tiempo de residencia a partir de pruebas realizadas con un trazador seleccionado. Finalmente, por medio de la caracterización de la biomasa obtenida en el proceso y el balance de masa del proceso de pretratamiento se procedió a realizar el debido análisis de los resultados obtenidos.

# 1. METODOLOGÍA

En la siguiente figura se presenta el diagrama metodológico de las fases desarrolladas para cumplir con los objetivos planteados en este proyecto.

**Figura 2. Diagrama de la metodología desarrollada durante este proyecto.**



## 1.1 FASE 1: DETERMINACIÓN DE RANGOS DE LAS VARIABLES DE OPERACIÓN EN LA ZONA DE ALIMENTACIÓN

Se identificaron las variables más influyentes en la continuidad operacional del equipo (velocidad angular de los motores y flujo de biomasa). Para definir los valores de dichas variables, se partió de lo señalado por Cárdenas y Morantes [22] en su trabajo de grado, en el cual se encontró que la capacidad máxima de flujo es de 100 g/min de biomasa impregnada (20.8 g/min de biomasa seca) y las

revoluciones por minuto del motor de alimentación son de 160. Se realizaron pruebas a estas condiciones en la sección de alimentación y se encontró que la salida de biomasa no fue continua, se dio por pulsos con incrementos en la intensidad de corriente. Por esta razón, se decidió partir de la base de 80 g/min de biomasa impregnada a 160 rpm como valor máximo para el diseño de experimentos  $2^2$  que se realizó, con puntos centrales, donde las variables independientes fueron velocidad del motor de alimentación y flujo de biomasa. En el cuadro 1, se muestran las condiciones trabajadas en el diseño de experimentos.

**Cuadro 1. Variables independientes y niveles utilizados en el estudio.**

Factor	-1	0	1
Velocidad angular del motor (rpm)	80	120	160
Flujo de biomasa (g/min)	40	60	80

Para observar los efectos de las variables de entrada (factores) sobre la variable de respuesta (Intensidad eléctrica), se obtuvieron las siguientes combinaciones para el arreglo experimental:

**Cuadro 2. Combinaciones del arreglo experimental.**

Índice	Orden N° de prueba	Velocidad angular del motor (rpm)	Flujo de biomasa (g/min)
5	1	120	60
4	3	160	80
1	4	80	40
2	2	160	40
7	5	120	60
3	6	80	80
6	7	120	60

Se realizaron pruebas en la zona de alimentación con las combinaciones del cuadro 2, tomando registro de la intensidad eléctrica del motor como variable de salida cada minuto y tomando muestras de biomasa en diferentes tiempos para el análisis de sólidos totales. La intensidad eléctrica del motor en la sección de alimentación presenta una buena forma de observar si se presentan

acumulaciones de biomasa, puesto que una vez el equipo está operando no es posible observar el comportamiento de flujo.

Además, para observar el efecto de otras combinaciones se hicieron tres pruebas adicionales al diseño experimental: Para comprobar el funcionamiento cercano a 40 g/min se hizo la combinación de 50 g/min y 160 rpm, para adicionar una combinación de flujo y revoluciones de motor se realizó una con 60 g/min y 160 rpm y para observar cómo trabaja el equipo con valores bajos de alimentación se hizo la prueba de 20g/min y 80rpm.

Una vez analizado el comportamiento de flujo en la sección de alimentación se plantearon modificaciones al tornillo sin-fin, por su relación principal en el transporte de biomasa. Después de esto, se eligieron 3 flujos para trabajar con el equipo en su totalidad.

## **1.2 FASE 2: ADECUACIÓN Y PUESTA EN MARCHA DEL EQUIPO DE PRETRATAMIENTO TERMOMECAÁNICO**

Se eligieron determinadas revoluciones para los motores de alimentación y un flujo de masa dentro del rango determinado en la fase 1. Posteriormente se realizaron pruebas en el equipo en su totalidad, para esto fue necesario disponer de un mínimo de seis personas para tener el control y manejo adecuado de éste. Las actividades realizadas durante las pruebas fueron: Pesar la biomasa impregnada para proporcionársela a la persona que alimenta; alimentar la biomasa impregnada al equipo; registrar los datos obtenidos por el panel de control; manipular la salida de la biomasa; registrar las observaciones durante la prueba y realizar purgas en el equipo e imprevistos.

En cada una de las pruebas realizadas se registraron los problemas encontrados en el equipo, se les dio solución y se realizaron pruebas nuevamente hasta que el equipo funcionara correctamente, evitando acumulaciones y permitiendo un flujo continuo. Por último, se seleccionaron las combinaciones de las revoluciones de los motores del equipo y el flujo de biomasa más adecuadas para realizar las pruebas en el desarrollo de este trabajo.

### **1.3 FASE 3: DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE TIEMPOS DE RESIDENCIA**

Se eligió Anilina como trazador, puesto que cumplía con las condiciones establecidas para cumplir tal función. Se realizó pruebas en el equipo y se encontró que la anilina es resistente a las condiciones del equipo, mostrando una diferencia notable entre la biomasa pretratada que se suele obtener y la del trazador. Por lo tanto, se registró el tiempo que tardó en salir la biomasa impregnada con anilina como tiempo de residencia.

La anilina es la amina aromática primaria más simple en su constitución, cuyo empleo posee cierta relevancia en la industria de los colorantes, en especial por sus derivados azoicos [23]. Los pigmentos azoicos son extraordinariamente estables frente a ácidos, lejías y soda, lo mismo que frente a gases ácidos que contengan azufre. Estos pigmentos juegan un importante papel en la técnica pictórica desde aproximadamente 1910 [24].

### **1.4 FASE 4: CARACTERIZACIÓN BIOMASA PRETRATADA**

La caracterización de la biomasa pretratada resultante de las diferentes pruebas con el equipo de pretratamiento contempló la determinación de carbohidratos, lignina y cenizas. Para llevar a cabo este proceso, se tomó como guía el protocolo de caracterización (ver anexo B), el cual se basa en las normas establecidas por el

laboratorio nacional de energía renovable [25], con algunas modificaciones. En el protocolo anexo se detalla el procedimiento descrito a continuación.

La biomasa pretratada llamada slurry de pretratamiento contiene líquido y sólido. Las dos fases deben ser caracterizadas. Debido al bajo contenido de humedad presente en el slurry no fue posible extraer el licor contenido en él, por lo cual el slurry se homogeneizó, se diluyó en agua y se centrifugó, proceso del cual se obtuvieron dos corrientes, una líquida y un sólido humectado con la solución. La fase líquida se caracterizó por medio de HPLC para cuantificar el contenido de azúcares, ácido acético, furfural y otros; para la determinación de los oligómeros presentes, se hidrolizó el licor llevando la solución a una concentración de ácido sulfúrico al 4% y condiciones de temperatura de 120°C durante 1 hora, se neutralizó y se determinó por medio de HPLC su contenido, según la norma consignada en el reporte técnico NREL/TP-510-42623 [26].

La fase sólida se lavó hasta obtener los sólidos insolubles de la muestra, los cuales se secaron y se analizaron según la norma consignada en el reporte técnico NREL/TP-510-42627 [27], en la cual, la muestra sufre dos etapas de hidrólisis ácida, la primera a 30°C, 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 1 hora y la segunda 120°C, 4% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 1 hora. De este proceso se obtiene un slurry el cual se filtra, separando el licor del sólido residual. La norma consignada en el reporte técnico NREL/TP-510-42618 [28] asume que toda la hemicelulosa y celulosa es hidrolizada en sus monómeros simples y que solubiliza algo de lignina, mientras que en el sólido residual queda la lignina insoluble y cenizas. Por lo cual, en el licor se determina lignina insoluble en ácido y se neutraliza para determinar su concentración de azúcares y ácido acético mediante HPLC. El sólido residual se lava y se le determina su contenido de cenizas.

Los azúcares en los sólidos obtenidos por medio de HPLC fueron monómeros, llevados a este punto por la hidrólisis en medio ácido. A partir de estos azúcares y con una corrección anhídrido [29] (0,88 para azúcares C-5, xilosa y arabinosa, y 0,90 g polímero/g monómeros para azúcares C-6, glucosa) se halló los correspondientes azúcares poliméricos. La celubiosa y el furfural obtenidos por el HPLC derivada de la hidrólisis ácida, la primera por hidrolisis incompleta y la segunda por degradación de los azúcares, se pasaron a sus azúcares equivalentes. La celubiosa equivale a 2 monómeros de glucosa y el furfural proviene de la degradación 1:1 de xilosa [30], estas sustancias obtenidos en la caracterización se sumaron a sus respectivos azucares. Adicionalmente, los oligómeros analizados en el licor se dejaron en su forma monomérica de forma que se pueda comparar la obtención de azucares con los monómeros. Se hicieron dos procesos de caracterización para cada muestra, cada uno con una réplica.

Los resultados obtenidos de la caracterización se compararon con los de la biomasa antes de ingresar al equipo con el fin de analizar la efectividad de la etapa de pretratamiento. Estos datos fueron extraídos de las caracterizaciones a la biomasa impregnada de ácido realizadas por Arias y Pérez [31].

### **1.5 FASE 5: BALANCE DEL EQUIPO DE PRETRATAMIENTO TERMOMECAÁNICO**

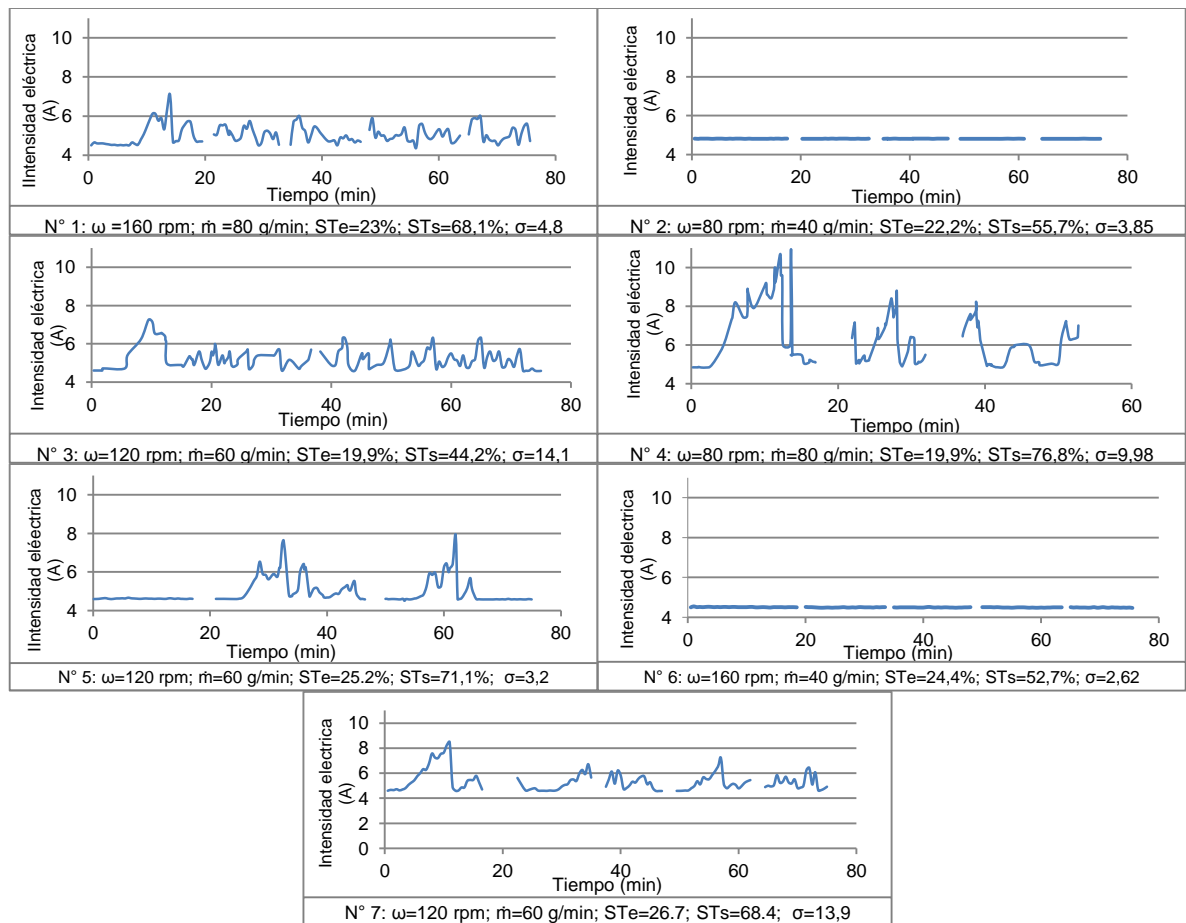
Para el balance del reactor, se hizo una prueba en la cual se alimentaron 80 g/min de biomasa impregnada con ácido sulfúrico al 1% p/p, se esperó a que el equipo alcanzara el estado estable y, posteriormente, se recolectaron los efluentes del equipo de pretratamiento durante 20 minutos. Finalizada la prueba, se pesaron y se caracterizaron los licores de los lixiviados (salida al final de la sección de alimentación) y condensados del equipo (salida al final de la sección termoquímica).

## 2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 2.1 FASE 1: DETERMINACIÓN DE RANGOS DE LAS VARIABLES DE OPERACIÓN EN LA ZONA DE ALIMENTACIÓN

En la primera fase se trabajó en la sección de alimentación siguiendo el diseño experimental planteado en la metodología, garantizando una buena operatividad y flujos de alimentación establecidos para las siguientes etapas.

**Figura 3. Comportamiento del amperaje del motor de alimentación en función del tiempo para las pruebas del diseño experimental.**



La salida de biomasa está representada por la intensidad eléctrica del motor de alimentación (eje y) en el tiempo (eje x), una acumulación en el equipo requiere un mayor esfuerzo del motor, lo cual se refleja en el aumento del amperaje. Por el contrario, cuando el paso de la biomasa por la sección de alimentación es continuo, la intensidad eléctrica se mantiene en un valor fijo, el mismo valor de amperaje que presenta el motor sin carga de biomasa. La intensidad eléctrica de los motores sin carga de biomasa depende de las revoluciones a la cual esté funcionando; de las revoluciones de motores elegidas en el diseño, para los cuales la intensidad eléctrica es: 80 rpm: 4,84 A, 120 rpm: 4,61 A y 160 rpm: 4,5 A.

En la sección de alimentación, la biomasa se somete a una reducción en el porcentaje de sólidos, resultado de su compresión y presencia en altas temperaturas cuando ésta transita por un cono con una reducción del área transversal (Anexo A, sección alimentación). La continuidad en el flujo en esta sección permite que toda la biomasa alimentada al equipo permanezca aproximadamente el mismo tiempo en el cono y así pase a la siguiente sección con un porcentaje de sólidos similar, condición deseada puesto que se requiere homogeneidad en el proceso. Los datos obtenidos de la primera fase se registran en la figura 2.

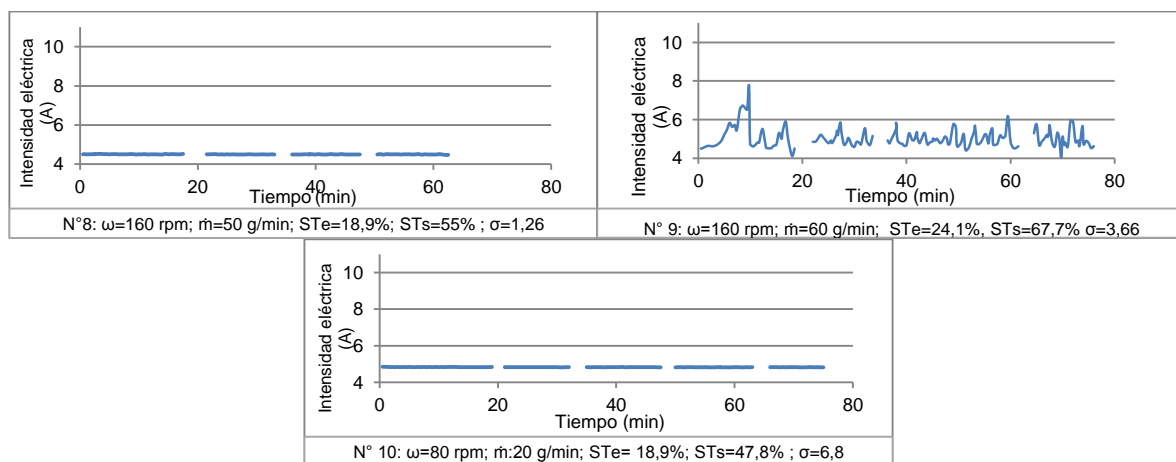
De esta forma, las pruebas N°1, 3, 4, 5 y 7 presentaron acumulación en diferentes grados. La prueba N°4 (80 rpm y 80 g/min) presentó los valores de intensidad más altos (de hasta 10,85 amperios), condiciones que no permiten un adecuado proceso puesto que se presentan grandes acumulaciones, lo cual conlleva a una variación en el porcentaje de sólidos de la biomasa que entra a la sección termoquímica y posibles explosiones en su salida, además es posible que, con una intensidad eléctrica tan alta, los motores se detengan en cualquier momento.

Las pruebas N°2 y N°6, con una alimentación de 40 g/min, presentaron condiciones estables, ambas con una salida continua de biomasa como se observa en su intensidad eléctrica, el transcurso de la prueba se mantuvo con los valores base (prueba N°2 (80 rpm y 40 g/min) con un promedio de 4,81 A y prueba N°6 (160 rpm y 40 g/min) con un promedio de 4,50 A). Por otra parte, las pruebas No 1 (160 rpm y 80 g/min), 3 y 7 (120 rpm y 60 g/min) presentan pequeñas acumulaciones a lo largo de la corrida.

Se observa que las pruebas con mayor estabilidad, pruebas N°2 (80 rpm y 40g/min) y N°6 (160rpm y 40 g/min), presentaron la menor diferencia entre porcentaje de sólidos de entrada y de salida, además, tienen las menores desviaciones entre las pruebas, lo cual favorece a la homogeneidad de la bioma. Por el contrario, las pruebas con altos intervalos de acumulación presentaron una diferencia de sólidos de entrada y salida más, (Pruebas N°4 (80 rpm y 80 g/min) y N°5 (120 rpm y 60g/min)).

Las tres pruebas adicionales se presentan a continuación:

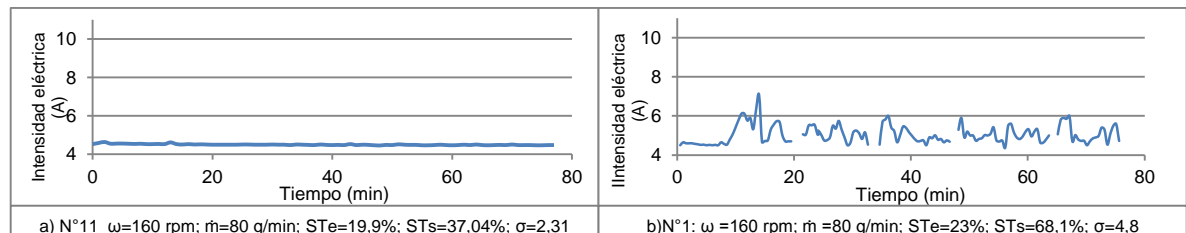
**Figura 4. Pruebas adicionales para establecer flujo de alimentación.**



Con todas las pruebas realizadas, se observa que flujos de masa menores o iguales a 50 g/min permiten que haya continuidad en la sección de alimentación con cualquier revolución de 80 a 160 rpm. Flujos de 60 g/min en adelante necesitan de revoluciones altas debido a la cantidad de biomasa alimentada, puesto que ésta necesita avanzar con la velocidad suficientemente alta para no acumularse. Sin embargo, se pueden apreciar pequeñas acumulaciones que pueden influenciar en la continuidad del equipo que no fue posible ignorar.

Con las modificaciones al tornillo, el cual consistió en un ajuste a las hélices en donde se rectificaron las dos primeras, mejorando el transporte de la biomasa. La figura 4 se presenta la prueba adicional realizada junto a la gráfica de la prueba N°1, la cual se realizó a las mismas condiciones (80 g/min y 160 rpm). Se observa que se logró el efecto deseado, puesto que la intensidad eléctrica se mantuvo constante en el valor base junto con una salida de biomasa con porcentaje de sólidos similar (baja desviación estándar) durante las pruebas, lo cual refleja la continuidad en el flujo.

**Figura 5. a) Prueba de alimentación después de modificaciones, N°11 b) Prueba N°1.**



A partir de las pruebas anteriores, se eligieron tres diferentes flujos promisorios, para continuar con las pruebas en el equipo en su totalidad, 30, 50 y 80 g/min con 80, 120 y 160 rpm respectivamente. De esta forma se puede registrar cómo el equipo trabaja en tres niveles de flujo diferentes: alto, medio y bajo. Para el nivel bajo se eligió 30 g/min en vez de 20 g/min, teniendo en cuenta que en la sección

de molienda se necesita que la biomasa ejerza una fuerza de empuje suficiente para poder avanzar, la cual, se dificulta a 20g/min.

## **2.2 FASE 2: ADECUACIÓN Y PUESTA EN MARCHA DEL EQUIPO DE PRETRATAMIENTO TERMOMECAÍNICO**

Una vez establecidos los parámetros en la alimentación, se procedió a establecer las velocidades de los demás motores del equipo. Se realizaron pruebas en todo el equipo, con entrada de vapor, para observar su desempeño y realizar los arreglos necesarios.

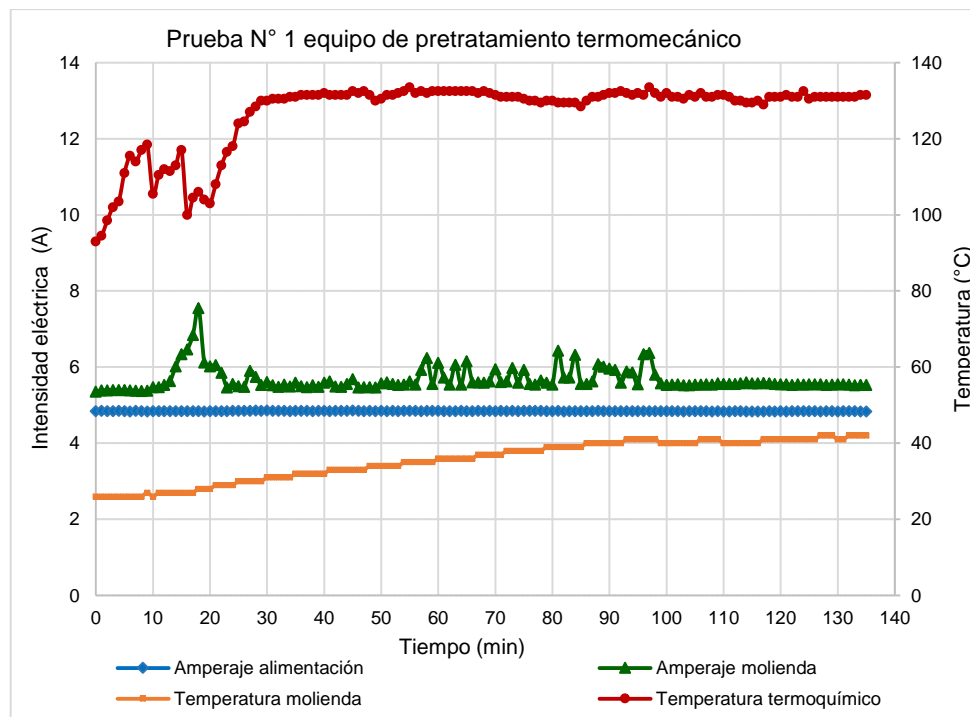
Uno de los problemas encontrados en las pruebas realizadas fueron las fugas de vapor que se presentaron en las bridas y en la cámara de alimentación, en estos sectores se deben colocar unos sellos para evitar su desgaste. Los primeros sellos estaban hechos de grafito, los cuales se deterioraban rápidamente debido a trabajos de limpieza en el cual se desarmaba el equipo. Es por esto que se decidió utilizar sellos de teflón y silicona; estos, una vez instalados, solucionaron los problemas de fugas de vapor, lo cual permitió que el periodo entre el ingreso de vapor al equipo y la presurización de éste disminuyera.

La acumulación se presentó en la campana (Ver Anexo A, ii)-d)). Durante las pruebas, la biomasa se retenía en la campana hasta el punto en que el tornillo sin-fin de la sección termoquímica se detenía, no solo afectando la continuidad sino el proceso mismo. Para solucionarlo se modificó la campana, disminuyendo su volumen por medio de una rampa que fuerza a la biomasa a avanzar (Ver anexo A, iii)-b)- Figura A10). También se disminuyó el grosor de las hélices del tornillo sin fin en la entrada de la sección de molienda, lo cual permite que la biomasa avance más fácilmente. Además de los arreglos, se hicieron pruebas para designar las revoluciones por minuto apropiadas a los motores de la sección termoquímica y molienda, las cuales permitan continuidad en el equipo.

En las pruebas para determinar las revoluciones de los motores, se observó que la velocidad angular del motor de la sección termoquímico tiene una influencia sobre la acumulación de la campana, ésta necesita ser proporcional a la velocidad del siguiente tornillo, para no enviar más biomasa de la que éste pueda tomar. Con esto en cuenta, se encontró que 40 rpm es una frecuencia adecuada.

Por otra parte, como se ha mencionado anteriormente, la velocidad angular del motor de molienda influye sobre el paso de la biomasa por el molino. Es por esto que se realizaron pruebas para encontrar las velocidades adecuadas. Se encontró que es ideal cambiar las revoluciones por minuto de acuerdo al flujo utilizado, así se garantiza una fuerza de empuje idónea para cada cantidad de biomasa. Para los tres flujos elegidos: 30, 50 y 80 g/min; se designaron: 150, 180 y 210 rpm respectivamente.

**Figura 6. Prueba 30 g/min equipo de pretratamiento termomecánico**



En la figura 6 se presenta una prueba realizada después de la adecuación (para ver todas las gráficas de las pruebas a las demás condiciones, remitirse al Anexo D). En ella se contempla la estabilidad de la intensidad eléctrica en alimentación, contraria a la de molienda, la cual presenta algunas variaciones, muestra de los esfuerzos realizados para que la biomasa supere esta sección; en donde el primer pico (entre 13 y 24 minutos) representa la acumulación inicial de la biomasa hasta que la suficiente cantidad pudo pasar por el molino. La temperatura en la sección termoquímica, cuyo valor inicial al empezar la prueba es resultado de un calentamiento preliminar por el vapor en la chaqueta, presenta un aumento cuando se inyecta vapor al interior del cilindro hasta alcanzar un valor estable (Aproximadamente 130°C) en donde el equipo se mantiene presurizado. También se observa que el comportamiento de la temperatura de molienda durante el proceso va en aumento hasta alcanzar los 40 °C, ésta se mantiene controlada en este rango gracias a un sistema de enfriamiento con reflujo de agua a temperatura ambiente.

### 2.3 FASE 3: DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE TIEMPOS DE RESIDENCIA

Para determinar el tiempo de residencia experimentalmente, se realizaron pruebas con el flujo mínimo (30 g/min) y el máximo (80 g/min) del rango óptimo de flujo de alimentación para trabajar en el equipo, encontrado en la fase 1. Las demás condiciones de las dos pruebas se eligieron con base en lo determinado en la fase 2. En ambos casos, se conservó constante la velocidad angular del tornillo termoquímico y de la tolva.

**Cuadro 3. Tiempos de residencia determinados experimentalmente.**

N° prueba	Velocidades de los motores (rpm)				Flujo alimentación (g/min)	Trazador (anilina)	Tiempo residencia (min)
	Tolva	Alimentación	Termoquímico	Molienda			
1	30	80	40	150	30	Verde	14.75
2	30	160	40	180	80	Fucsia	8.92

En el cuadro 3, se observan las condiciones a las que fueron realizadas las pruebas N°1 y N°2 para determinar el tiempo de residencia. Estos tiempos se determinaron experimentalmente por medio de un trazador como se muestra en la figura 6 a) en donde se observa, de izquierda a derecha, la biomasa impregnada que se alimenta normalmente, la biomasa pigmentada con anilina fucsia y la biomasa pigmentada con anilina verde. A sí mismo, en la figura 6 b) se observa su biomasa pretratada respectiva.

**Figura 7. a) Biomasa de alimentación impregnada con y sin trazador. b) Biomasa pretratada con y sin trazador.**



El tiempo de residencia para la prueba N°1 fue de 14 minutos aproximadamente, mientras que para la prueba N°2 estuvo alrededor de los 9 minutos. Esta diferencia se debe a la influencia del caudal en el tiempo de residencia, tal es el caso de la prueba N°2, la cual se trabajó a un flujo más alto de alimentación, lo que provoca que la biomasa realice una fuerza de empuje mayor sobre sí misma y se transporte de manera más rápida; esto se traduce en un tiempo de residencia menor.

### **2.3 FASE 4: CARACTERIZACIÓN BIOMASA PRETRATADA Y FASE 5: BALANCE DEL EQUIPO DE PRETRATAMIENTO TERMOMECAÁNICO**

Los datos obtenidos de la caracterización de la biomasa pretratada se presentan en los cuadros (Cuadro 4a-4b), junto con la desviación estándar, y los de balance de carbono (Cuadro 5). En los cuadros 4c-4d se muestran los datos de la biomasa impregnada, siendo esta la biomasa de entrada al proceso.

Se observa que los cambios más considerables se presentaron en el licor, en donde las concentraciones de los azúcares en su forma monomérica y oligomérica, aumentaron. De las condiciones de flujo trabajadas, el mejor fue el de 80 g/min puesto que los azucares en los licores del efluente principal presentaron la mayor concentración, principalmente xilosa (proveniente de la hemicelulosa que fue hidrolizada en el pretratamiento). Se encuentra una relación directamente proporcional entre biomasa ingresada al equipo y la concentración de monómeros y oligómeros en el licor.

Los datos de los sólidos de pretratamiento e impregnación (Cuadro 4a-4c) representan la composición de la estructura lignocelulósica de la biomasa y se presentan en forma de porcentaje peso. Los azucares aquí representados se muestran en su forma polimérica, puesto que hacen parte de la celulosa y hemicelulosa. Se observa que el porcentaje de lignina y la mayor parte de los azucares de sólidos de pretratamiento cambian levemente cuando se comparan a los de entrada del proceso, siendo el xilano el que presenta un cambio considerable. Este comportamiento refleja la reducción de hemicelulosa y su hidrólisis a xilosa.

El principal efecto del pretratamiento sobre la biomasa es el aumento de su accesibilidad, puesto que se ataca la estructura disminuyendo su encapsulamiento. Este ataque libera monómeros y oligómeros los cuales se solubilizan en el licor, de esta forma se puede asociar un alto grado de concentración de azúcares en el licor al de una mayor reducción en la compactibilidad de la estructura. Dentro del alcance de este proyecto, se plantea al flujo de 80 g/min de biomasa impregnada como el flujo en el cual el pretratamiento es más efectivo.

Se realizó un balance de carbono al pretratamiento, teniendo en cuenta todas las corrientes de salida y de entrada, el cual se presenta en el cuadro 5. Todos los cálculos se realizaron en base carbono, lo cual permite ignorar el ácido sulfúrico y agua que transita por el proceso. El flujo utilizado para el balance fue de 80 g/min, puesto que éste es el más efectivo en el proceso de pretratamiento. Para mayores detalles sobre flujos, cálculos y concentraciones de azúcares en las diferentes corrientes ver Anexo D.

Se observa que la recuperación de carbono en las salidas del proceso (salida de la sección termomecánica, salida de condensados al final de la sección termoquímica y salida de lixiviados al final de la sección de alimentación) es del 96,9%. El porcentaje restante puede atribuirse a sustancias no detectadas por los instrumentos utilizados y a posibles pérdidas en las caracterizaciones.

Se observa que la gran mayoría de la glucosa que entra al proceso sale por los sólidos (98,01% del carbono de entrada en sólidos, donde se solubilizan sólo un 4,9%). Esta glucosa es parte de la celulosa de la biomasa que no se ve afectada por el pretratamiento, sólo queda expuesta para posteriores procesos, en contraste con los demás azúcares que se distribuyen equitativamente entre sólidos y licores (la xilosa se solubilizó un 44,16%, la arabinosa un 41,12% y grupos acetilos 49,49% en los licores). La producción de productos de

degradación fue bajo, representando sólo un 0,34% de la xilosa en la biomasa de entrada. Por otro lado, la lignina se encuentra en los sólidos a la salida en un 89,39% del de entrada, con la cantidad restante posiblemente solubilizada en el pretratamiento a otros compuestos.

**Cuadro 4. Datos de caracterización: a) Sólidos (Biomasa de entrada y salida). b) Licor (Licor de entrada y de salida)**

a)

Prueba	Flujo másico (g/min)	Biomasa	% (g componente/g biomasa estructural)				%Lignina total (g lignina/g biomasa estructural)
			Glucano	Xilano	Arabinano	Grupo acetil	
-	-	Entrada	43,88	21,98	0,98	4,2	26,76
1	30	Salida	45,27±1,70	16,49±0,72	1,91±1,35	2,88±0,43	23,18±0,22
2	50		47,82±1,40	11,75±0,49	1,35±0,90	2,63±0,93	24,43±0,11
3	80		46,50±2,03	12,39±0,58	1,31±0,82	2,61±0,70	25,85±0,44

b)

Prueba	Flujo másico (g/min)	Biomasa	Monómeros				Oligómeros		
			Concentración (g/l)				Concentración (g/l)		
			Glucosa	Xilosa	Arabinosa	Ácido Acético	Glucosa	Xilosa	Arabinosa
-	-	Entrada	0,16	0,23	1,22	1,42	1,68	2,87	1,47
1	30	Salida	0,12±0,06	3,36±0,85	0,39±0,12	0,88±0,22	2,06±0,16	12,93±0,64	0,59±0,03
2	50		0,56±0,26	20,82±6,04	0,77±0,62	2,21±0,51	4,20±0,49	24,27±2,22	0±0,04
3	80		1,71±0,05	28,92±0,00	0,77±0,02	3,12±1,18	10,28±0,71	59,94±5,92	0,75±0,13

\*ARIAS, Deny Paola y PÉREZ, Ingrid Viviana. Universidad Industrial de Santander. Santander, Colombia. Estudio del efecto de la concentración de ácido sulfúrico diluido en las etapas de impregnación y pretratamiento termomecánico del proceso de producción de bioetanol a partir de bagazo de caña de azúcar.

La biomasa de entrada al equipo es previamente impregnada con ácido sulfúrico al 1% p/p y la de salida es la biomasa que fue pretratada en el equipo.

**Cuadro 5. Balance de carbono en el reactor de pretratamiento.**

<b>BALANCE DE CARBONO</b>										
<b>Compuesto</b>	<b>Entrada</b>		<b>Salida</b>							
	<b>% Peso seco</b>	<b>C-mol [g]</b>	<b>En sólidos</b>			<b>En licores</b>			<b>Total C-mole [g]</b>	<b>Recuperación (% C en alimentación)</b>
			<b>% Peso seco</b>	<b>C-mol [g]</b>	<b>% C**</b>	<b>% Peso seco</b>	<b>C-mol [g]</b>	<b>% C**</b>		
<b>Glucosa</b>	47,87	5,61	53,82	5,50	98,01	0,40	0,22	3,88	5,72	101,89
<b>Xilosa</b>	25,37	2,97	14,73	1,51	50,62	2,40	1,31	44,16	2,82	94,78
<b>Arabinosa</b>	2,00	0,23	1,56	0,16	67,77	0,18	0,10	41,12	0,26	108,89
<b>Acido Acetico</b>	5,28	0,62	2,88	0,29	47,63	0,56	0,31	49,49	0,60	97,12
<b>Lignina</b>	25,96	4,05	26,96	3,67	90,53	0,00	0,00	0,00	3,67	90,53
<b>Furfural</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,34	0,01	0,00
<b>HMF</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Total</b>		<b>13,49</b>		<b>11,13</b>	<b>82,48</b>	<b>3,55</b>	<b>1,95</b>	<b>14,42</b>	<b>13,07</b>	<b>96,9</b>

\*\* Porcentaje de carbono respecto a la entrada: C-mol del componente en efluente sobre C-mol del componente a la entrada.

### 3. CONCLUSIONES

- Como resultado de las pruebas realizadas en la sección de alimentación, se encontró un rango adecuado de flujo dentro del cual la intensidad eléctrica del motor de esta sección se mantuvo constante, indicando un flujo continuo y uniforme de la biomasa dentro del equipo.
- Se observó que la continuidad en la sección de alimentación influye directamente en la homogeneidad de la biomasa que avanza a las siguientes secciones, puesto que el porcentaje de sólidos a la salida de la sección de alimentación se mantiene uniforme.
- Se concluye que dentro del rango de flujo de alimentación que permite la continuidad en el equipo, el flujo de 80 g/min es favorable, puesto que permite que el tiempo de residencia sea menor. Adicional a esto, mayores flujos permiten la obtención de concentraciones más altas de azúcares en los licores.
- La hemicelulosa se ve grandemente afectada, observándose una reducción considerable de xilano y aumento de xilosa en los licores. Por el contrario, el pretratamiento termomecánico no influye drásticamente en la solubilización de glucano, muestra de que la celulosa no se ve afectada.

#### 4. RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer una constante revisión de los tornillos sin-fin y de los pistones (ubicados en las preno-estopas), especialmente de la sección de alimentación, puesto que éstos poseen una gran influencia sobre el desarrollo del proceso y su continuidad.
- Se recomienda realizar caracterizaciones a la biomasa después de haber sido expuesta a cada método de pretratamiento en el equipo (Molienda, explosión de vapor y ácido) por separado y así hacer una comparación con el pretratamiento combinado.
- Se recomienda hacer un estudio de distribución de tiempo de residencia en el equipo. Para esto es necesario de un análisis para la elección trazador el cual soporte las condiciones presentadas en el pretratamiento y, junto con un equipo de medición apropiado, su concentración pueda ser fácilmente medida a través del tiempo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SARKAR, Nibedita, *et al.* Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. En: Renewable Energy. 2012, vol. 37. p. 19. ISSN: 0960-1481
- [2] CHEN, Hongzhang and FU, Xiaoguo. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2016, vol.57. p. 468. ISSN: 1364-0321
- [3] BALAT, Mustafa. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. En: Energy Conversion and Management. 2011, vol. 52. p. 858. ISSN: 0196-8904
- [4] AGBOR, Valery, *et al.* Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. En: Biotechnology Advances. 2011, vol. 29. p. 675. ISSN: 0734-9750
- [5] CARDONA, C.A; QUINTERO, J.A and PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. En: Bioresource Technology. 2010, vol. 101. p. 4755-4761. ISSN: 0960-8524
- [6] CHEN, Hongzhang and Fu, Xiaoguo. Op. Cit., p. 469
- [7] SARKAR, Nibedita, *et al.* Op. Cit., p. 21-22
- [8] Ibid., p.21
- [9] Ibid., p.22
- [10] BALAT, Mustafa, *et al.* Op. Cit., p. 865

- [11] HENDRIKS, A.T.W.M and ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. En: Bioresource Technology. 2009, vol. 100. p. 13. ISSN: 0960-8524
- [12] CARDONA, C.A; QUINTERO, J.A and PAZ, I.C, *et al.* Op. Cit., p. 4756
- [13] BALAT, Mustafa; BALAT, Havva and ÖZ, Cahide. Progress in bioethanol processing. En: Science Direct. 2008, vol. 34. p. 558-559. ISSN: 0360-1285
- [14] NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Summative mass closure. NREL/TP-510-48087. Golden, Colorado, 2011. 1 p.
- [15] NACHENIUS, R.W, *et al.* Residence time distributions of coarse biomass particles in a screw conveyor reactor. En: Fuel Processing Technology. 2015, vol. 130. p. 87. ISSN: 0378-3820
- [16] SIEVERS, David, *et al.* Online residence time distribution measurement of thermochemical biomass pretreatment reactors. En: Chemical Engineering Science. 2016, vol. 140. p. 330. ISSN: 0009-2509
- [17] FOGLER, Scott. Distributions of residence times for chemical reactors. En: elements of chemical reaction engineering. 4 ed. United States: Pearson Education, 2006. p. 868
- [18] NACHENIUS, R.W, *et al.* Op. Cit., p.87
- [19] XI, Yingtao; CHEN, Qun and YOU, Changfu. Flow characteristics of biomass particles in a horizontal stirred bed reactor: Part I. Experimental measurements of residence time distribution. En: Powder Technology, 2015, vol. 269, p. 579. ISSN: 0032-5910

- [20] GOVIND, Vishwas. Stirred tank reactors for cell culture technology. En: Design of multiphase reactors. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015. p. 233
- [21] HATZIS, Christos; RILEY, Cynthia y PHILIPPIDIS, George. Detailed material balance and ethanol yield calculations. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. 1996, vol. 57/58. p. 449. ISSN:0273-2289
- [22] CÁRDENAS, Marco Jeffrey y MORANTES, Cristian Leonardo, Universidad Industrial de Santander. Santander, Colombia. Elaboración de una metodología para el desarrollo de los procesos de tamizado, impregnación (ácido sulfúrico diluido) y pretratamiento con el reactor piloto termomecánico para la producción de etanol a partir de biomasa, 2016.
- [23] MOLINA BUENDIA, P, *et al.* Propiedades de la anilina. En: Practicas de química orgánica. 547 ed. Murcia, 1989. p. 39.
- [24] DOERNER, Max. Pigmentos de efecto. En: Los materiales de pintura y su empleo en el arte. 6 ed. Barcelona: Reverté, S.A, 1998. p. 82.
- [25] NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Op.cit., p.1-10
- [26] NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. NREL/TP-510-42623. Golden, Colorado, 2008. 1-11 p.
- [27] NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of insoluble solids in pretreated biomass material. NREL/TP-510-42627. Golden, Colorado, 2008. 1-6 p.
- [28] NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. NREL/TP-510-42618. Golden, Colorado, 2012. 1-15 p.

[29] NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Op.cit., p.1-10

[30] NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Op.cit,p.1-15

[31] ARIAS, Deny Paola y PÉREZ, Ingrid Viviana. Universidad Industrial de Santander. Santander, Colombia. Estudio del efecto de la concentración de ácido sulfúrico diluido en las etapas de impregnación y pretratamiento termomecánico del proceso de producción de bioetanol a partir de bagazo de caña de azúcar 2017.

## BIBLIOGRAFÍA

AGBOR, Valery, *et al.* Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. En: *Biotechnology Advances*. 2011, vol. 29. p. 675-685. ISSN: 0734-9750.

ARIAS, Deny Paola y PÉREZ, Ingrid Viviana. Universidad Industrial de Santander. Santander, Colombia. Estudio del efecto de la concentración de ácido sulfúrico diluido en las etapas de impregnación y pretratamiento termomecánico del proceso de producción de bioetanol a partir de bagazo de caña de azúcar 2017.

BALAT, Mustafa. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. En: *Energy Conversion and Management*. 2011, vol. 52. p. 858-875. ISSN: 0196-8904.

BALAT, Mustafa; BALAT, Havva and ÖZ, Cahide. Progress in bioethanol processing. En: *Science Direct*. 2008, vol. 34. p. 551-573. ISSN: 0360-1285

CÁRDENAS, Marco Jeffrey y MORANTES, Cristian Leonardo, Universidad Industrial de Santander. Santander, Colombia. Elaboración de una metodología para el desarrollo de los procesos de tamizado, impregnación (ácido sulfúrico diluido) y pretratamiento con el reactor piloto termomecánico para la producción de etanol a partir de biomasa, 2016.

CARDONA, C.A; QUINTERO, J.A and PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. En: *Bioresource Technology*. 2010, vol. 101. p. 4754–4766. ISSN: 0960-8524.

CHEN, Hongzhang and Fu, Xiaoguo. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2016, vol.57. p. 468-478. ISSN: 1364-0321.

DOERNER, Max. Pigmentos de efecto. En: Los materiales de pintura y su empleo en el arte. 6 ed. Barcelona: Reverté, S.A, 1998. p. 82.

FOGLER, Scott. Distributions of residence times for chemical reactors. En: elements of chemical reaction engineering. 4 ed. United States: Pearson Education, 2006. p. 1-1088.

GOVIND, Vishwas. Stirred tank reactors for cell culture technology. En: Design of multiphase reactors. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015. p. 1-512.

HATZIS, Christos; RILEY, Cynthia y PHILIPPIDIS, George. Detailed material balance and ethanol yield calculations. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. 1996, vol. 57/58. p. 443-459. ISSN:0273-2289

HENDRIKS, A.T.W.M and ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. En: Bioresource Technology. 2009, vol. 100. p. 10-18. ISSN: 0960-8524

MOLINA BUENDIA, P, *et al.* Propiedades de la anilina. En: Practicas de química orgánica. 547 ed. Murcia, 1989. p. 1-59.

NACHENIUS, R.W, *et al.* Residence time distributions of coarse biomass particles in a screw conveyor reactor. En: Fuel Processing Technology. 2015, vol. 130. p. 87. ISSN: 0378-3820

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Summative mass closure. NREL/TP-510-48087. Golden, Colorado, 2011. 1-10 p.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. NREL/TP-510-42623. Golden, Colorado, 2008. 1-11 p.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of insoluble solids in pretreated biomass material. NREL/TP-510-42627. Golden, Colorado, 2008. 1-6 p.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. NREL/TP-510-42618. Golden, Colorado, 2012. 1-15 p.

SARKAR, Nibedita, *et al.* Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. En: Renewable Energy. 2012, vol. 37. p. 19-27. ISSN: 0960-1481.

SIEVERS, David, *et al.* Online residence time distribution measurement of thermochemical biomass pretreatment reactors. En: Chemical Engineering Science. 2016, vol. 140. p. 330-336. ISSN: 0009-2509

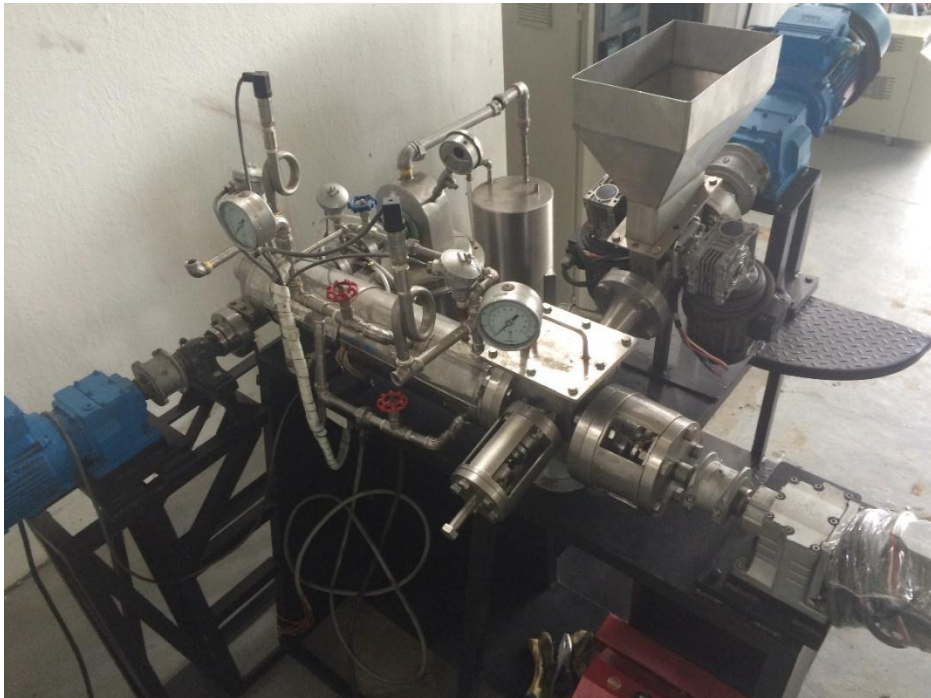
XI, Yingtao; CHEN, Qun y YOU, Changfu. Flow characteristics of biomass particles in a horizontal stirred bed reactor: Part I. Experimental measurements of residence time distribution. En: Powder Technology, 2015, vol. 269. p. 577-584. ISSN: 0032-5910

## ANEXOS

### **Anexo A.** Descripción del equipo de pretratamiento termomecánico

El equipo de pretratamiento termomecánico desarrollado bajo el marco de tesis doctoral de la Ingeniera Neila Mantilla, está compuesto por tres secciones principales: Sección de alimentación, sección termoquímica, sección de molienda y sección de descarga.

**Figura A1.** Equipo de pretratamiento termomecánico.



i). Sección de alimentación:

a) Tolva: en la cual ingresa el bagazo de caña impregnado con ácido sulfúrico diluido en el proceso. La tolva tiene en su interior dos rodillos dentados que distribuyen la biomasa hacia un tornillo sin fin.

**Figura A2. Tolva.**



b). Tornillo sin fin: el cual recibe la biomasa de la tolva y la transporta a la sección siguiente.

**Figura A3 Tornillo sin-fin de alimentación.**



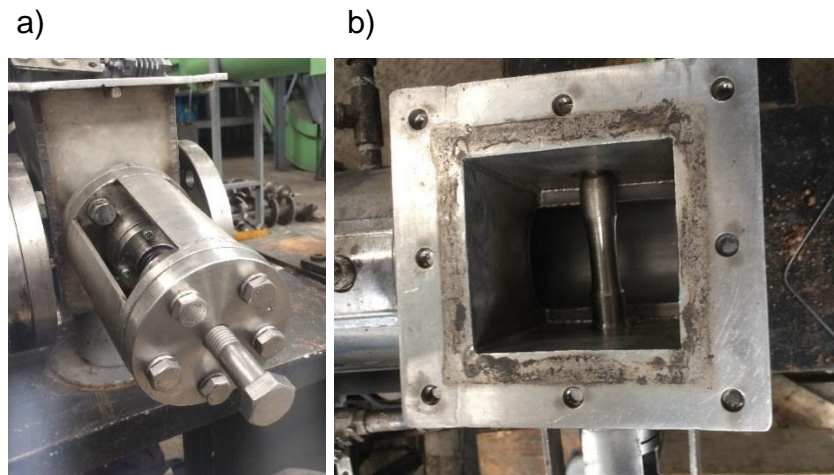
c). Cono al final del tornillo sin fin: permitiendo reducción de diámetro donde se comprime la biomasa, formándose un tapón a la salida de la sección de alimentación y entrada de la sección termoquímica. Cuando se aplique vapor, el tapón garantiza que el equipo se mantenga presurizado y se lleve a cabo el pretratamiento termoquímico.

**Figura A4. Cono cobertura**



d). Pistón y preno-estopa: el cual aplica una fuerza sobre la biomasa a la salida de la sección de alimentación, contribuyendo a la formación del tapón. La biomasa que se va reuniendo al final del cono tiene que superar la fuerza que ejerce el pistón para poder acceder a la sección termoquímica, evitando el paso de vapor hacía la alimentación

**Figura A5 a) Pistón preno-estopa. b) Pistón- interior termoquímico.**



ii). Sección termoquímica:

a). Cilindro, como carcasa externa: El cilindro tiene material aislante que permita conservar la temperatura en la sección, parte importante del pretratamiento.

**Figura A6 Carcasa externa sección termoquímica.**



b). Tornillo sin fin: el cual transporta la biomasa desde la salida de la sección de alimentación hasta la sección de molienda.

**Figura A7. Carcasa externa sección termoquímica.**



c). Entradas de vapor: En esta sección del equipo se presenta el pretratamiento con vapor. Para esto, se dispone de tres entradas de vapor ubicadas en diferentes partes del cilindro externo. Como se observa en la figura A6, la válvula azul permite paso de vapor a la chaqueta y la válvula roja dentro de la sección termoquímica.

d). Campana: Ubicada al final de la sección termoquímica, ésta permite el paso hacia la sección de molienda. En la campana el tornillo sinfín es más delgado, permitiendo que la biomasa caiga de una sección a otra.

**Figura A8. Campana.**



iii). Sección de molienda:

a). Tornillo sin fin-cilindro dentado: En esta sección, el tornillo está dividido en tres partes consecutivas: tornillos en espiral, tornillo dentado y nuevamente tornillo en espiral cónico, como se observa en la figura A9. La primera sección del tornillo sin fin transporta la biomasa desde que ésta cae desde la sección anterior hasta el cilindro dentado. En el cilindro dentado (parte izquierda) se produce la molienda de la biomasa. En la última sección de tornillo sin fin, la biomasa es transportada hasta la salida de la sección.

**Figura A9. Tornillo sección Molienda.**



b). Cobertura. Un tubo cilíndrico liso en la primera parte del tornillo sin fin. Un tubo corto con ranuras que cubre la parte dentada del tornillo, complementando la molienda que recibe la biomasa (puesto que el espacio de la biomasa en esta sección es limitado, la biomasa se muele en el cilindro dentado y avanza por las delgadas ranuras de la cobertura en esta sección), alrededor de esta sección, circula agua (manguera roja) la cual disipa el calor en exceso generado en esta sección mecánica, debido a la fricción.

Al inicio del tubo cilíndrico se encuentra una salida para evacuar condensados de forma que el vapor que se condense dentro del reactor no obstaculice el aumento de temperatura. En la parte media del tubo cilíndrico se encuentra una rampa que va dentro de la campana, con el objetivo que ayude al paso de esta de la sección termoquímica hacia la sección mecánica.

**Figura A10. a) Tubo cilíndrico. b) Tubo corto con ranuras.**

a)



b)



Finalizando con un cono en la sección final del tornillo, en la cual la biomasa se acumula y forma un tapón de manera similar al de la sección de alimentación. Este tapón junto con el formado al final de la alimentación permite que se creen una presurización en el equipo realizando la descarga de biomasa en forma de explosiones. Para el control de estas explosiones otra preno-estopa es ubicada en la sección de molienda.

**Figura A11 a) Cono final sección molienda b) Prensoestopa final sección molienda**

a)



b)



## Anexo B. Protocolo caracterización.

PROTOCOLO DE CARACTERIZACIÓN  
Laboratorio de Transformación de Biomasa  
Escuela de Ingeniería Química  
Universidad Industrial de Santander

### 1. PREPARACIÓN DE BIOMASA PARA LA CARACTERIZACIÓN

#### Materiales:

- Biomasa pretratada
- Tubos falcón
- Centrífuga
- Tiras de pH.
- Horno
- Balanza digital
- Crisoles

1.1 Homogeneizar la biomasa pretratada.

1.2 Pesar 4 tubos falcon por cada muestra de biomasa. Pesar 6 g de biomasa pretratada y homogeneizada en cada tubo falcon.

1.3 Agregar 30 mL de agua a cada uno. Centrifugar por 10 min a 5000 rpm, agitar las muestras y centrifugar nuevamente. Tomar muestra del licor para análisis de monómeros y oligómeros.

1.4 Agregar 30 mL de agua nuevamente y centrifugar por 5 min a 5000 rpm. Repetir este procedimiento las veces que sea necesario hasta que el pH esté en 5.

1.4 Situar los tubos falcón en el horno a 105°C por un día.

1.5 Pesar los tubos falcón con biomasa seca para calcular porcentaje de sólidos insolubles en el slurry.

$$\%sólidos\ insolubles = \frac{Peso\ biomasa\ seca}{Peso\ biomasa\ húmeda}$$

1.6 Calcular la dilución para monómeros y oligómeros para calcular las concentraciones reales de los azúcares.

$$D = (P_l + P_a) / P_l$$

Donde:

$D$  es la dilución para monómeros y oligómeros

$P_l$  es el peso del licor contenido en la biomasa y se calcula de la siguiente manera:

$$P_l = \text{Peso biomasa húmeda} - \text{Peso biomasa húmeda} \left( \frac{\% \text{solidos insolubles}}{100} \right)$$

$P_a$  es el peso de agua adicionada

1.7 Homogeneizar nuevamente la biomasa y pesar 0,7 g de cada muestra en diferentes botellas de vidrio.

1.8 Tomar muestras de biomasa en crisoles y dejarlos en el horno por 24 horas para calcular porcentaje de sólidos totales.

$$\% \text{ Sólidos totales} = \frac{\text{Peso biomasa seca}}{\text{Peso biomasa húmeda}} \times 100$$

1.9 Pasar los crisoles a la mufla para calcular porcentaje de cenizas estructurales.

$$\% \text{ Cenizas estructurales} = \frac{\text{Peso cenizas}}{\text{Peso biomasa seca}} \times 100$$

Seguir el paso 1.9.1 si utiliza una mufla de rampa programable, de lo contrario, seguir el paso 1.9.2.

1.9.1

Programa de rampa de temperatura del horno.

Rampa de temperatura ambiente a 105°C

Mantener a 105°C durante 12 minutos

Rampa hasta 250°C de 10°C/minuto

Mantener a 250°C por 30 minutos

Rampa hasta 575°C de 20°C/minuto

Mantener a 575°C durante 180 minutos

Bajar la temperatura hasta 105°C y mantener en esta temperatura hasta que las muestras sean retiradas.

1.9.2 Colocar los crisoles en el horno a  $575 \pm 25^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 6$  horas.

## 2. PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES DE RECUPERACIÓN DE AZÚCARES (ERA) Y ESTÁNDARES DE VERIFICACIÓN DE AZÚCARES (EVA).

Materiales:

- Balones aforados de 25 mL
- Agua destilada
- Pinza
- Azúcares estándares (Arabinosa, Glucosa y Xilosa)
- Ácido acético
- Balanza electrónica
- Frasco lavador
- Pipeta
- Ultrasonido
- Tubos Falcon

2.1 Calcular las cantidades de arabinosa, glucosa, xilosa y ácido acético para preparar los estándares (ERA) de la siguiente manera:

$$\text{Azúcar requerido} = C_s [\text{g/L}] * (V_b) \quad E_c (1)$$

Dónde:

$C_s$  es la concentración sugerida para los estándares.

$V_b$  es el volumen del balón aforado.

**Cuadro B1. Rango de concentraciones sugerido para los estándares.**

Component	Suggested concentration range (mg/ml)
D-cellobiose	0.1–4.0
D(+)glucose	0.1–4.0
D(+)xylose	0.1–4.0
D(+)galactose	0.1–4.0
L(+)arabinose	0.1–4.0
D(+)mannose	0.1–4.0
CVS	Middle of linear range, concentration not equal to a calibration point (2.5 suggested)

Fuente NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass

En el cuadro B1 se sugiere la concentración para los diferentes azúcares.

2.2 Pesar las cantidades necesarias de azúcares en un balón aforado de 25 mL con la balanza electrónica y registrar.

2.3 Agregar agua destilada de tal forma que se limpie el cuello y las paredes de balón, homogeneizar y aforar.

2.4 Homogeneizar la solución en el ultrasonido por 15 minutos.

2.5 Tomar una alícuota de 5 mL en un vial para azúcares de verificación.

2.6 Tomar una alícuota de los estándares de recuperación (20 mL) para hidrólisis ácida.

### 3. HIDRÓLISIS ÁCIDA

#### Materiales:

- 1 pipeta
- Puntas de pipeta
- Vasos de precipitado
- Ácido sulfúrico al 72% peso/peso
- Plancha de agitación magnética
- Agitadores magnéticos
- Botellas de vidrio con tapa
- Tubos Falcon
- pH-metro digital
- Solución para guardar electrodo
- Solución para limpiar electrodo.

#### 3.1 Hidrólisis ácida para la biomasa pretratada:

3.1.1 Agregar 7 mL de ácido sulfúrico al 72% a cada botella con su respectiva biomasa.

3.1.2 Introducir cada botella a la que se le ha agregado ácido en el baño maría a 30°C por una hora con agitación cada cinco minutos.

3.1.3 Agregar 196 mL de agua a cada botella.

#### 3.2 Hidrólisis ácida para oligómeros:

3.2.1 Tomar una alícuota de 20 mL para oligómeros del licor del inciso 1.3.

3.2.2 Filtrar el licor.

3.2.3 Tomar y registrar el pH para los licores filtrados.

3.2.4 Para la etapa de hidrólisis ácida es necesario que el licor tenga una concentración del 4% peso/peso, para ello se agrega una cantidad específica de

ácido sulfúrico al 72% dependiendo del volumen de la alícuota de licor filtrado. Por lo general el volumen de la alícuota es 20 ml, los cuales se toman en un tubo Falcon.

En el caso en que se midan 20 ml exactos de licor y con un pH previamente determinado en el paso 3.2.3.3, se acude a la Tabla 1 y se procede a determinar la cantidad de ácido a adicionar de la siguiente manera:

Por ejemplo, a un pH de 1.10 y 20 ml de licor filtrado, se deben adicionar 631  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico al 72% peso/peso.

**Cuadro B2. Volumen de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72% (en  $\mu\text{L}$ ) requerido para llevar la concentración de ácido en el licor al 4% peso/peso.**

Appendix 1

Volume of 72% H2SO4 (in $\mu\text{L}$ ) required to bring liquor acid concentration to 4%																																							
pH	Vol. of liquor (mL)			Vol. of liquor (mL)			Vol. of liquor (mL)			Vol. of liquor (mL)			Vol. of liquor (mL)			Vol. of liquor (mL)			Vol. of liquor (mL)			Vol. of liquor (mL)																	
	5.00	10.00	20.00	5.00	10.00	20.00	5.00	10.00	20.00	5.00	10.00	20.00	5.00	10.00	20.00	5.00	10.00	20.00	5.00	10.00	20.00	5.00	10.00	20.00															
0.01	*	*	*	0.51	110	220	435	1.01	154	308	616	1.51	168	336	671	2.01	172	344	689	2.51	174	347	695	3.01	174	348	696	3.51	174	348	697	4.01	174	348	697	4.51	174	348	697
0.02	*	*	*	0.52	111	223	445	1.02	154	309	617	1.52	168	336	672	2.02	172	345	689	2.52	174	347	695	3.02	174	348	696	3.52	174	348	697	4.02	174	348	697	4.52	174	348	697
0.03	*	*	*	0.53	113	226	451	1.03	155	310	619	1.53	168	336	672	2.03	172	345	689	2.53	174	347	695	3.03	174	348	696	3.53	174	348	697	4.03	174	348	697	4.53	174	348	697
0.04	*	*	*	0.54	114	228	457	1.04	155	311	621	1.54	168	337	673	2.04	172	345	689	2.54	174	347	695	3.04	174	348	696	3.54	174	348	697	4.04	174	348	697	4.54	174	348	697
0.05	*	*	*	0.55	116	231	462	1.05	156	311	623	1.55	168	337	674	2.05	172	345	690	2.55	174	347	695	3.05	174	348	696	3.55	174	348	697	4.05	174	348	697	4.55	174	348	697
0.06	*	*	*	0.56	117	234	467	1.06	156	312	624	1.56	169	337	674	2.06	172	345	690	2.56	174	347	695	3.06	174	348	696	3.56	174	348	697	4.06	174	348	697	4.56	174	348	697
0.07	*	*	*	0.57	118	236	473	1.07	157	313	626	1.57	169	337	675	2.07	173	345	690	2.57	174	347	695	3.07	174	348	696	3.57	174	348	697	4.07	174	348	697	4.57	174	348	697
0.08	1	2	4	0.58	119	239	478	1.08	157	314	628	1.58	169	338	675	2.08	173	345	690	2.58	174	347	695	3.08	174	348	696	3.58	174	348	697	4.08	174	348	697	4.58	174	348	697
0.09	5	10	19	0.59	121	241	483	1.09	157	315	629	1.59	169	338	676	2.09	173	345	690	2.59	174	347	695	3.09	174	348	696	3.59	174	348	697	4.09	174	348	697	4.59	174	348	697
0.10	9	17	35	0.60	122	244	488	1.10	158	315	631	1.60	169	338	676	2.10	173	345	690	2.60	174	348	695	3.10	174	348	696	3.60	174	348	697	4.10	174	348	697	4.60	174	348	697
0.11	12	25	50	0.61	123	246	492	1.11	158	316	632	1.61	169	338	677	2.11	173	345	691	2.61	174	348	695	3.11	174	348	696	3.61	174	348	697	4.11	174	348	697	4.61	174	348	697
0.12	16	32	65	0.62	124	249	497	1.12	159	317	634	1.62	169	339	677	2.12	173	345	691	2.62	174	348	695	3.12	174	348	696	3.62	174	348	697	4.12	174	348	697	4.62	174	348	697
0.13	20	39	79	0.63	125	251	502	1.13	159	318	635	1.63	169	339	678	2.13	173	345	691	2.63	174	348	695	3.13	174	348	696	3.63	174	348	697	4.13	174	348	697	4.63	174	348	697
0.14	23	47	93	0.64	127	253	506	1.14	159	318	637	1.64	169	339	678	2.14	173	346	691	2.64	174	348	695	3.14	174	348	696	3.64	174	348	697	4.14	174	348	697	4.64	174	348	697
0.15	27	53	107	0.65	128	255	510	1.15	160	319	638	1.65	170	339	678	2.15	173	346	691	2.65	174	348	695	3.15	174	348	697	3.65	174	348	697	4.15	174	348	697	4.65	174	348	697
0.16	30	60	120	0.66	129	257	515	1.16	160	320	639	1.66	170	339	679	2.16	173	346	691	2.66	174	348	695	3.16	174	348	697	3.66	174	348	697	4.16	174	348	697	4.66	174	348	697
0.17	33	67	133	0.67	130	259	519	1.17	160	320	641	1.67	170	340	679	2.17	173	346	691	2.67	174	348	695	3.17	174	348	697	3.67	174	348	697	4.17	174	348	697	4.67	174	348	697
0.18	37	73	146	0.68	131	261	523	1.18	161	321	642	1.68	170	340	680	2.18	173	346	692	2.68	174	348	695	3.18	174	348	697	3.68	174	348	697	4.18	174	348	697	4.68	174	348	697
0.19	40	79	159	0.69	132	263	527	1.19	161	322	644	1.69	170	340	680	2.19	173	346	692	2.69	174	348	695	3.19	174	348	697	3.69	174	348	697	4.19	174	348	697	4.69	174	348	697
0.20	43	86	171	0.70	133	265	531	1.20	161	322	644	1.70	170	340	680	2.20	173	346	692	2.70	174	348	695	3.20	174	348	697	3.70	174	348	697	4.20	174	348	697	4.70	174	348	697
0.21	46	91	183	0.71	134	267	535	1.21	161	323	646	1.71	170	340	681	2.21	173	346	692	2.71	174	348	695	3.21	174	348	697	3.71	174	348	697	4.21	174	348	697	4.71	174	348	697
0.22	49	97	195	0.72	135	269	538	1.22	162	323	647	1.72	170	341	681	2.22	173	346	692	2.72	174	348	695	3.22	174	348	697	3.72	174	348	697	4.22	174	348	697	4.72	174	348	697
0.23	52	103	206	0.73	136	271	542	1.23	162	324	648	1.73	170	341	682	2.23	173	346	692	2.73	174	348	695	3.23	174	348	697	3.73	174	348	697	4.23	174	348	697	4.73	174	348	697
0.24	54	109	217	0.74	136	273	545	1.24	162	325	649	1.74	170	341	682	2.24	173	346	692	2.74	174	348	695	3.24	174	348	697	3.74	174	348	697	4.24	174	348	697	4.74	174	348	697
0.25	57	114	228	0.75	137	274	549	1.25	163	325	650	1.75	171	341	682	2.25	173	346	692	2.75	174	348	695	3.25	174	348	697	3.75	174	348	697	4.25	174	348	697	4.75	174	348	697
0.26	60	119	239	0.76	138	276	552	1.26	163	326	651	1.76	171	341	683	2.26	173	346	693	2.76	174	348	695	3.26	174	348	697	3.76	174	348	697	4.26	174	348	697	4.76	174	348	697
0.27	62	125	249	0.77	139	278	556	1.27	163	326	652	1.77	171	341	683	2.27	173	346	693	2.77	174	348	695	3.27	174	348	697	3.77	174	348	697	4.27	174	348	697	4.77	174	348	697
0.28	65	130	260	0.78	140	279	559	1.28	163	327	653	1.78	171	342	683	2.28	173	346	693	2.78	174	348	695	3.28	174	348	697	3.78	174	348	697	4.28	174	348	697	4.78	174	348	697
0.29	67	136	269	0.79	140	281	562	1.29	164	327	654	1.79	171	342	684	2.29	173	346	693	2.79	174	348	695	3.29	174	348	697	3.79	174	348	697	4.29	174	348	697	4.79	174	348	697
0.30	70	140	278	0.80	141	282	566	1.30	164	328	655	1.80	171	342	684	2.30	173	346	693	2.80	174	348	695	3.30	174	348	697	3.80	174	348	697	4.30	174	348	697	4.80	174	348	697
0.31	72	144	289	0.81	142	284	568	1.31	164	328	656	1.81	171	342	684	2.31	173	347	693	2.81	174	348	695	3.31	174	348	697	3.81	174	348	697	4.31	174	348	697	4.81	174	348	697
0.32	75	149	298	0.82	143	285	571	1.32	164	329	657	1.82	171	342	684	2.32	173	347	693	2.82	174	348	695	3.32	174	348	697	3.82	174	348	697	4.32	174	348	697	4.82	174	348	697
0.33	77	154	307	0.83	143	287	574	1.33	165	329	658	1.83	171	342	685	2.33	173	347	693	2.83	174	348	695	3.33	174	348	697	3.83	174	348	697	4.33	174	348	697	4.83	174	348	697
0.34	79	158	316	0.84	144	288	577	1.34	165	329	659	1.84	171	343	685	2.34	173	347	693	2.84	174	348	695	3.34	174	348	697	3.84	174	348	697	4.34	174	348	697	4.84	174	348	697
0.35	81	162	325	0.85	145	290	579	1.35	165	330	660	1.85	171	343	685	2.35	173	347	693	2.85	174	348	695	3.35															

En el caso en que el volumen de la alícuota no sea 20 mL exactos, se debe calcular la cantidad de ácido a agregar de la siguiente manera:

3.2.4.1 Calcular la concentración molar de iones de hidrógeno [H+] en la alícuota de licor filtrado.

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+] \quad (1)$$

$$[\text{H}^+] = \text{antilog} (-\text{pH}). \quad (2)$$

Una vez obtenida la concentración de iones de hidrógeno es posible calcular el volumen de ácido sulfúrico a adicionar:

$$V_{72\%} = \frac{[(C_{4\%} \times V_s) - (V_s \times [\text{H}^+] \times \frac{98.08 \text{ g H}_2\text{SO}_4}{2 \text{ moles H}^+})]}{C_{72\%}} \quad (3)$$

Dónde:

$V_{72\%}$  es el volumen de ácido a agregar al 72%, en mL

$V_s$  es el volumen de la alícuota, en mL

$C_{4\%}$  es la concentración de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 4%, 41.0 g/L

$C_{72\%}$  es la concentración de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 72%, 1176.3 g/L

$[\text{H}^+]$  es la concentración de iones de hidrógeno, en moles/L

Para ilustrar un ejemplo, se tomará un volumen de 18 mL de alícuota y un pH de 1.10:

Primero se calcula la concentración de iones hidronio con la Ec (2):

$$[\text{H}^+] = \text{antilog} (-1.10)$$

$$[\text{H}^+] = 0.079 \text{ moles/L}$$

De esta manera, se procede a calcular el volumen de ácido a agregar con ayuda de la Ec. (3):

$$V_{72\%} = \frac{[(\frac{41.0 \text{ g}}{\text{L}}) \times (18 \text{ mL}) - (18 \text{ mL}) \times (\frac{0.079 \text{ moles}}{\text{L}}) \times (\frac{98.08 \text{ g H}_2\text{SO}_4}{2 \text{ moles H}^+})]}{1176.3 \text{ g/L}}$$

$$V_{72\%} = 0.568 \text{ mL} = 568 \mu\text{L}$$

3.2.5 Trasvasar las alícuotas a las botellas de vidrio.

3.2.6 Introducir un agitador magnético en cada botella.

3.2.7 Situar las botellas en la plancha de agitación magnética y dejar homogeneizar por 30 segundos.

3.2.8 Medir la cantidad calculada de ácido sulfúrico al 72% peso/peso con la ayuda de una pipeta y agregar lentamente a las botellas mientras se están agitando.

3.3. Calcular la dilución del licor con el ácido sulfúrico para determinar las concentraciones reales de los azúcares.

$$D = \frac{P_l + V_a}{P_l}$$

Donde:

$D$  es la dilución del licor

$P_l$  es el peso del licor para oligómeros y se calcula de la siguiente manera:

$$P_l = \text{volumen del licor} * \text{densidad del licor}$$

$V_a$  es el volumen de ácido sulfúrico al 72% adicionado

3.2 Hidrólisis ácida para los estándares de recuperación de azúcares de (ERA).

3.2.1 A cada estándar de recuperación, agregar 696  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico.

3.3 Sellar con vinipel todas las botellas. Tener en cuenta que, al momento de envolver y ajustar la tapa de las botellas, los papeles no se deben romper.

3.4 Marcar cada botella en la parte superior y poner cinta para evitar que se borre el nombre cuando estén en la autoclave.

3.5 Marcar el nivel de la solución contenida en cada botella con Sharpie.

3.6 Revisar que el agua contenido en la autoclave esté a un nivel superior a la rejilla.

3.7 Encender la autoclave media hora antes de introducir las botellas en su interior.

3.8 Introducir las botellas previamente selladas.

3.9 Tapar la autoclave teniendo en cuenta que se deben ajustar los sellos en pares, es decir, uno el opuesto del otro.

3.10 Una vez tapada la autoclave, se espera que la presión llegue a 15 psi y se mantenga constante en este valor monitoreando el flujo de calor por medio de la perilla de la autoclave por una hora y se apaga el equipo.

3.11 Por seguridad, es necesario que al momento de abrir la autoclave la presión marcada por el manómetro sea de 0 psi.

3.12 Cuando la presión se encuentra en 0 psi se abre la válvula de alivio y se destapa la autoclave usando los guantes térmicos y se retiran cada una de las muestras para colocarlas sobre cartones y evitar la ruptura de las botellas debido al cambio brusco de temperatura.

#### 4. SEPARACIÓN LÍQUIDO/SÓLIDO (FILTRACIÓN)

Materiales:

- Dos mangueras
- Papeles filtro
- Una bomba de vacío
- Un condensador
- Un soporte universal con pinzas
- Un Erlenmeyer de salida lateral
- Embudo de porcelana
- Agua destilada
- Frasco lavador

4.1 Realizar el montaje de la figura 2: Conectar la trampa de la bomba de vacío con la salida inferior del condensador y conectar la salida superior del condensador con la salida lateral del Erlenmeyer. Seguido de esto se acondiciona el embudo de porcelana en la parte superior de Erlenmeyer, garantizando que haya un sello entre los dos instrumentos para formar vacío.

**Figura B. Montaje para filtración.**



4.2 Humectar el papel filtro con agua destilada para acomodarlo en el embudo de porcelana, para este procedimiento, se debe tener especial cuidado asegurando que el papel quede adherido al embudo evitando que los sólidos pasen por las paredes.

4.3 Homogenizar cuidadosamente por medio de agitación la solución a filtrar y agregar poco a poco (una cantidad suficiente de licor que permita purgar el Erlenmeyer) al embudo para que el nivel de solución no sobrepase el papel filtro. Purgar y desechar la solución utilizada.

4.4 Filtrar la solución deseada.

4.5 Adicionar la solución filtrada a un recipiente previamente purgado

4.6 Si la solución filtrada se utiliza al día siguiente, ésta debe ser refrigerada. Si se utiliza en un lapso superior, debe ser congelada.

Nota: Las muestras no deben almacenarse más de 15 días, dado que pierden la confiabilidad de las variables medibles.

4.7 Lavar varias veces el residuo sólido y poner las muestras en el horno a 105°C por 12 horas.

4.8 Pesar el residuo sólido seco para calcular porcentaje de biomasa residual.

$$\%Biomasa\ residual = \frac{(Peso\ biomasa\ residual + peso\ crisol + peso\ filtro) - peso\ crisol - peso\ filtro}{Peso\ biomasa\ seca} \times 100$$

4.9 Pasar las muestras a mufla y calcular el porcentaje de cenizas insolubles en ácido y la lignina insoluble en ácido.

$$\% \text{Cenizas insolubles en ácido} = \frac{(\text{Peso cenizas} + \text{peso filtro} + \text{peso crisol}) - \text{Peso filtro} - \text{peso crisol}}{\text{Peso biomasa seca}} \times 100$$

$$\% \text{Lignina insoluble en ácido} = \% \text{ biomasa residual} - \% \text{ cenizas insolubles en ácido}$$

Siga el paso 1.9.1 si utiliza una mufla de rampa programable, de lo contrario, siga el paso 1.9.2.

## 5 ANÁLISIS DEL LICOR

Materiales:

- Licor
- Agua destilada
- Espectrofotómetro pharo 300 Merck

5.1 Determinar la absorbancia del licor filtrado en el inciso 4.5 con el espectrofotómetro pharo 300 Merck y registrar los valores encontrados para determinar el porcentaje de lignina soluble en ácido.

$$\% \text{Lignina soluble en ácido} = \frac{UV_{abs} \times V_{lf} \times D}{\varepsilon \times P \times L} \times 100$$

Donde:

$UV_{abs}$  es la medida de la absorbancia UV-Visible para la muestra a la longitud de onda apropiada (ver cuadro B3).

$V_{lf}$  es el volumen del licor filtrado.

$D$  es la dilución, la cual se calcula de la siguiente manera:

$$D = \frac{\text{Volumen de la muestra} + \text{Volumen solvente}}{\text{Volumen de la muestra}}$$

$\varepsilon$  es la absorptividad de la biomasa a la longitud de onda específica

$P$  es el peso de la muestra

$L$  es la longitud de la trayectoria de UV-visible de la celda

**Cuadro B3. Constantes de absorptividad para medir lignina soluble en ácido para diferentes tipos de biomasa.**

Biomass type	Lambda max (nm)	Absorptivity at lambda max (L/g cm)	Recommended wavelength (nm)	Absorptivity at recommended wavelength (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

Fuente NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass

## 6 NEUTRALIZACIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS.

Materiales:

- Carbonato de Calcio
- Pinzas
- Papel indicador de pH
- Tijeras
- Tubos Falcon con tapa
- Soporte para tubos
- Varilla agitadora de vidrio
- Espátula
- Jeringa
- Tubos Eppendorf.

6.1 Trasvasar las muestras de las botellas a tubos Falcon de 50 mL

4.1 Medir el pH a cada muestra con tiras de pH.

6.2 Agregar Carbonato de Calcio hasta que el pH se encuentre entre 5 y 6. Esto se hace adicionando cantidades pequeñas de Carbonato de Calcio y agitando con las varillas de vidrio. Al medir el pH, verificar que la espuma se disperse.

6.3 Centrifugar las muestras en los tubos Falcon por 10 minutos a 3400 rpm.

6.4 Pasar el sobrenadante de las muestras a otros tubos Falcon de 15 mL y medir el pH final.

6.5 Congelar las muestras durante la noche.

6.6 Centrifugar las muestras en cuanto se sacan del congelador.

6.7 Trasvasar el sobrenadante a otro tubo Falcon de 15 mL, dejando aproximadamente de 1 a 2 mL como precipitado de neutralización.

6.8 Congelar la solución obtenida en los tubos Falcon durante 2 horas y centrifugar nuevamente.

6.9 Pasar una cantidad pequeña de cada solución a un vial y a un Eppendorf para contramuestra.

6.10 Rotular cada vial y poner cinta para evitar que el nombre se borre.

6.11 Pasar todos los viales al equipo especializado de cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC por sus siglas en inglés.

**Anexo C.** Protocolo para la elaboración de curvas de calibración.

PROTOCOLO CURVAS DE CALIBRACIÓN

Laboratorio de Transformación de Biomasa  
Escuela de Ingeniería Química  
Universidad Industrial de Santander

1 CÁLCULO DE LAS CANTIDADES DE AZÚCARES (XILOSA, ARABINOSA Y GLUCOSA) NECESARIAS PARA PREPARAR LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN.

Materiales:

- 3 balones aforados de 25 mL
- Azúcares (Xilosa, Arabinosa y Glucosa)

1.1 Tomar 24.0 mg/mL como valor sugerido del rango de concentraciones de azúcares de la Tabla 1 para Xilosa, Arabinosa y Glucosa.

1.2 Calcular las cantidades de azúcares necesarias para preparar la curva de calibración de la siguiente manera:

$$\text{Azúcar requerido} = C_s \text{ [g/L]} * (V_b) \quad E_c (1)$$

Dónde:

$C_s$  es la concentración sugerida para los estándares.

$V_b$  es el volumen del balón aforado.

**Tabla 1. Rango de concentraciones sugerido para los estándares.**

Component	Suggested concentration range (mg/ml)
D-cellobiose	0.1–4.0
D(+)glucose	0.1–4.0
D(+)xylose	0.1–4.0
D(+)galactose	0.1–4.0
L(+)arabinose	0.1–4.0
D(+)mannose	0.1–4.0
CVS	Middle of linear range, concentration not equal to a calibration point (2.5 suggested)

Fuente NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass

## 2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA CURVAS DE CALIBRACIÓN:

### Materiales:

- 3 balones de 25 mL
- Balanza
- Azúcares (Xilosa, Arabinosa y Glucosa)
- Agua tipo 1
- Pinzas
- Pipeta y puntas
- Sharpie

2.1 Pesar cada una de las cantidades calculadas de azúcares en un balón aforado de 25 mL.

2.2 Agregar la cantidad suficiente de agua tipo 1 para homogeneizar.

2.3 Aforar con agua tipo 1 la solución una vez esté homogénea.

2.4 Llevar el balón aforado al ultrasonido por 15 min.

2.5 Repetir dos veces más los incisos 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4.

### 3. DILUCIÓN DE LAS SOLUCIONES PREPARADAS.

#### Materiales:

- Tubos Eppendorf
- Viales y tapas de viales
- Soporte para tubos de ensayo
- Pipetas y puntas
- Agua tipo 1
- Balanza
- Papel
- Cinta
- Tijeras

3.1 Rotular 6 viales por cada solución estándar preparada de la siguiente manera:

- CCA-a dilución: para las Curvas de Calibración de Azúcares. Las letras minúsculas indican las réplicas (a,b,c). Todas las soluciones preparadas se diluyen a 0.05-0.1-0.25-0.5-0.7-1.

3.2 Poner un vial (limpio, seco y rotulado) en la balanza y tarar.

3.3 Tomar con una pipeta, las siguientes cantidades de la solución preparada para cada disolución: Para las disoluciones de 0.05-0.1-0.25-0.5-0.7-1, tomar 50, 100, 250, 500, 700 y 1000  $\mu\text{L}$ , respectivamente.

3.4 Adicionar la cantidad tomada al vial que se encuentra en la balanza. Registrar el peso de la muestra y tarar.

3.5 Adicionar agua tipo 1 hasta alcanzar un valor de 1000  $\mu\text{L}$ , dependiendo de la disolución, es decir, para las disoluciones de 0.05-0.1-0.25-0.5-0.7-1, agregar 50, 900, 750, 500, 300 y 0 de agua tipo 1. Registrar el peso del agua.

#### 4 DETERMINACIÓN DE DENSIDADES

Materiales:

- Balones de 5 mL.
- Balanza.
- Soluciones preparadas.

Aforar el balón con la solución a la que se le quiere determinar la densidad.

Registrar el peso de la solución.

Determinar la densidad de la solución de la siguiente manera:

$$\rho = m_R / V_b$$

Donde:

$m_R$  es la masa registrada de la solución en gramos (g).

$V_b$  es el volumen del balón en mL.

# PROTOCOLO DE MONTAJE DE CURVAS DE CALIBRACIÓN DE ESTÁNDARES DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN

Laboratorio de Transformación de Biomasa  
Escuela de Ingeniería Química  
Universidad Industrial de Santander

Para la preparación de los estándares de productos de degradación, se realizan dos soluciones:

## 5. Preparación de solución con ácidos

Materiales:

- 3 balones aforados de 25 mL
- Ácido Succinico
- Ácido Láctico
- Glicerol
- Ácido Acético
- Etanol
- Tubos Eppendorf.
- Agua tipo 1

5.1 Cálculo de las cantidades de los patrones necesarios para preparar las curvas de calibración:

5.1.1 Tomar los valores máximos de concentración sugeridos para Ácido Succinico, Ácido Láctico, Glicerol, Ácido Acético y Etanol. Estas concentraciones se encuentran en la tabla 2.

5.1.2 Calcular las cantidades de los patrones necesarios para preparar la curva de calibración de la siguiente manera:

$$\text{Patrón requerido} = (C_s) \cdot (V_b) \qquad \text{Ec (1)}$$

Donde:

Vb es el volumen del balón aforado en mL.

Cs es la concentración sugerida de los patrones en mg/mL.

**Tabla 1 Concentración sugerida para los patrones de calibración**

Component	Approximate Retention time (min)	Suggested concentration range (mg/ml)
Xylitol	11.6	0.2 – 6.0
Succinic acid	12.0	0.2 – 10.0
L-Lactic acid	13.2	0.2 – 12.0
Glycerol	14.2	0.2 – 8.0
Acetic acid	15.5	0.2 – 12.0
Ethanol	22.7	1.0 - 15.0
HMF	29.4	0.02 – 5.0
Furfural	42.8	0.02 - 5.0
CVS	-	Middle of linear range

Fuente NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples.

5.2 Preparación de los estándares de productos de degradación.

5.2.1 Llenar dos tubos Eppendorf por cada patrón.

5.2.2 Agregar agua tipo 1 a un balón de 25 mL hasta llenar el fondo del mismo.

5.2.3 Poner el balón en la balanza y tarar.

5.2.4 Agregar cuidadosamente cada uno de los patrones en las cantidades previamente calculadas.

5.2.5 Aforar con agua tipo 1.

5.2.6 Poner el balón en el ultrasonido durante 15 minutos.

5.2.7 Repetir los incisos del 1.2.3 al 1.2.7 por dos veces más.

### 5.3 Dilución de los azúcares preparados.

#### Materiales:

- Tubos Eppendorf
- Viales y tapas de viales
- Soporte para tubos de ensayo
- Pipetas y puntas
- Agua tipo 1
- Balanza
- Papel
- Cinta
- Tijeras

5.3.1 Trasvasar de cada balón aforado la solución a 3 tubos Eppendorf.

5.3.2 Rotular 6 viales por cada solución estándar preparada.

Todas las soluciones preparadas se diluyen a 0.05-0.1-0.25-0.5-0.7-1.

### 5.4 Preparación de las disoluciones

5.4.1 Poner un vial (limpio, seco y rotulado) en la balanza y tarar.

5.4.2 Tomar con una pipeta, las siguientes cantidades de la solución preparada disponible en los tubos Eppendorf, para cada disolución:

Para las disoluciones de 0.05-0.1-0.25-0.5-0.7-1, tomar 50, 100, 250, 500, 700 y 1000  $\mu L$ , respectivamente.

5.4.3 Adicionar la cantidad tomada al vial que se encuentra en la balanza. Registrar el peso de la muestra y tarar.

5.4.4 Adicionar agua tipo 1 hasta alcanzar un valor de 1000  $\mu L$ , dependiendo de la disolución, es decir, para las disoluciones de 0.05-0.1-0.25-0.5-0.7-1, agregar 50, 900, 750, 500, 300 y 0 de agua tipo 1. Registrar el peso del agua.

## 5.5 Determinación de densidades

Materiales:

- Balones de 5 mL.
- Balanza.
- Soluciones preparadas.

5.5.1 Tener disponibles balones de 5 mL y verificar que estén limpios y secos.

5.5.2 Poner un balón en la balanza y tarar.

5.5.3 Aforar el balón con la solución a la que se le quiere determinar la densidad.

5.5.4 Registrar el peso de la solución.

5.5.5 Determinar la densidad de la solución de la siguiente manera:

$$\rho = m_R / V_b$$

Donde:

$m_R$  es la masa registrada de la solución en gramos (g).

$V_b$  es el volumen del balón en mL.

## 5.6 Preparación de solución con Furfural

Materiales:

- 3 balones aforados de 25 mL
- Furfural
- Agua tipo 1

5.6.1 Cálculo de la cantidad de Furfural necesario para preparar las curvas de calibración:

5.6.2 Tomar el valor máximo de concentración sugeridos para Furfural. Estas concentraciones se encuentran en la tabla 2.

5.6.3 Verificar que en el laboratorio estén disponibles 3 balones aforados de 25 mL, limpios y secos.

5.6.4 Calcular la cantidad de Furfural necesario para preparar la curva de calibración de la siguiente manera:

$$\text{Patrón requerido} = (C_s) \cdot (V_b) \quad \text{Ec (1)}$$

Dónde:

$V_b$  es el volumen del balón aforado en mL.

$C_s$  es la concentración sugerida de los patrones en mg/mL.

5.6.5 Preparación de los estándares de productos de degradación.

5.6.6 Tener disponible Furfural.

5.6.7 Llenar dos tubos Eppendorf con Furfural.

5.6.8 Agregar agua tipo 1 a un balón de 25 mL hasta llenar el fondo del mismo.

5.6.9 Poner el balón en la balanza y tarar.

5.6.10 Agregar Etanol y registrar el peso.

5.6.11 Agregar cuidadosamente Furfural en la cantidad previamente calculada.

5.6.12 Aforar con agua tipo 1.

5.6.13 Poner el balón en el ultrasonido durante 15 minutos.

5.6.14 Repetir los incisos del 1.2.3 al 1.2.7 por dos veces más.

## 5.7 Dilución de los azúcares preparados.

### Materiales:

- Tubos Eppendorf
- Viales y tapas de viales
- Soporte para tubos de ensayo
- Pipetas y puntas
- Agua tipo 1
- Balanza
- Papel
- Cinta
- Tijeras

5.7.1 Trasvasar de cada balón aforado la solución a 3 tubos Eppendorf.

5.7.2 Rotular 6 viales por cada solución estándar preparada.

5.7.3 Realizar el inciso 3.5 y 3.6

## PROTOCOLO DE MONTAJE DE CURVAS DE CALIBRACIÓN en HPLC

Laboratorio de Transformación de Biomasa

Escuela de Ingeniería Química

Universidad Industrial de Santander

### 1. Preparación de la fase móvil

#### Materiales:

- Agua tipo 1
- Ácido sulfúrico
- 1 pipeta y puntas

- Balón aforado de 1 L
- 1 bomba de vacío
- Filtros VacuCap
- 2 mangueras
- 1 agitador de ultrasonido

1.1 Tomar una alícuota de 0,278 mL de ácido sulfúrico (96% p/p) con una pipeta.

1.2 Depositar la alícuota de ácido sulfúrico en un balón de 1 L y aforar con agua tipo 1 filtrada previamente. Esta mezcla se denominará desde ahora en adelante como fase móvil.

1.3 Ubicar el balón en el agitador de ultrasonido por 10 minutos.

1.4 Trasvasar la fase móvil (solución preparada) a los recipientes designados en el equipo

1.5 Abrir el programa "LC Solution", oprimir en "1Cpu" y dar clic en "Ok".

1.6 Abrir la válvula "DRAIN", poner un flujo de 1 mL/min y dar clic en "Instrument on/off", teniendo en cuenta que la temperatura se encuentre a 25°C. Esperar 10 minutos y verificar que no existan burbujas en los capilares.

1.7 Para poner el flujo requerido, se procede a realizar los siguientes pasos:

1.7.1 Dar clic en "Simple settings"

1.7.2 Escribir el flujo deseado en el recuadro "Pumb".

1.7.3 Dar clic en "Download".

1.8 Bajar el flujo a 0 mL/min y cerrar la válvula "DRAIN".

1.9 Dar clic en "RID (Dector A) Flow on/off" para permitir que el flujo pase por la columna.

1.10 Subir el flujo a 0,1 mL/min y esperar 5 min. Registrar condiciones en la hoja de Excel (Tabla muestras HPLC).

1.11 Aumentar el flujo a 0,2 mL/min y la temperatura a 65°C y esperar una hora. Registrar condiciones en la hoja de Excel (Tabla muestras HPLC).

1.12 Aumentar el flujo de a 0,1 mL/min cada 15 min hasta llegar a un flujo de 0,6 mL/min. Registrar condiciones en la hoja de Excel (Tabla muestras HPLC).

1.13 Modificar el tiempo final del proceso en consecuencia al análisis deseado en el módulo de control (ventana de Data Acquisition).

1.14 El tiempo de duración para cada sustancia son los siguientes:

- Muestras con furfural: 50 min
- Muestras para degradación de azúcares: 35 min
- Muestra para regeneración de azúcares: 25 min
- Muestras con ácidos: 25 min

1.15 Dar clic en archivo, guardar método como y nombrar el método con la sustancia que necesita ese tiempo de duración.

1.16 Presionar la ventana Batch table en el módulo de control.

1.17 Agregar las filas necesarias en la columna "Vial". Una fila por cada vial a utilizar.

1.18 Colocar el nombre de las muestras en las columnas "Sample name" y en la columna "Sample ID". Ambas columnas pueden tener el mismo nombre para su respectivo vial.

1.19 Seleccionar "unknown" en la columna "Sample Type" y en la columna "Analysis type" seleccionar IT y QT, para todas las muestras.

1.20 Dar clic en la columna "Data file" y seleccionar la carpeta en donde se guardarán los resultados de la prueba.

1.21 Seleccionar en la columna "Method file" el archivo guardado en el punto 1, cada método de acuerdo al propósito del análisis.

1.22 Colocar 20 mL para todas las muestras en la columna "Injection volumen".

1.23 Colocar cero (0) en la columna "Level" para todas las muestras.

1.24 Seleccionar todas las muestras en la columna "Report Output".

1.25 Dar clic en la columna "Report format" y seleccionar en documentos>Hplc>Neila lel archivo "Report format".

1.26 Seleccionar todas las muestras en la columna "Autopurge".

1.27 Dejar sin seleccionar todas las muestras en la columna "Baseline".

1.28 Seleccionar "None" en la columna "Summary type" para todas las muestras.

1.29 Seleccionar el archivo "Report format" en la columna "Summary report".

1.30 Abrir la sección en donde van las muestras (Cabina inferior al panel de flujo y presión) y retirar la bandeja para las muestras. La bandeja está marcada como “1L”.

1.31 Colocar los viales en la bandeja en concordancia con el número que está en la columna “vials” en el computador. Colocar nuevamente la bandeja dentro del equipo.

1.32 Dar clic en la flecha de iniciar (color verde) del programa.

## PROTOCOLO PARA ELABORAR CURVAS DE CALIBRACIÓN

Laboratorio de Transformación de Biomasa  
Escuela de Ingeniería Química  
Universidad Industrial de Santander

1 A partir de las masas registradas de cada dilución y las densidades de la solución medida, obtener la concentración conocida ( $C_c$ ) de cada azúcar diluido.

$$C_c = \frac{gSlnmadre}{gSlntotal} * \frac{gCmedida}{mlbalón} * \frac{1}{\rho m} * \rho_{vial} * 1000$$

La solución madre es la primera dilución que se hizo de los azúcares o productos de degradación en el balón aforado. Con esto en mente:

$gSlnmadre$  : es el peso (gramos) de la cantidad de solución madre en su respectiva dilución.

$gSlntotal$  : es el peso (gramos) total de la dilución.

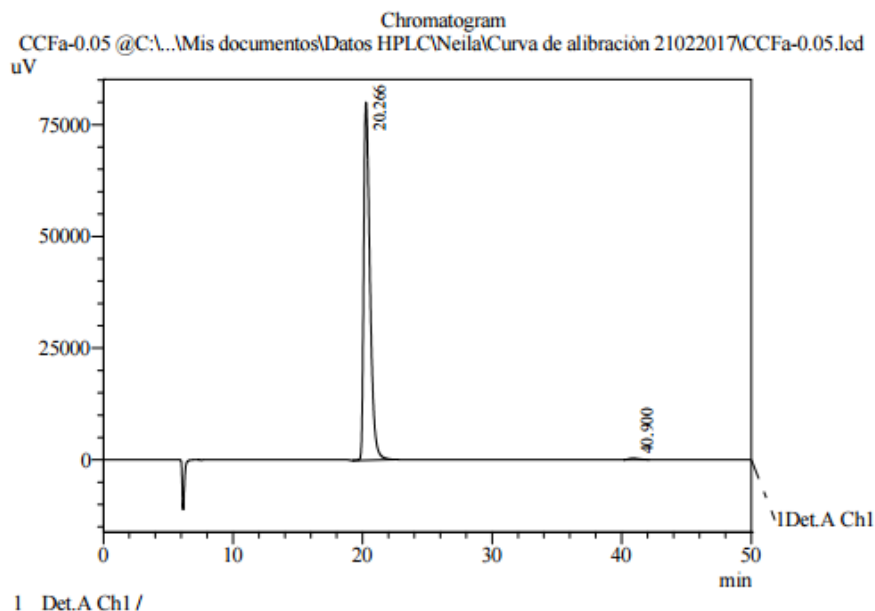
$gCmedida$  : es el peso (gramos) del azúcares o productos de degradación usado en la solución madre.

$mlbalón$ : es el volumen del balón aforado en donde se preparó la solución madre.

$\rho m$ : es la densidad de la solución madre.

$\rho_{vial}$ : es la densidad del vial.

2. A partir del cromatograma obtenido en el programa, tomar las áreas bajo la curva de los picos que representan cada azúcar o compuesto. Por ejemplo, en la Figura 3. Se presenta el cromatograma para una dilución de 0,05 ml solución madre furfural/1ml total. Conociendo que el tiempo de residencia del furfural se encuentra normalmente entre 39-41 min, según la tabla obtenida se encuentra que el área 15279.



PeakTable @C:\...\Mis documentos\Datos HPLC\Neila\Curva de alibración 21022017\CCFa-0.05.lcd  
Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	20.266	2692696	80114	99.436	99.643
2	40.900	15279	287	0.564	0.357
Total		2707975	80401	100.000	100.000

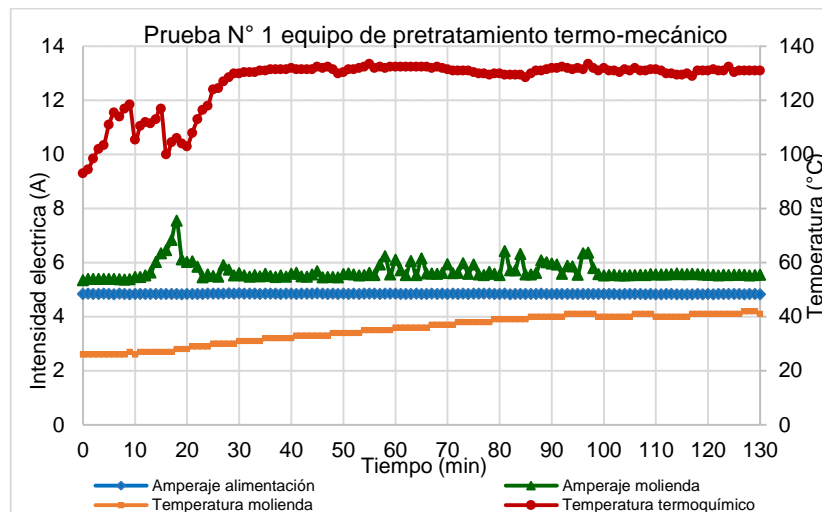
2.1 Ubicar los puntos en un plano cartesiano, con los datos de área en el eje Y los datos de sus respectivas concentraciones (en forma de concentración conocida) en el eje X.

2.2 Elegir una línea de tendencia que se ajusten a los puntos adecuadamente. Con la ecuación de esta línea se pueden convertir valores de área en concentraciones respectivas.

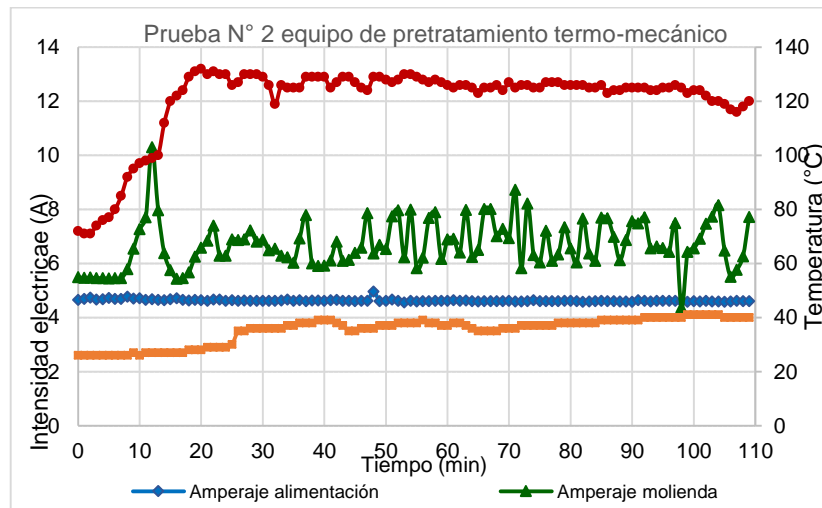
## Anexo D. Gráficas de las pruebas en todo el equipo.

Una vez realizados los arreglos se realizaron pruebas en el equipo en su totalidad con los diferentes flujos de alimentación propuestos. Se registraron datos de intensidad eléctrica de los tornillos alimentación y de molienda junto con temperaturas en molienda y termoquímico (Figura C1-C2-C3).

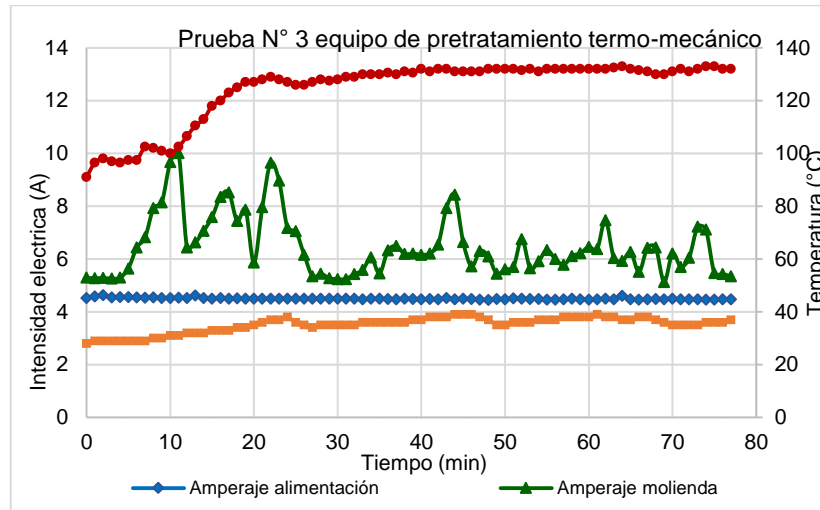
**Figura D1. Prueba a 30 g/min en el equipo de pretratamiento termomecánico**



**Figura D2. Prueba a 50 g/min en el equipo de pretratamiento termomecánico**



**Figura D3. Prueba a 80 g/min en el equipo de pretratamiento termomecánico**



Se evidencia el comportamiento estable de la mayoría de las variables a excepción de la sección molienda. En esta sección, la biomasa sale del reactor en pequeños pulsos, superando la fuerza que ejerce el pistón sobre esta, lo que permite que el motor necesite ejercer la fuerza de empuje de manera variable.

## Anexo E. Balance de carbono.

Antes de realizar el balance de carbono fue necesario determinar las entradas y salidas de corrientes con carbón en su composición, ignorándose así las entradas de vapor al sistema. Además, se midió porcentaje de sólidos a la biomasa que entra y sale del sistema y se realizó en el cuadro D1.

**Cuadro D1. Condiciones en los flujos de entrada y corrida con contenido de carbono.**

<b>Biomasa total entrada</b>	1600,00	<b>[g]</b>
<b>% Sólidos totales entrada</b>	22,00	<b>[%]</b>
<b>ST iniciales polímeros</b>	352,00	<b>[g]</b>
<b>SI iniciales monómeros</b>	361,68	<b>[g]</b>
<b>ST iniciales monómeros</b>	374,81	<b>[g]</b>
<b>ST alimentación monómeros</b>	11,14	<b>[g]</b>
<b>ST condensados monómeros</b>	22,69	<b>[g]</b>
<b>ST molienda monómeros</b>	340,97	<b>[g]</b>
<b>SI iniciales</b>	341,44	<b>[g]</b>
<b>% Sólidos insolubles entrada en los sólidos totales</b>	97	<b>[%g ST/g SI]</b>
<b>% Sólidos insolubles salida en los sólidos totales</b>	90	<b>[%g ST/g SI]</b>
<b>Licor alimentación salida</b>	975,39	<b>[g]</b>
<b>Licor termoquímico salida</b>	431,27	<b>[g]</b>
<b>% Sólidos totales salida mecánico</b>	61,65	<b>[%]</b>
<b>Densidad licor molienda</b>	1037	<b>[g/l]</b>
<b>Densidad licores aliment y cond</b>	1000	<b>[g/l]</b>
<b>ST molienda monómero</b>	340,97	<b>[g]</b>
<b>%ST molienda</b>	61,65	<b>% (g ST/g slurry molienda)</b>
<b>%SI molienda</b>	52,86	<b>% (g SI/g slurry molienda)</b>
<b>Slurry molienda</b>	553,08	<b>[g]</b>
<b>SI molienda oligómeros</b>	320,00	<b>[g]</b>
<b>SI molienda monómeros</b>	306,88	<b>[g]</b>
<b>SS Molienda monomeros</b>	34,10	<b>[g]</b>
<b>ST molienda monómeros</b>	340,97	
<b>Licor molienda</b>	233,08	<b>[g]</b>

Para el balance de carbono es necesario calcular el peso de C-mol de cada molécula con posibilidad de aparición en el proceso. El peso C-mol se calcula dividiendo la masa molecular de la molécula con el número de carbonos que posee, representando la cantidad de la sustancia que tiene un mol de carbón.

**Cuadro D2. Cálculo de peso C-mol para cada molécula.**

Tabla pesos moleculares y pesos C-mol			
Compuesto	Masa molecular [g/mol]	Número de Átomo de C en la molécula	Peso C-mol [g]
Glucosa	180,16	6	30,03
Xilosa	150,13	5	30,03
Arabinosa	150,13	5	30,03
Acido Acético	60,05	2	30,03
Lignina	203,09	9	22,57
Furfural	96,09	5	19,22
HMF	126,11	6	21,02

La composición de carbono a la entrada se tabula en el cuadro D3. Los porcentajes en la columna de polímeros se convierte a monómeros por medio del factor anhidro (0,9 para componentes con 6 carbonos, 0,88 para componentes de 5 carbonos y 0,77 para el ácido acético), por medio del flujo de biomasa (base seca) se hallan la cantidad en gramos de monómeros en los sólidos en la entrada del proceso. Se encontró la cantidad de oligómeros y monómeros que entran el equipo multiplicando la concentración de estos en al corriente por la masa del licor de alimentación (Biomasa total de entrada menos Biomasa seca de entrada).

**Cuadro D3- Componentes con carbono de la biomasa a la entrada del proceso.**

Tabla caracterización in						
Compuesto	Insolubles		Solubles			
	Polímeros [%]	Monómeros [g]	Oligómeros [g/l]	Oligómeros [g]	Monómeros [g/l]	Monómeros [g]
Glucosa	43,88	159,01	1,68	2,02	0,16	0,19
Xilosa	21,98	81,46	2,87	3,45	0,23	0,28
Arabinosa	0,98	3,63	1,47	1,77	1,22	1,47
Acido Acético	4,20	19,57	1,86	2,24	1,42	1,71
Lignina	26,76	87,27	0,00	0,00	0,00	0,00
Furfural	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HMF	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Total</b>		<b>350,93</b>		<b>9,48</b>		<b>3,65</b>

Los componentes con carbonos en las corrientes de salida se presentan en el cuadro D4. Los solubles de alimentación (lixiviados) y termoquímico representa la composición de componentes carbono que salen del pretratamiento en otras corrientes diferentes a la de sólidos (salida molienda). Estas corrientes de licor representan una cantidad considerable de azúcares que salen del pretratamiento y son de importancia en tener en cuenta su análisis.

**Cuadro D4. Componentes con carbono en las corrientes de salida del pretratamiento**

Tabla caracterización salida														
Compuesto	Insolubles		Solubles molienda				Solubles alimentación				Solubles termoquímico			
	Polímeros [%]	Monómeros [g]	Oligómeros [g/l]	Oligómeros [g]	Monómeros [g/l]	Monómeros [g]	Oligómeros [g/l]	Oligómeros [g]	Monómeros [g/l]	Monómeros [g]	Oligómeros [g/l]	Oligómeros [g]	Monómeros [g/l]	Monómeros [g]
Glucosa	47,87	5,61	53,82	5,50	98,01	0,40	0,22	3,88	5,72	101,89	47,87	5,61	53,82	5,50
Xilosa	25,37	2,97	14,73	1,51	50,62	2,40	1,31	44,16	2,82	94,78	25,37	2,97	14,73	1,51
Arabino sa	2,00	0,23	1,56	0,16	67,77	0,18	0,10	41,12	0,26	108,89	2,00	0,23	1,56	0,16
Ácido Acético	5,28	0,62	2,88	0,29	47,63	0,56	0,31	49,49	0,60	97,12	5,28	0,62	2,88	0,29
Lignina	25,96	4,05	26,96	3,67	90,53	0,00	0,00	0,00	3,67	90,53	25,96	4,05	26,96	3,67
Furfural	0,00	0,00	0,00	0,00		0,01	0,01	0,34	0,01		0,00	0,00	0,00	0,00
HMF	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00		0,00		0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Total</b>		<b>13,49</b>		<b>11,13</b>	<b>82,48</b>	<b>3,55</b>	<b>1,95</b>	<b>14,42</b>	<b>13,07</b>	<b>96,9</b>		<b>13,49</b>		<b>11,13</b>

Para el balance de carbono se registran los componentes de entrada y salida del pretratamiento en su forma de C-mol. Para esto se divide a la cantidad en g de cada componente por su respectivo peso C-mol, el balance final se presenta en el cuadro D5. El porcentaje de carbono representa la relación entre los carbonos a la salida respecto al que entra al proceso para cada componente y el porcentaje de recuperación de carbono representa la relación entre el total de carbonos que salen respecto al carbono que entra.

**Cuadro D5. Balance de carbono**

<b>BALANCE DE CARBONO</b>										
<b>Compuesto</b>	<b>Entrada</b>		<b>Salida</b>							
	<b>% Peso seco</b>	<b>C-mol [g]</b>	<b>En sólidos</b>			<b>En licores</b>			<b>Total C-mole [g]</b>	<b>Recuperación (% C en alimentación)</b>
			<b>% Peso seco</b>	<b>C-mol [g]</b>	<b>% C</b>	<b>% Peso seco</b>	<b>C-mol [g]</b>	<b>% C</b>		
<b>Glucosa</b>	47,87	5,61	53,82	5,50	98,01	0,40	0,22	3,88	5,72	101,89
<b>Xilosa</b>	25,37	2,97	14,73	1,51	50,62	2,40	1,31	44,16	2,82	94,78
<b>Arabinosa</b>	2,00	0,23	1,56	0,16	67,77	0,18	0,10	41,12	0,26	108,89
<b>Ácido Acético</b>	5,28	0,62	2,88	0,29	47,63	0,56	0,31	49,49	0,60	97,12
<b>Lignina</b>	25,96	4,05	26,96	3,67	90,53	0,00	0,00	0,00	3,67	90,53
<b>Furfural</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,34	0,01	0,00
<b>HMF</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Total</b>		<b>13,49</b>		<b>11,13</b>	<b>82,48</b>	<b>3,55</b>	<b>1,95</b>	<b>14,42</b>	<b>13,07</b>	<b>96,9</b>

