

Caracterización de las fracciones resultantes del proceso de purificación de xilo-oligosacáridos
obtenidos a partir de raquis de palma de aceite africana

Cristian Jair Martínez Beltrán

Trabajo de Grado para Optar Título de Químico

Directora

Marianny Yajaira Combariza Montañez

Ph.D. Química

Co-Director

Luis Miguel Díaz Sánchez

M.Sc. Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2020

Dedicatoria

A Jesucristo y la virgen María por brindarme la oportunidad de escoger tan maravillosa carrera, cumplirla con éxito y lograr todas mis metas propuestas.

A mi amada madre, Yolanda Beltrán Toledo, a quien le debo todo su sacrificio, esfuerzo, apoyo y amor incondicional. Logrando formar desde su seno un hombre de bien, con buenos valores. Siendo útil para Dios y la sociedad.

A mi padre Rodolfo Martínez, quien me ha enseñado de todas las maneras posibles que todas las cosas se deben hacer por el camino correcto.

A mi familia, mis tíos, tías, primos y primas, quienes han sido un apoyo en todos los momentos difíciles y bellos de mi vida.

Dedico este trabajo en especial a mi nonito José del Carmen Beltrán Garcés, quien fue fuente de sabiduría, fe, amor, apoyo, tolerancia, respeto e inmensa alegría y hoy descansa en la Paz del señor.

Agradecimientos

A la Universidad Industrial de Santander, la escuela de Química y todo su talento humano, que me forjaron como profesional.

A mi directora la Dra. Marianny Yajaira Combariza, por todas la recomendaciones, orientaciones y correcciones que me brindó como parte de su experiencia profesional.

A mi codirector Luis Miguel Díaz Sánchez, por su apoyo, guía y enseñanzas en la realización de este proyecto.

A los grupos de investigación GIFTEX y CEIAM, por el recibimiento, apoyo y compañía de parte de cada uno de sus integrantes.

Al grupo de Investigación INTERFASE y la Dra. Debora Nabarlatz, por brindarme el material requerido y las muestras para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A mi compañero Javier Ardila, por su amistad y el acompañamiento durante el proceso y ejecución de gran parte de este proyecto.

A quien cambió mi manera de pensar, de ver la vida, me da alegría, respeto, amor, apoyo en todo y con su intachable sonrisa diaria. A ti Sandra Gómez gracias y a Dios por ponerte en mi camino.

Tabla de Contenido

| | |
|--|----|
| Introducción | 15 |
| 1. Objetivos | 17 |
| 1.1. Objetivo general..... | 17 |
| 1.2. Objetivos específicos | 17 |
| 2. Marco Teórico..... | 18 |
| 2.1. Hemicelulosa dentro de la biomasa lignocelulósica | 18 |
| 2.1.2. Xilano..... | 19 |
| 2.2. Definición de oligosacáridos y Xilo-oligosacáridos (XOs)..... | 20 |
| 2.3. Xilo-oligosacáridos y su aplicación como prebióticos | 24 |
| 2.4. Métodos de extracción de Xilo-oligosacáridos (XOs) a partir de biomasa residual | 25 |
| 2.4.1. Autohidrólisis como método hidrotérmico para obtener XOs a partir de biomasa residual..... | 26 |
| 2.4.2. Hidrólisis en medio alcalino como método para obtener XOs a partir de biomasa residual..... | 29 |
| 2.5. Procesos de purificación de xilooligosacáridos | 29 |
| 2.5.1. Purificación con carbón activado..... | 30 |
| 2.5.2. Resinas de intercambio iónico | 31 |

| | |
|--|----|
| 2.6. Caracterización de xilo-oligosacáridos | 32 |
| 2.7. Espectrometría de masas ESI..... | 33 |
| 2.7.1. Caracterización de xilo-oligosacáridos mediante espectrometría de masas tándem en tiempo. | 36 |
| 3. Antecedentes | 39 |
| 4. Metodología | 41 |
| 4.1. Muestras | 42 |
| 4.2. Preparación de las muestras para el análisis por ESI..... | 45 |
| 5. Análisis de resultados | 46 |
| 5.1. Caracterización del estándar de xilano por espectrometría de masas ESI-QIT | 47 |
| 5.2. Caracterización de un hidrolizado de bagazo de caña de azúcar por espectrometría de masas ESI-QIT..... | 52 |
| 5.3. Caracterización del hidrolizado crudo de raquis de palma africana por espectrometría de masas ESI-QIT..... | 56 |
| 5.4. Caracterización de la fracción obtenida mediante el tratamiento con carbón activado del hidrolizado inicial de raquis de palma por espectrometría de masas ESI-QIT..... | 62 |
| 5.5. Caracterización de la fracción obtenida mediante el tratamiento con resinas de intercambio iónico del hidrolizado inicial de raquis de palma por espectrometría de masas ESI-QIT..... | 67 |
| 5.5.1. Tratamiento con resina de intercambio catiónico ácido fuerte (H ⁺). | 67 |
| 5.5.2. Tratamiento con resina de intercambio aniónico base fuerte (OH ⁻) liofilizada. | 72 |

| | |
|---|----|
| 5.6. Fragmentación de xilo-oligosacáridos ácidos acetilados y xilo-oligosacáridos neutros acetilados..... | 77 |
| 5.6.1. Fragmentación del ion aducto $[M+Na]^+$ en m/z 537 correspondiente al tipo $Xil_nAc_mAMeGlc$ | 77 |
| 5.6.2. Fragmentación del ion aducto $[M+Na]^+$ en m/z 479 correspondiente al tipo Xil_nAc_m | 80 |
| 6. Conclusiones..... | 84 |
| Referencias Bibliográficas..... | 86 |

Lista de Tablas

Pág

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Número de residuos de xilosa (Xiln) en los xilo-oligosacáridos neutros y ácidos, identificados por espectrometría de masas ESI en modo de ionización positivo, full scan, como aductos de sodio y amonio, respectivamente..... | 50 |
| Tabla 2. XOs ácidos y acetilados ácidos identificados como aductos de sodio y amonio en el espectro ESI de una muestra de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar | 55 |
| Tabla 3. XOs neutros, neutros acetilados, ácidos y acetilados ácidos identificados como aductos de sodio y amonio en el espectro ESI de una muestra de hidrolizado de raquis de palma africana | 59 |
| Tabla 4. XOs neutros, neutros acetilados, ácidos y acetilados ácidos identificados como aductos de sodio y amonio en el espectro ESI de la fracción al tratamiento con carbón activado al hidrolizado de raquis de palma africana | 66 |
| Tabla 5. XOs neutros, neutros acetilados y ácidos identificados como aductos de sodio y amonio en el espectro ESI de la fracción al tratamiento con resina de intercambio catiónico ácido fuerte al hidrolizado de raquis de palma africana | 71 |
| Tabla 6. XOs neutros y neutros acetilados identificados como aductos de sodio y amonio en el espectro ESI de la fracción al tratamiento con resina de intercambio aniónico base fuerte al hidrolizado de raquis de palma africana..... | 74 |

Lista de Figuras

| | Pág |
|--|-----|
| Figura 1. Esquema de la composición general de la biomasa lignocelulósica | 18 |
| Figura 2. Estructura química general del xilano con sustituyentes acetilo (Ac), un monosacárido de arabinosa y ácido 4-O-metil-D-glucurónico (AMeGlc)..... | 20 |
| Figura 3. Estructura química general de un XO _s con grupos acetilo como sustituyentes en la posición 2 del anillo | 21 |
| Figura 4. Zonas de digestión de distintos nutrientes en el tracto gastrointestinal, bajo condiciones aerobias y anaerobias. | 24 |
| Figura 5. Esquema general de la ruta de extracción de los XO _s , a partir de dos metodologías diferentes: autohidrólisis y extracción alcalina..... | 25 |
| Figura 6. Esquema general de la reacción de degradación en medio ácido para los XO _s donde se obtiene xilosa ,furfural y HMF como productos secundarios..... | 27 |
| Figura 7. Mecanismo de reacción de la autohidrólisis catalizada por ácido (H ₃ O ⁺). Las flechas continuas indican el mecanismo de reacción dominante..... | 28 |
| Figura 8. Estructura del polímero sulfonado de poliestireno-divinilbenceno en una resina de tipo catiónica fuerte, donde el H ⁺ del grupo sulfónico SO ₃ H es el ion intercambiable..... | 31 |
| Figura 9. Proceso de ionización en modo positivo por electronebulización (ESI)..... | 34 |
| Figura 10. Nomenclatura propuesta por Domon y Costello para caracterizar las fragmentaciones en oligosacáridos | 37 |

- Figura 11. Tres posibles rutas de fragmentación de xilo-oligosacáridos observados en el espectro de masas como aductos de sodio $[M+Na]^+$ 38
- Figura 12. Publicaciones científicas en el periodo 2007-2020. Fecha de búsqueda: 20 Junio de 2020. Fuente: Scopus (Elsevier). Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“Characterization, XO_s, Mass Spectrometry, Purification”)..... 40
- Figura 13. Ruta de purificación propuesta al hidrolizado crudo inicial de raquis de palma africana. Utilizando A) Tratamiento con carbón activado, B) Tratamiento con resina de intercambio catiónico ácido fuerte y C) Tratamiento con resina de intercambio aniónico base fuerte43
- Figura 14. Esquema de las interacciones de cada uno de los pasos de la ruta de purificación propuestos. A) Tratamiento con Carbón Activado B) Tratamiento con Resina de Intercambio Catiónico ácido fuerte y C) Tratamiento con Resina de Intercambio Aniónico base fuerte.....44
- Figura 15. Espectros de masas ESI del estándar de xilano, modo ionización positivo, A) *Full Scan* y B) Zoom en la región del espectro m/z 300 a m/z 800.....48
- Figura 16. Series de aductos de sodio $[M+Na]^+$ y amonio $[M+NH_4]^+$ de xilo-oligosacáridos neutros de tipo (Xil_n), observados en el espectro de masas ESI.....51
- Figura 17. Series de aductos de sodio $[M+Na]^+$ de xilo-oligosacáridos neutros de tipo (Xil_n) y (Xil_nAMeGlc), observados en el espectro de masas ESI52
- Figura 18. Espectro de masas ESI-IT de una muestra de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, modo ionización positivo, *full scan* y acercamiento en la región de m/z 600-800.....54
- Figura 19. Espectro de masas ESI del hidrolizado inicial de raquis de palma africana, modo ionización positivo, *full scan*, y acercamiento en la región de m/z 600 a m/z 800.....58

- Figura 20. Patrones isotópicos experimentales y calculados de las especies: A) Furfural $[M+H]^+$ m/z 97, B) HMF $[M + 2Na - H]^+$ m/z 171, C) Polipropileno $[M + Na]^+$ m/z 275 y D) Ramnosa $[M+H]^+$ m/z 165. Línea de color azul: Patrón Isotópico Experimental, línea de color negro: Patrón Isotópico Teórico.....61
- Figura 21. A) Espectro de masas ESI-IT de la muestra obtenida a partir del tratamiento con carbón activado de raquis de palma africana, modo ionización positivo, *full scan*, B) acercamiento en la región de m/z 400-1000.....63
- Figura 22. A) Espectro de masas ESI-IT de la muestra purificada con resina de intercambio catiónico ácido fuerte de raquis de palma africana, modo ionización positivo *Full Scan*. B) zoom de m/z 400-1000.....69
- Figura 23. Espectro de masas *ESI-IT* de la muestra purificada con resina de intercambio aniónico base fuerte (OH^-) de raquis de palma africana, modo ionización positivo *Full Scan* y acercamiento en la región en m/z 400-800.....73
- Figura 24. Series de aductos de amonio $[M+NH_4]^+$ de xilo-oligosacáridos neutros acetilados de tipo (Xil_nAc_m) , observados en el espectro de masas ESI.....76
- Figura 25. Espectro *ESI-MS/MS* del ion $[M+Na]^+$ con estructura $Xil_2Ac_1AMeGlc$ en m/z 537....79
- Figura 26. Isómeros estructurales de la especie química $[M+Na]^+$ en m/z 537.....80
- Figura 27. Espectro *ESI-MS/MS* del ion $[M+Na]^+$ con estructura Xil_3Ac_1 m/z 479.....81
- Figura 28. Isómeros estructurales de la especie química en m/z 479.....82

Lista de Símbolos y Abreviaturas

| | |
|-------------|---|
| Ac | Acetilo |
| ACN | Acetonitrilo |
| AGlc | Ácido Glucurónico |
| AMeGlc | Ácido 4-O-metil-D-glucurónico |
| CEIAM | Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales |
| CID | <i>Collision-Induced Dissociation</i> (Disociación inducida por colisión) |
| Da | Unidades de Dalton |
| <i>e.g.</i> | <i>Exempli Gratia</i> (Por ejemplo) |
| ESI | <i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización) |
| FOS | Fructo-oligosacáridos |
| GIFTEX | Grupo de Investigación en Fisicoquímica Teórica y Experimental |
| GP | Grado de Polimerización |
| GOS | Galacto-oligosacáridos |
| HMF | Hidroximetilfurfural |
| <i>i.e.</i> | <i>Id Est</i> (Es decir) |
| INTERFASE | Grupo de Investigación en tecnologías de valoración de residuos y fuentes agrícolas e industriales para la sustentabilidad energética |
| IT | <i>Ion-Trap</i> (Trampa de Iones) |

| | |
|---|---|
| m/z | Relación masa/carga |
| M_n | Peso molecular promedio en número |
| MS | <i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas) |
| MS/MS | Espectrometría de masas en tándem |
| M_w | Peso molecular promedio en peso |
| <i>MWD</i> | <i>Molecular Weight Distribution</i> (Distribución de peso molecular) |
| PD | Polidispersidad |
| PS/DVB | Poliestireno Divinilbenceno |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| XO _s | Xilo-oligosacáridos |
| Xil | Molécula de xilosa neutra |
| Xil _n AMeGlc | Xilo-oligosacárido ácido |
| Xil _n | Xilo-oligosacárido neutro |
| Xil _n Ac _m | Xilo-oligosacárido neutro acetilado |
| Xil _n Ac _m AMeGlc | Xilo-oligosacárido ácido acetilado |
| Xil _{res} | Residuo de xilosa neutra |

Resumen

Título: Caracterización de las fracciones resultantes del proceso de purificación de xilo-oligosacáridos obtenidos a partir de raquis de palma de aceite africana*

Autor: Cristian Jair Martínez Beltrán **

Palabras clave: xilo-oligosacáridos, esi-it, espectrometría de masas, ruta de purificación.

Descripción:

En Colombia, entre los residuos agroindustriales más comunes se encuentra el raquis de palma de aceite africana. Este residuo agrícola contiene compuestos lignocelulósicos *i.e.* hemicelulosa, celulosa y lignina. La hemicelulosa está constituida principalmente por xilano, un heteropolisacárido cuya unidad repetitiva principal en su estructura es el monosacárido xilosa. A partir de la hemicelulosa y mediante procesos hidrotérmicos como la autohidrólisis se puede extraer el xilano y oligómeros denominados xilo-oligosacáridos. Durante el proceso de extracción hidrotérmico se generan compuestos indeseados como el furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y monosacáridos libres, por esta razón el hidrolizado se sometió a diversos procesos de purificación que involucran el uso de carbón activado y resinas de intercambio iónico. De esta forma es posible retirar compuestos indeseables y obtener un producto de grado alimenticio, ya que los xilo-oligosacáridos pueden tener un papel importante en la dieta actuando como prebióticos promoviendo el crecimiento de microorganismos benéficos de la microbiota intestinal *e.g.* *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.

Mediante la técnica de espectrometría de masas *ESI-IT* se analizó el hidrolizado inicial y cada una de las fracciones del proceso de purificación. Mediante estos análisis fue posible establecer la presencia de los compuestos de degradación (furfural e hidroximetilfurfural) y de familias de xilo-oligosacáridos ácidos (XilnAMeGlc), neutros (Xiln), y sus análogos acetilados (XilnAcmAMeGlc y XilnAcm) en forma de aductos de sodio y de amonio. A medida que avanza el proceso de purificación, se observó que los compuestos de degradación disminuyeron su abundancia y que las familias de XOs ácidos también lo hicieron, llegando finalmente a obtener solo XOs neutros (Xiln) y sus análogos acetilados (XilnAcm). Finalmente, mediante pruebas de fragmentación en modo tándem se obtuvo información estructural de los componentes presentes en las fracciones.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Directora: Marianny Yajaira Combariza Montañez, Ph.D. Química. Co-director: Luis Miguel Díaz Sánchez, M.Sc. Química.

Abstract

Title: Caracterización de las fracciones resultantes del proceso de purificación de xilo-oligosacáridos obtenidos a partir de raquis de palma de aceite africana *

Author: Cristian Jair Martínez Beltrán**

Keywords: xilo-oligosaccharides, esi-it, mass spectrometry, and purification route.

Description:

In Colombia, among the most common agro-industrial waste is the African oil palm rachis. This agricultural residue contains lignocellulosic compounds i.e. hemicellulose, cellulose and lignin. Hemicellulose is mainly made up of xylan, a heteropolysaccharide whose main repeating unit in its structure is the xylose monosaccharide. From hemicellulose and by hydrothermal processes such as autohydrolysis, xylan and oligomers called xylo-oligosaccharides can be extracted. During the hydrothermal extraction process unwanted compounds such as furfural, hydroxymethylfurfural (HMF) and free monosaccharides are generated, for this reason the hydrolysate underwent various purification processes that involve the use of activated carbon and ion exchange resins. In this way it is possible to remove undesirable compounds and obtain a food grade product, since xylo-oligosaccharides can have an important role in the diet acting as prebiotics promoting the growth of beneficial microorganisms of the intestinal microbiota e.g. Bifidobacterium and Lactobacillus.

Using the ESI-IT mass spectrometry technique, the initial hydrolysate and each of the fractions of the purification process were analyzed. Through these analyzes it was possible to establish the presence of the degradation compounds (furfural and hydroxymethylfurfural) and of families of acidic xyl-oligosaccharides (Xyl_nMeGlcA), neutrals (Xyl_n), and their acetylated analogs (Xyl_nAc_mMeGlcA and Xyl_nAc_m) in the form of sodium adducts and ammonium. As the purification process progresses, it was observed that the degradation compounds decreased their abundance and that the families of acid XO_s also did so, finally obtaining only neutral XO_s (Xyl_n) and their acetylated analogs (Xyl_nAc_m). Finally, by means of tandem mode fragmentation tests, structural information was obtained on the components present in the fractions.

*Bachelor Thesis

** Faculty of Sciences, school of Chemistry, Director: Marianny Yajaira Combariza Montañez, Ph.D. Chemistry. Co-director: Luis Miguel Díaz Sánchez, M. Sc. Chemistry.

Introducción

Los procesos agroindustriales buscan transformar productos primarios del campo para comercializarlos en los mercados nacionales e internacionales. En Colombia, productos como el aceite de palma, café, caña de azúcar, banano y cacao se producen extensivamente, y como resultado de su procesamiento se genera una cantidad considerable de desechos agroindustriales. En muchos casos el material residual del proceso supera con creces el producto que se comercializa. En la industria de producción de aceite de palma y caña de azúcar, se generan subproductos como el raquis de palma y el bagazo de caña de azúcar. Actualmente, estos desechos se utilizan para producir compost o como combustible para el autoabastecimiento energético en las plantas de producción. Sin embargo, en algunos casos los residuos también se convierten en focos de contaminación ambiental debido a su masiva producción (Cury R, 2017; Escalante Hernandez, 2011).

La biomasa vegetal proveniente de residuos agroindustriales está compuesta principalmente por celulosa, lignina y hemicelulosa. Esta última está compuesta principalmente por el heteropolisacárido xilano, cuyo monómero constituyente es la xilosa; por otra parte, la concentración de xilano en hemicelulosa depende de la fuente de materia vegetal. A partir del xilano, se pueden obtener productos con alto valor agregado que actúan como prebióticos, término acuñado por Glenn R. Gibson y Marcel B. Roberfroid en 1995 (Gibson y Roberfroid, 2008). Los prebióticos son oligosacáridos funcionales que sirven de alimento y ayudan a la estimulación efectiva de un cierto número de microorganismos que conforman la microbiota intestinal (bifidobacterias y lactobacilos). Algunos autores coinciden en que los prebióticos ayudan a suprimir el crecimiento de bacterias patógenas y mejorar la absorción de minerales (Aachary,

2011; Kunz, 2006; Moure, 2006; Nabarlatz, 2007), dentro de los oligosacáridos considerados como prebióticos se encuentran los galacto-oligosacáridos (GOS), fructo-oligosacáridos (FOS) y xilo-oligosacáridos (XOS).

Los xilo-oligosacáridos (XOs), son oligosacáridos de bajo peso molecular compuestos por monómeros de xilosa con enlaces β -(1-4) O-glucosídicos (Chemin et al., 2015; Nabarlatz, 2007). Son sólidos a temperatura ambiente, cristalinos de aspecto blanco y su estructura es dependiente del proceso de extracción y de la biomasa de la cual provienen. Estas moléculas pueden ser útiles como prebióticos, pueden reemplazar la sacarosa en alimentos, y demás contribuir con el alivio de síntomas como la diabetes, entre otras enfermedades (Samanta et al., 2015). Existen varios métodos para extraer los XOs, *e.g.* extracción enzimática, métodos hidrolíticos en medio ácido o básicos y métodos térmicos como la autohidrólisis (Nabarlatz, 2007). Aun así, con los métodos de extracción descritos es necesario realizar una purificación del extracto obtenido, para eliminar productos de degradación de pentosas y hexosas *e.g.* furfural, HMF, monómeros de xilosa, ramnosa, glucosa y ácidos glucurónicos (Ho et al., 2014). Para la purificación del extracto crudo de XOs se han reportado metodologías que utilizan carbón activado y resinas de intercambio iónico (Guerrero Serrano, 2018), mediante las cuales se obtiene un producto de alto grado de pureza, apto para consumo humano (Moure et al., 2006).

El objetivo de este trabajo es caracterizar mediante espectrometría de masas (ESI-QIT) las fracciones resultantes del proceso de purificación de un extracto crudo de XOs proveniente de raquis de palma, identificar las familias de oligómeros de XOs presentes y los compuestos de degradación *e.g.* furfural, HMF, monómeros de xilosa, ramnosa, glucosa y ácidos glucurónicos.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Caracterizar las fracciones de cada una de las etapas de purificación de los xilo-oligosacáridos obtenidos a partir de raquis de palma de aceite africana, mediante espectrometría de masas ESI.

1.2. Objetivos específicos

1. Establecer condiciones adecuadas para el análisis de xilo-oligosacáridos por espectrometría de masas ESI-IT utilizando xilano y el hidrolizado inicial de bagazo de caña de azúcar, como compuestos de referencia.
2. Asignar las diferentes familias de xilo-oligosacáridos y de subproductos presentes en cada una de las fracciones de la ruta de purificación del extracto de raquis de palma, mediante espectrometría de masas ESI-IT.

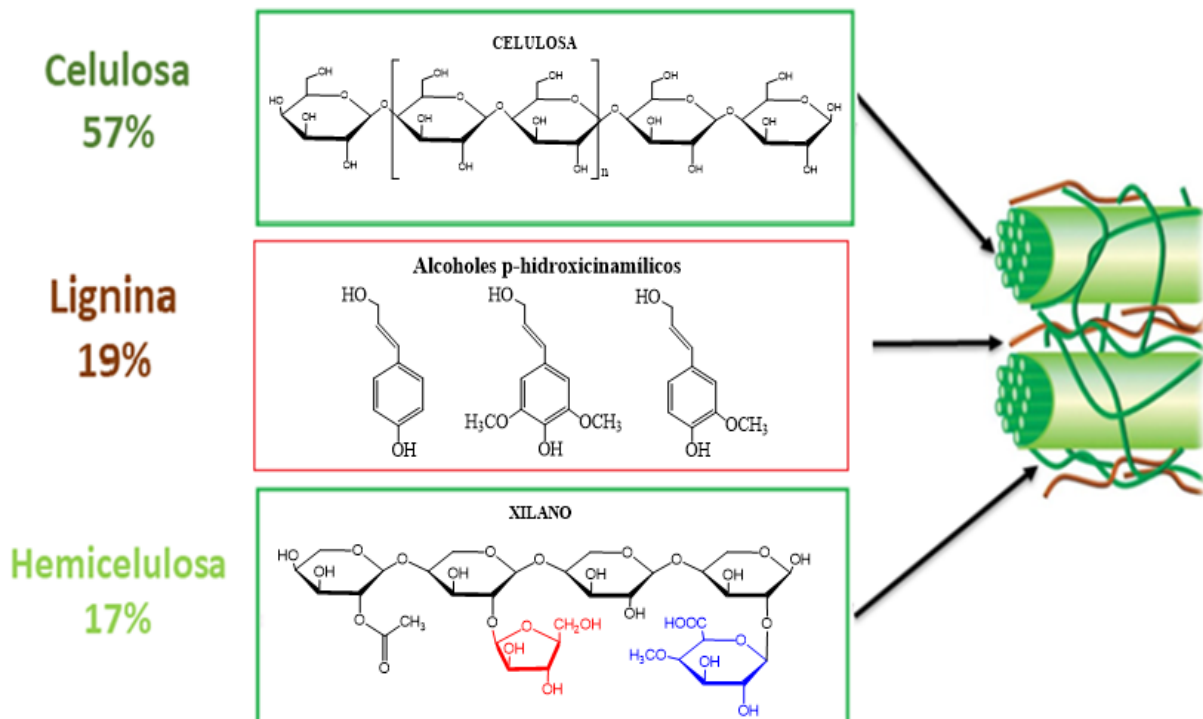
2. Marco Teórico

2.1. Hemicelulosa dentro de la biomasa lignocelulósica

Las células vegetales tienen paredes celulares compuestas por microfibrillas de celulosa, hemicelulosa, lignina, ácidos urónicos y otros monosacáridos (**Figura 1**) (Lodish, 2005). La pared celular juega un papel importante en el crecimiento celular, mantiene la presión osmótica interna de la célula y contribuye a mantener en la estructura de los organelos internos *e.g.* núcleo y cloroplastos.

Figura 1

Esquema de la composición general de la biomasa lignocelulósica



Nota: Adaptado de (Kalhor y Ghandi, 2019)

La hemicelulosa, es un heteropolisacárido altamente ramificado que puede estar compuesto de varios monosacáridos *e.g.* ramnosa, arabinosa, xilosa, glucosa, galactosa y ácidos urónicos. Estos monómeros están unidos por enlaces β -1,4-O-glucosídico y en algunas ocasiones sus grupos hidroxilo pueden estar parcialmente acetilados (grupos acetilo). La hemicelulosa representa en general del 15 al 35% de la biomasa vegetal (Gírio et al., 2010) y a diferencia de la celulosa es soluble en agua. La hemicelulosa se sintetiza en el aparato del Golgi dentro de la célula y luego se transporta a la superficie celular donde se autoensambla para formar una red entrecruzada. La hemicelulosa funciona como unión de las paredes celulares adyacentes (Lodish, 2005).

La hemicelulosa se puede clasificar en dos grupos: hemicelulosa neutra, constituida principalmente por pentosas -como xilosa y arabinosa-, y por hexosas -como glucosa y galactosa-; y hemicelulosa ácida, constituida por los mismos tipos de monómeros de azúcares, más ácido galacturónico y glucurónico (A. G. Hernandez, 2010).

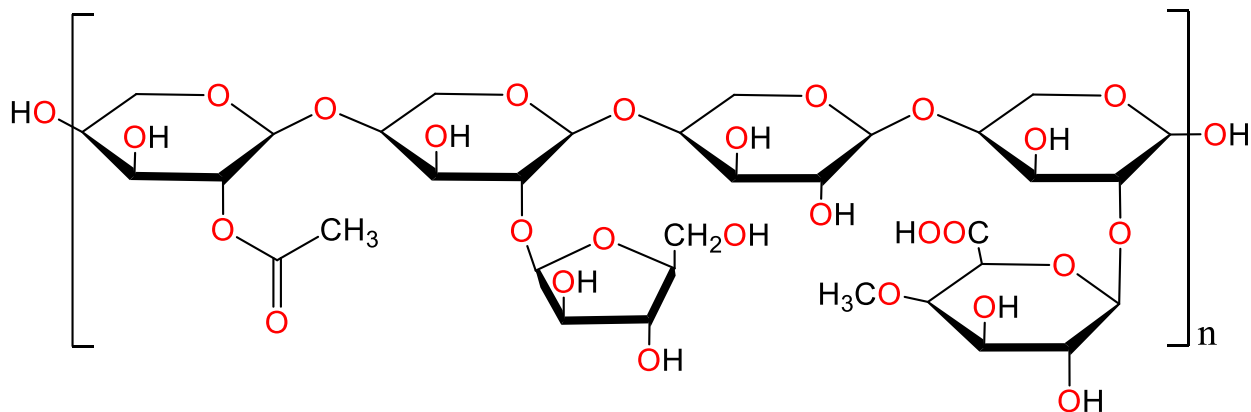
2.1.2. Xilano

El xilano, componente principal de la hemicelulosa (Rivas Siota, 2014), está presente en una amplia variedad residuos agroindustriales *e.g.* paja de trigo, cascara de coco, tallos de tabaco, bagazo de caña de azúcar (Samanta, Jayapal, Jayaram, et al., 2015). Se clasifica como un heteropolisacárido constituido por residuos de xilosa unidos por enlaces β -1,4-O-glucosídicos (Aachary y Prapulla, 2011). Las cadenas de xilano pueden presentar sustituyentes en la posición 2 o 3 del anillo, como grupos acetilo, ramnosa, ácidos urónicos -como el ácido D-glucurónico (AGlc) o el ácido 4-O-metil-D-glucurónico (AMeGlc), ambos con enlaces α -1,2-O-glucosídico- (**Figura 2**) (Arai et al., 2019; Samanta, Jayapal, Jayaram, et al., 2015). La concentración de hemicelulosa en biomasa vegetal depende de la fuente; por ejemplo, el bagazo de caña de azúcar contiene de 20 a 26% de hemicelulosa (Gírio et al., 2010), el café aprox. 39% (Ballesteros,

Teixeira, y Mussatto, 2014) y el raquis de palma de aceite 27.8% (Imman, Arnthong, Burapatana, Laosiripojana, y Champreda, 2013).

Figura 2

Estructura química general del xilano con sustituyentes acetilo (Ac), un monosacárido de arabinosa y ácido 4-O-metil-D-glucurónico (AMeGlc)



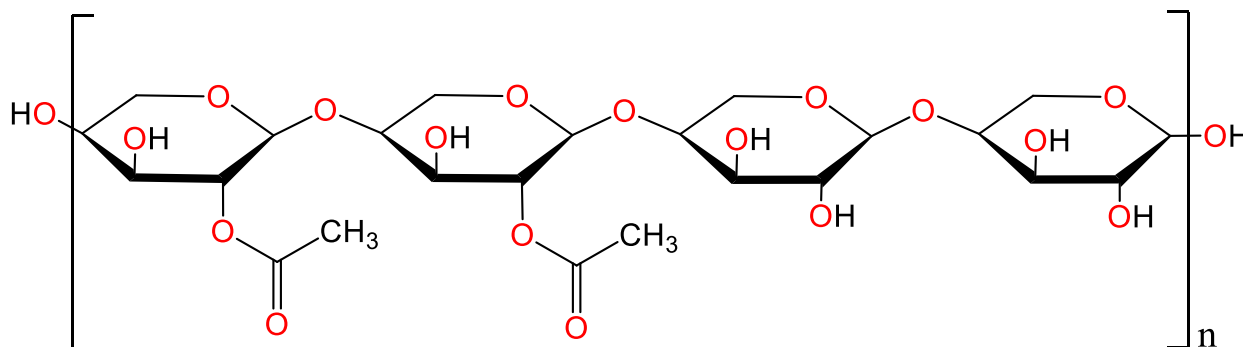
2.2. Definición de oligosacáridos y Xilo-oligosacáridos (XOs)

Los oligosacáridos son compuestos de bajo peso molecular, compuestos de dos hasta doce unidades de monosacáridos unidos por enlaces α o β O-glucosídicos. Estos compuestos son altamente solubles en agua, tienen actividad óptica y poseen un grupo hemiacetal libre conocido como extremo reductor (Peña Díaz, 2002). Según el grado de polimerización (GP) se conocen como disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos, etc. Ejemplos de oligosacáridos incluyen la sacarosa (2 monómeros, glucosa y fructosa), maltotriosa (3 monómeros de glucosa) y estaquiosa (4 monómeros constituidos por glucosa, fructosa y galactosa). La mayoría de los oligosacáridos existen naturalmente en las plantas o pueden obtenerse a través de métodos enzimáticos o hidrolíticos a partir de moléculas más grandes como los polisacáridos (Nabarlatz, Ebringerová, y Montané, 2007).

Los xilo-oligosacáridos (XOs), son oligómeros compuestos por monómeros de xilosa con enlaces β -(1-4) O-glucosídicos, (**Figura 3**), y su precursor principal es el xilano que es el principal componente en la hemicelulosa (Qing, Li, Kumar, y Wyman, 2013; Samanta, Jayapal, Jayaram, et al., 2015). Los XOs se clasifican en: XOs ácidos con sustituyentes como el ácido 4-O-metil-D-glucurónico (AMeGlc), y los XOs neutros que también pueden tener grupos acetilo (Ac) como sustituyentes en las posiciones 2 y/o 3 del anillo de xilosa (A. Reis, Domingues, Ferrer-Correia, y Coimbra, 2003; Ana Reis et al., 2005). Los XOs tienen fórmula general $C_{5n}H_{8n+2}O_{4n+1}$, donde n corresponde al número de unidades de xilosa. Los XOs son sólidos cristalinos a temperatura ambiente, y su color y estructura están relacionados con la fuente y el proceso de extracción utilizado (Samanta, Jayapal, Jayaram, et al., 2015). Dependiendo de su grado de polimerización, los XOs se conocen como xilobiosa (2 monómeros), xilotriosa (3 monómeros), xilotetrosa (4 monómeros) y así consecutivamente (Samanta et al., 2015).

Figura 3

Estructura química general de un XOs con grupos acetilo como sustituyentes en la posición 2 del anillo



Los XOs están presentes en miel, frutas, vegetales, bambú, bagazo de caña de azúcar, pergamino de café, y raquis de palma, entre otras fuentes vegetales (Kumar y Satyanarayana, 2011; Samanta, Jayapal, Jayaram, et al., 2015). Los XOs que actualmente se comercializan y que son utilizados como prebióticos, presentan un GP de dos a diez unidades de xilosa, este tipo de oligómeros no se descomponen en un rango de pH entre 2.5 y 8.0, lo que les permite transitar por el sistema digestivo (Carvalho, Neto, da Silva, y Pastore, 2013).

Actualmente la empresa NutriCology (EUA), productora de suplementos dietarios, comercializa XOs en polvo aislados de la mazorca de maíz. El producto se conoce como Restore-Biotic™, y tiene un costo de 19.61 dólares por 100 gramos de extracto con concentración de XOs del 70% (Nutricology, 2020).

El término prebiótico fue acuñado por los investigadores en microbiología y ciencias farmacéuticas Glenn R. Gibson y Marcel B. Roberfroid (Gibson y Roberfroid, 2008). Este término se popularizó y es aceptado entre las comunidades científicas en campos como la nutrición, microbiología, medicina y bioquímica, para explicar la interacción a nivel químico y biológico de estos compuestos con algunos tipos de bacterias presentes en la microbiota intestinal (Gibson y Roberfroid, 2008), (Quigley, 2018). Los prebióticos son hidratos de carbono de tamaño variable con GP entre 2 monómeros de un mismo monosacárido y hasta 12 unidades repetitivas, unidos a través de enlaces glucosídicos. Entre los prebióticos más conocidos se encuentran los xilo-oligosacáridos (XOs), fructo-oligosacáridos (FOs) y galacto-oligosacáridos (GOs), los cuales se fermentan por la acción de enzimas hidrolíticas producidas por bacterias presentes en el tracto gastrointestinal. Un compuesto prebiótico debe tener las siguientes características (A. G. Hernandez y Lopez, 2010), (Gibson y Roberfroid, 2008):

- 1) Resistir bajos niveles de pH en el estómago, la acción de enzimas digestivas y a la presencia de sales biliares
- 2) No ser absorbido directamente por el sistema gastrointestinal
- 3) Alcanzar el intestino grueso sin alteraciones en su estructura.

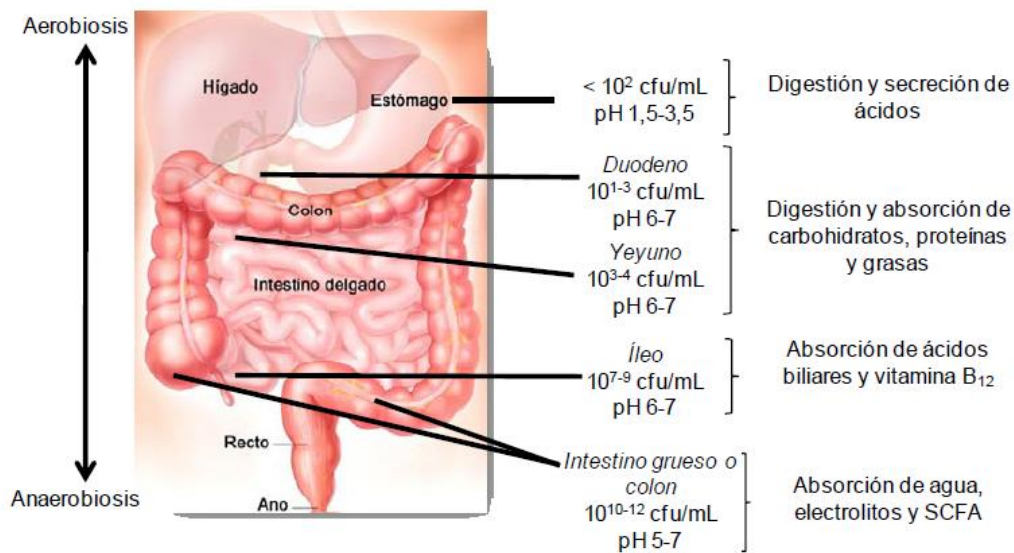
La microbiota intestinal está conformada por bacterias, hongos y en algunas ocasiones virus con sus respectivos fagos o depredadores (Derrien, Alvarez, 2019). En el tracto gastrointestinal humano se puede encontrar *ca.*, 10^{12} organismos por cada gramo de materia fecal (O. Hernandez, 2012). Los géneros de microbiota más comunes en el tracto gastrointestinal son: *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus* y *Clostridium*. Estos microorganismos están presentes en mayor concentración en el duodeno, yeyuno e íleon del intestino delgado, zona de mayor absorción de carbohidratos, proteínas y grasas. La concentración de microbiota se reporta en unidades formadoras de colonias (UFC), y su composición y abundancia varían dependiendo de la localización en el intestino como se observa en la **Figura 4** (O. Hernandez, 2012; Murray, Rosenthal, y Pfaller, 2006).

Las bacterias del tracto gastrointestinal que más se benefician por el consumo de prebióticos son el género de las *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Derrien et al., 2019; Kunz y Rudloff, 2006; Quigley, 2018). Estas cepas previenen la deshidratación por diarrea en niños, mejoran el tránsito lento del intestino grueso, suprimen la actividad de las bacterias patógenas y reducen la concentración de productos de fermentación tóxicos (Samanta, Jayapal, Jayaram, et al., 2015) (Derrien et al., 2019). Además, se ha reportado que también contribuyen con la disminución de

los síntomas de dermatitis atópica, entre otras enfermedades autoinmunes (Carvalho et al., 2013; Qiang, YongLie, y QianBing, 2009).

Figura 4

Zonas de digestión de distintos nutrientes en el tracto gastrointestinal, bajo condiciones aerobias y anaerobias



Nota: Adaptado de (O. Hernandez, 2012)

2.3. Xilo-oligosacáridos y su aplicación como prebióticos

Los Xilo-oligosacáridos (XOs), como oligosacáridos funcionales, también actúan y sirven como alimento para las mismas especies de bacterias (*Bifidobacterias* y *Lactobacilos*) presentes en el intestino grueso (Aachary y Prapulla, 2011). Algunos autores han reportado que los XOs pueden tener un efecto positivo en pacientes con insuficiencia de insulina, siendo utilizados para reemplazar la sacarosa en los alimentos y aliviar los síntomas de enfermedades como la diabetes, el estrés, entre otras (Aachary y Prapulla, 2011), (Samanta et al., 2015). Entre los efectos positivos

del consumo de XO_s se encuentran el aumento del peso fecal, la absorción de minerales, la estimulación inmunológica y la disminución del pH del colon, *i.e.*, una mejoría de las funciones del colon y del metabolismo (Nabarlatz et al., 2007),(Samanta, Jayapal, Jayaram, et al., 2015). Este tipo de oligosacáridos tienen características hipolipémicas, *i.e.*, disminuyen los niveles de lípidos en sangre. Además, algunos reportes indican que los XO_s con ramificaciones de ácido glucurónico tienen actividad reguladora del crecimiento animal y actividad antimicrobiana (Aachary y Prapulla, 2011; Qiang et al., 2009).

2.4. Métodos de extracción de Xilo-oligosacáridos (XO_s) a partir de biomasa residual

Figura 5

Esquema general de la ruta de extracción de los XO_s, a partir de dos metodologías diferentes: autohidrólisis y extracción alcalina



Nota: *Adaptado de (Samanta, Jayapal, Jayaram, et al., 2015)*

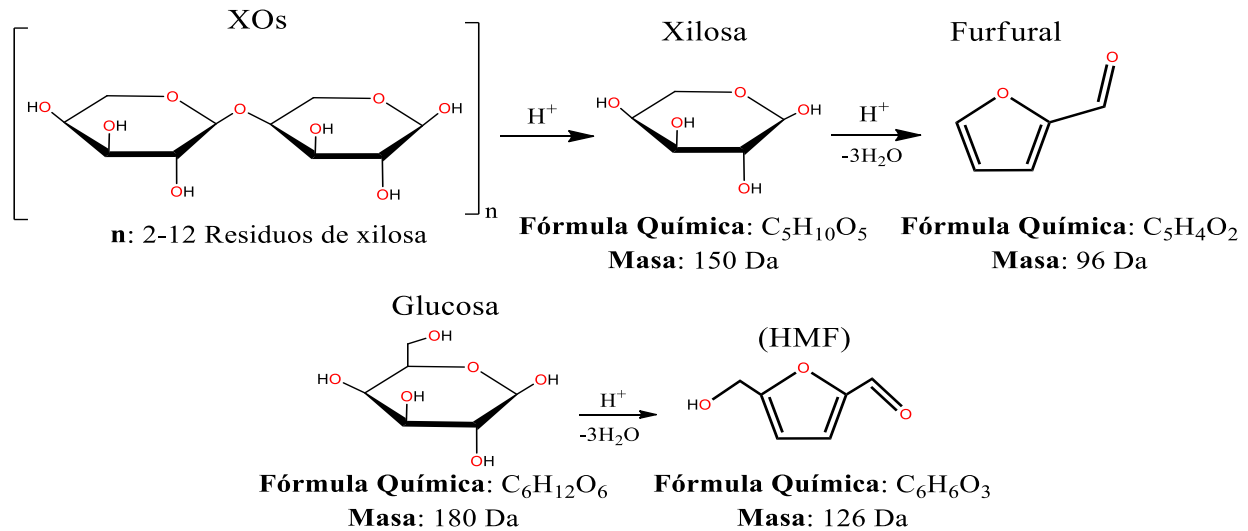
En la **Figura 5** se muestra el esquema general para la extracción de los XOs obtenidos a partir de biomasa residual. La composición y la estructura de los XOs está relacionada con la fuente de material vegetal del cual provienen y del proceso de extracción empleado (Samanta, Jayapal, Jayaram, et al., 2015). Los procesos utilizados para aislar XOs a partir de materiales ricos en hemicelulosa son esencialmente hidrolíticos, *e.g.*, medios básicos, ácidos o métodos térmicos - autohidrólisis- (**Figura 5**) (Akpinar, Erdogan, y Bostanci, 2009; Nabarlatz et al., 2007). En las secciones siguientes se hará énfasis en los métodos en medio básico y el método de autohidrólisis.

2.4.1. Autohidrólisis como método hidrotérmico para obtener XOs a partir de biomasa residual

La autohidrólisis es una degradación hidrolítica directa, sin la adición de catalizadores químicos, del residuo de biomasa vegetal. Mediante este método es posible depolimerizar la hemicelulosa presente en la pared celular de las plantas, fraccionándola a cadenas más cortas de xilano, y finalmente obtener XOs con grados de polimerización (GP) entre de 2-20 unidades de xilosa (Santos Meneses, 2018). Durante la autohidrólisis, además de obtener las cadenas de xilo-oligosacáridos, se pueden obtener productos secundarios no deseados como monosacáridos de xilosa y productos de degradación de pentosas y hexosas (**Figura 6**) *e.g.* furfural y hidroximetilfurfural (HMF) respectivamente (Nabarlatz et al., 2007). Estos productos de degradación a su vez se pueden convertir en ácidos bajo condiciones más severas *e.g.* Furfural-ácido fórmico y HMF-ácido fórmico y ácido levulinico (Rivas Siota, 2014; Santos Meneses, 2018).

Figura 6

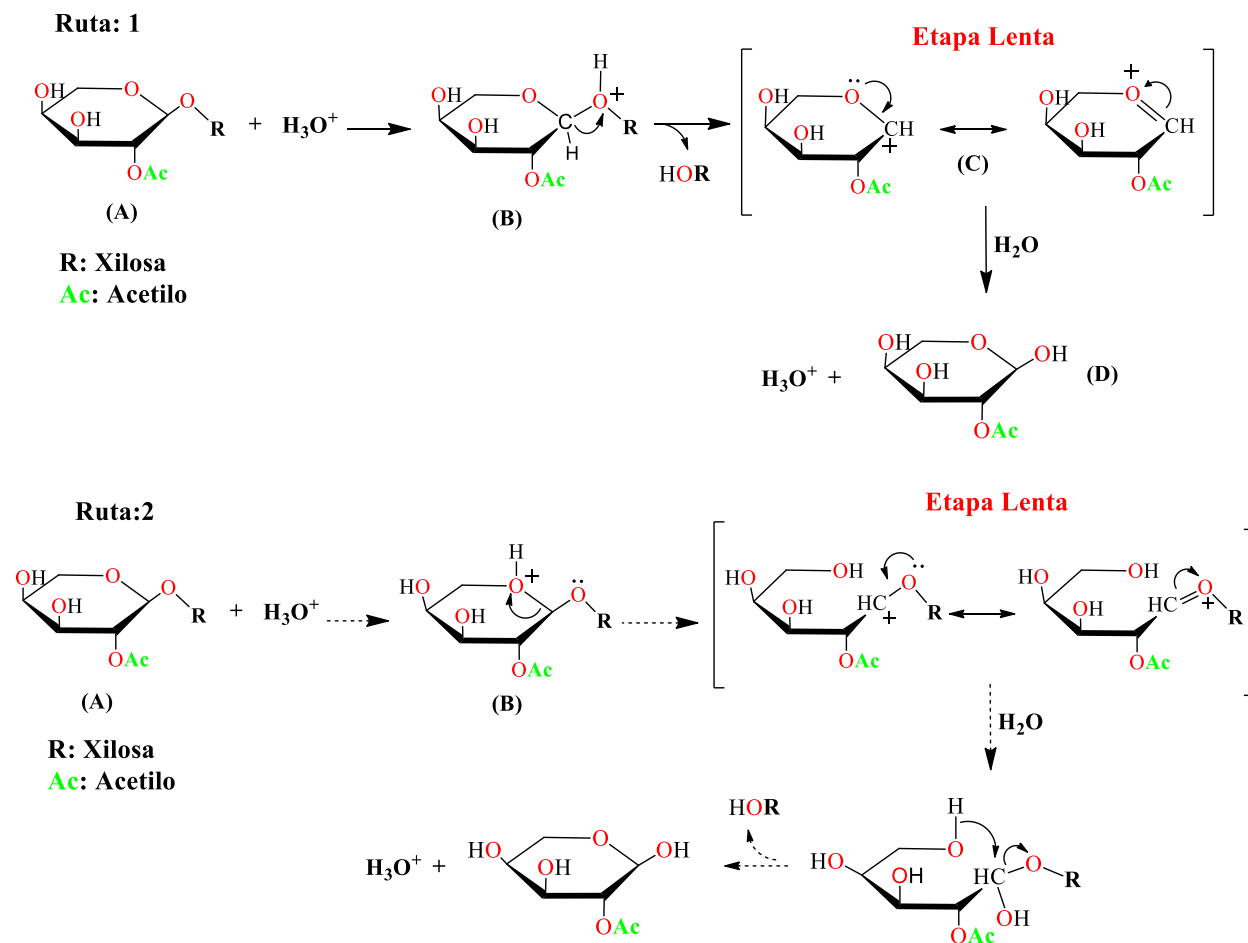
Esquema general de la reacción de degradación en medio ácido para los XO_s donde se obtiene xilosa , furfural y HMF como productos secundarios



El proceso de autohidrólisis no afecta significativamente la celulosa ni la lignina presentes en la biomasa, que pueden ser recuperadas más adelante. Las variables que se pueden modificar durante el proceso de autohidrólisis son la temperatura, el tiempo y la relación biomasa/solvente (Guerrero Serrano, 2018; Nabarlatz et al., 2007). En el método de autohidrólisis, el sistema en medio acuoso se somete a rampas de temperatura mediante las cuales es posible la autoionización de moléculas de agua, generando iones hidronio (H₃O⁺) que causan la despolimerización de la hemicelulosa a xilo-oligómeros. La escisión adicional de los grupos acetilo que hacen parte de la estructura molecular de la hemicelulosa en ácidos acéticos, también contribuye a la disminución del pH del sistema, agrega iones hidronio (H₃O⁺) a la mezcla y mejora el rendimiento de la obtención de xilo-oligosacáridos (Gil Garrote, Domínguez, y Parajó, 2002; Samanta, Jayapal, Jayaram, et al., 2015). El mecanismo de reacción de la autohidrólisis catalizada por iones hidronio (H₃O⁺) puede ocurrir por dos posibles rutas tal y como se muestra en la **Figura 7**.

Figura 7

Mecanismo de reacción de la autohidrólisis catalizada por ácido (H_3O^+). Las flechas continuas indican el mecanismo de reacción dominante



Nota: *Adaptado de (Heinonen y Sainio, 2013)*

En la ruta 1, la reacción empieza con la interacción rápida de los iones hidronio con el átomo de oxígeno glucosídico que une dos residuos de monosacáridos (A) para formar un ácido conjugado (B). Posteriormente, ocurre la escisión del enlace glucosídico- C-O-R, liberando al medio un monómero de xilosa y formándose a su vez un ion carbonio a partir de la otra mitad del ácido conjugado. En la etapa lenta de la reacción, el ion carbonio se estabiliza por resonancia (C).

Luego una molécula de agua del medio reacciona con el ion carbonio y regenera la otra mitad del monosacárido (D). Finalmente se recupera de nuevo al medio el catalizador ácido (ion hidronio) (Heinonen y Sainio, 2013). El paso determinante de la velocidad de reacción es la pérdida de la molécula HOR y la formación del ion carbonio (Heinonen y Sainio, 2013).

2.4.2. Hidrólisis en medio alcalino como método para obtener XOs a partir de biomasa residual

En el proceso de hidrólisis en medio básico, típicamente se utilizan bases diluidas *e.g.* hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH), hidróxido de litio (LiOH), hidróxido de bario ($\text{Ba}(\text{OH})_2$), hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) y/o hidróxido de amonio (NH_4OH). Según los reportes de la literatura, los tratamientos con hidróxido de sodio (NaOH) e hidróxido de potasio (KOH) resultan en mejores rendimientos de XOs. Al someter el material a medio alcalino, además de la hidrólisis de la hemicelulosa, se hidroliza parcialmente la lignina presente y la celulosa disminuye su grado de cristalinidad (Rivas Siota, 2014). Este proceso es útil para la separación de hemicelulosa desacetilada, debido a que se solubiliza en medio básico y conduce a la saponificación de ésteres (urónicos y acéticos). El proceso de hidrólisis en medio básico, no requiere temperaturas altas comparado el proceso de hidrólisis en medio ácido o la autohidrólisis, la cual genera un cantidad mayor de compuestos indeseados, productos de la degradación de los azúcares, como aldehídos derivados de furfural (Morales, 2015).

2.5. Procesos de purificación de xilooligosacáridos

Los procesos de extracción de los XOs, en especial los procesos hidrotérmicos como la autohidrólisis, generan subproductos secundarios en el medio de reacción como el furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético, ácido fórmico, ácido levulinico, compuestos fenólicos derivados de lignina, esteroides y ácidos grasos. (Acosta et al., 2018; Santos Meneses, 2018). Para

la producción de XO_s grado comercial es necesario someter los hidrolizados a procesos de purificación que pueden involucrar fenómenos físicos como la adsorción sobre carbón activado, o químicos como el intercambio iónico con resinas. El uso de estos procesos resulta en XO_s con purezas de 75 a 95% (Moure, Gullón, Domínguez, y Parajó, 2006). En el caso particular de XO_s obtenidos a partir de residuos de palma de aceite, los subproductos indeseados incluyen la xilosa, furfural, ácido acético y HMF (Acosta et al., 2018). Además, de ácido levulínico y ácido fórmico procedentes de la reacción en medio ácido del furfural y HMF, respectivamente (Ho et al., 2014).

2.5.1. Purificación con carbón activado

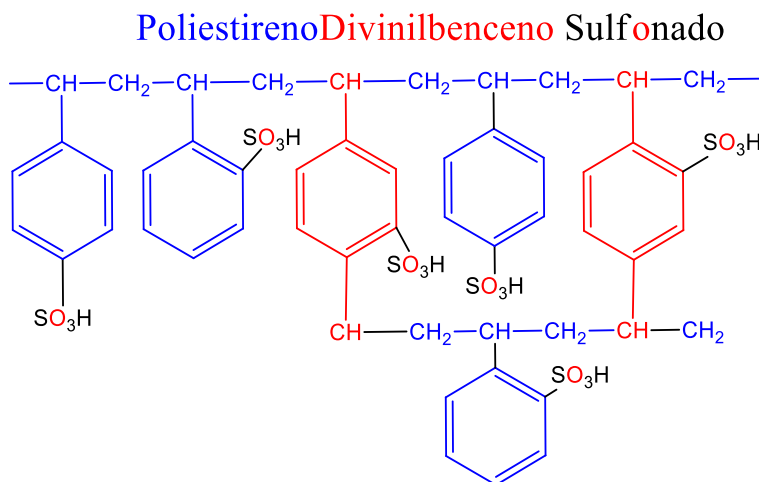
El carbón activado es un producto derivado de una variedad de materiales carbonosos *e.g.* madera, turba y cascaras de coco lignocelulósicos (Manahan, 2007). Se denomina activado debido a que es sometido a oxidación con ácido nítrico, lo cual permite la introducción de grupos funcionales con oxígeno y nitrógeno (*e.g.*, carbonilos, fenoles, quinonas y grupos nitro) útiles para adsorber ciertas sustancias dentro de los poros del material. (Mescua, 2016). Es muy útil para eliminar compuestos indeseados de matrices biológicas como los hidrolizados de XO_s. El carbón activado permite la adsorción de especies presentes en solución acuosa mediante interacciones hidrofóbicas. En extractos de XO_s, el carbón activado es útil para eliminar derivados coloreados provenientes de la descomposición de pentosas y hexosas como el furfural y el HMF y derivados fenólicos de la lignina (Guerrero Serrano, 2018; Rivas Siota, 2014). Un estudio realizado a extractos de XO_s obtenidos a partir de cáscaras de almendras reportó adsorción selectiva de productos residuales fenólicos (asociados con lignina) con relación a XO_s. Además, los autores reportaron que la mayor eficiencia se obtuvo con el carbón activado más microporoso y de diámetros más pequeños (Aachary y Prapulla, 2011).

2.5.2. Resinas de intercambio iónico

Las resinas de intercambio iónico consisten principalmente de una matriz polimérica distribuida de manera uniforme, con sitios activos de intercambio o grupos funcionales *e.g.*, fenol, formaldehidos, animas y ácidos sulfónicos. Estos materiales son útiles para realizar procesos de sustitución, separación y remoción mediante interacciones electrostáticas. Los iones intercambiables en estos grupos funcionales se reemplazan por iones de la misma carga que están dispersos en solución (Mescua, 2016). Generalmente estas resinas son comercializadas como sólidos y esféricos con tamaños que oscilan entre los 0,2 hasta 1,2 mm de diámetro.

Figura 8

Estructura del polímero sulfonado de poliestireno-divinilbenceno en una resina de tipo catiónica fuerte, donde el H⁺ del grupo sulfónico SO₃H es el ion intercambiable



El material compuesto por estireno y divinilbenceno sulfonado (**Figura 8**), es una resina de intercambio ácido fuerte debido al grupo sulfónico que es muy utilizada para intercambio catiónico. Dependiendo del grado de reticulación y del proceso de polimerización, se pueden obtener dos tipos de estructuras porosas: matrices de copolímero PS/DVB, del tipo de gel; y

matrices de copolímero PS/DVB, del tipo macroporoso. Estas resinas pueden utilizarse en diversas aplicaciones *e.g.* ablandamiento de agua, biorremediación, separación cromatográfica y como catalizadores por excelencia para un sin número de reacciones químicas (Sánchez Montoya, 2013). Además, estas resinas tienen un grado de polimerización funcional, el cual permite que, al estar en contacto con agua o soluciones salinas, que sus grupos ácidos o básicos se ionicen formando una matriz sólida cargada, con difusión de iones en el medio.

Una de las ventajas de usar resinas de intercambio iónico comparadas con carbón activado, es la posibilidad de cambiar la composición iónica de la disolución sin introducir sustancias indeseadas (Rivas Siota, 2014). Estas resinas se han utilizado para purificar hidrolizados del XO_s obtenidos a partir de residuos agroindustriales como el pergamino de café y el bagazo de caña de azúcar (Guerrero Serrano, 2018) para la eliminación de compuestos orgánicos fenólicos (productos de descomposición de la lignina), como también para retirar residuos de furfural remanente sin afectar a los XO_s de bajo peso molecular. Otros estudios han demostrado que por medio de resinas de intercambio iónico ha sido posible purificar hidrolizados de XO_s aislados de la tusa del maíz. Además, los autores mencionan que este procedimiento de purificación puede ser escalado a una planta piloto (Yuan, Zhang, Qian, y Yang, 2004).

2.6. Caracterización de xilo-oligosacáridos

Los métodos de caracterización de oligosacáridos permiten conocer tanto su concentración como su estructura molecular, además son fundamentales para establecer la efectividad de los procedimientos de purificación. Una de las técnicas analíticas más utilizadas en los últimos años para la caracterización de XO_s, es la resonancia magnética nuclear (RMN). Utilizando RMN bidimensional (2D *HSQC*), se ha determinado la estructura de XO_s provenientes de residuos

agroindustriales (Nabarlatz et al., 2007), así como la determinación de la posición y el tipo de enlace glucosídico (Blundell, Reed, Overduin, y Almond, 2006).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es un método muy eficiente de separación que se ha reportado para el análisis de XO_s y en la determinación de la distribución de peso molecular. HPLC también se ha utilizado para el análisis cuantitativo de compuestos indeseados como el ácido acético, monosacáridos, furfural e hidroximetilfurfural (HMF). Las condiciones experimentales que generalmente usan en HPLC son una fase móvil compuesta por 70/30 ACN/H₂O (v/v), flujo de 1,2 mL/min a 30 °C, con detectores de índice de refracción (RID) y UV-vis conectados en serie. Se realizan curvas de calibración con estándares certificados de xilosa, arabinosa y furfural (Guerrero Serrano, 2018; Nabarlatz et al., 2007).

La electroforesis de carbohidratos también ha sido utilizada para el análisis de XO_s obtenidos a partir de diferentes tipos de levaduras en la industria cervecera, y evaluar su degradación (Szilágyi, Vecseri, Kiss, Hajba, y Guttman, 2018). También se ha reportado el uso de electroforesis capilar para el análisis de oligosacáridos en la leche de distintos orígenes animales, confirmando una alta variabilidad de especies de oligosacáridos, especialmente sobre la leche de algunos mamíferos como la yegua (Monti, Cattaneo, Orlandi, y Curadi, 2015).

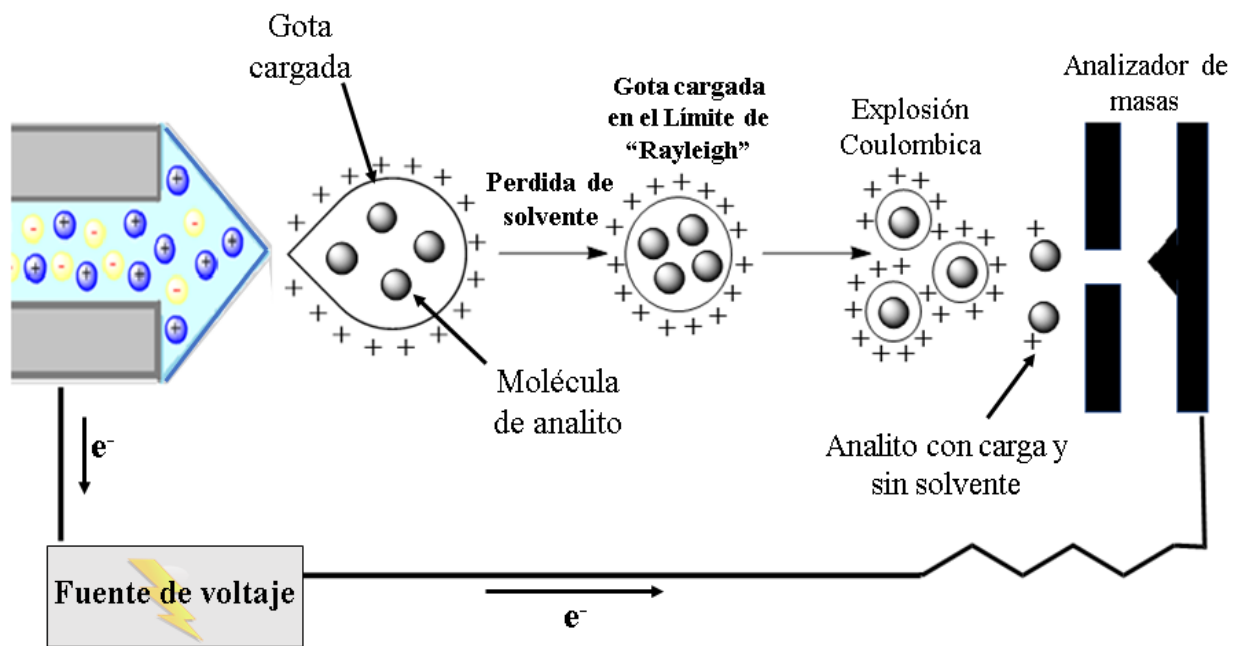
2.7. Espectrometría de masas ESI

La ionización por electronebulización (*Electrospray Ionization*, ESI) es una técnica de ionización suave que inicialmente fue descrita en el año de 1984 por el químico John B. Fenn de la *Virginia Commonwealth University*. En el 2002 el profesor Fenn recibió parte del premio Nobel de Química por el desarrollo de ESI. Esta técnica se convirtió rápidamente en una de las estrategias más utilizadas para el análisis de biomoléculas, como oligosacáridos, proteínas, polímeros

sintéticos, compuestos inorgánicos y polipéptidos con masas moleculares que rondan los 10^5 Da (Skoog, West M, 2005). El proceso de formación de iones en ESI (**Figura 9**) sucede a condiciones normales de presión y temperatura, inicialmente la mezcla analito-solvente se bombea a través de una aguja capilar de acero inoxidable a la que se le aplica una diferencia de potencial del orden 3-6 kV (Gross, 2017).

Figura 9

Proceso de ionización en modo positivo por electronebulización (ESI)



Debido al intenso gradiente de campo eléctrico entre la aguja y un contraelectrodo, la muestra sale del capilar en forma de aerosol como pequeñas gotas cargadas que sufren desolvatación por acción de una contracorriente de N_2 caliente (Esteban, 1993). Como consecuencia de la evaporación del solvente las gotas disminuyen su volumen al mismo tiempo que aumentan su densidad de carga superficial. En el punto donde la repulsión de cargas en la gota supera la tensión superficial del solvente, llamado límite de Rayleigh (máximo número de carga que puede soportar

una determinada superficie de gota), la gota se fisiona (explosión Coulombica) produciendo gotas más pequeñas (Cole, 1997). El proceso se repite hasta que el solvente se elimina y entonces sólo quedará una molécula del analito con múltiples cargas (Hoffmann y Stroobant, 2002).

Una de las características principales en espectrometría de masas de los polímeros sintéticos o de origen natural, es que su espectro de masas se verá siempre reflejado por una secuencia específica similar a una distribución Gaussiana o campana de Gauss (Montaudo, Samperi, y Montaudo, 2006). Los XO_s son mezclas de oligómeros, por lo tanto, no presentan un solo peso molecular sino una distribución de pesos moleculares (*MWD*) que depende de la composición de la mezcla. Para el caso de oligómeros como los XO_s, la distribución de masas presenta señales separadas por 132 Da como consecuencia del aumento de un residuo de xilosa de masa 150 Da que ha perdido un molécula neutra de agua por la formación del enlace β 1-4 glucosídico (Kailemia, Ruhaak, Lebrilla, y Amster, 2014; A. Reis et al., 2003; Ana Reis et al., 2005).

Como consecuencia de la distribución de pesos moleculares típica de una mezcla de polímeros la caracterización de los XO_s se hace mediante el cálculo de pesos moleculares promedio. Estos promedios corresponden al peso molecular promedio en número (M_n), y al peso molecular promedio en peso (M_w), que se determinan mediante las siguientes ecuaciones:

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}, \quad M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

Donde M_i es el peso molecular de una cadena de polímero y N_i es el número de cadenas con la misma masa molecular (Crompton, 2006; Montaudo et al., 2006). El peso molecular promedio en número (M_n) no es más que la suma del peso molecular de todos los polímeros, dividido por el número total de polímeros presentes en la muestra, similar a un promedio estadístico. Mientras que el peso molecular promedio en peso (M_w) se basa en que una sola cadena de polímero contiene

más de la masa total promedio presente en el espectro. Los pesos moleculares promedio se pueden relacionar entre sí para explicar que tan ancho o que tan estrecho es la distribución de peso molecular (*MWD*) y de esta manera explicar su polidispersidad (PD) mediante la siguiente ecuación:

$$PD = \frac{M_w}{M_n}$$

La polidispersidad, muestra la amplitud o la diferenciación que se presenta por los pesos moleculares y la amplitud de las distintas cadenas de una muestra de polímero. EL valor de la polidispersidad es siempre \geq a 1. cuando es exactamente 1 todas las cadenas del polímero son iguales, ningún polímero tiene polidispersidad de 1, siempre es mayor que 1.

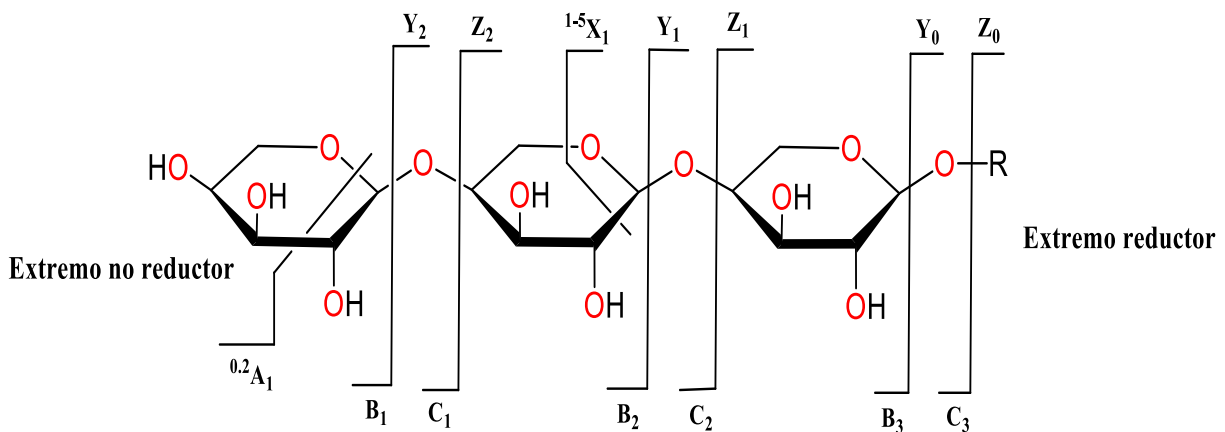
2.7.1. Caracterización de xilo-oligosacáridos mediante espectrometría de masas tándem en tiempo

El analizador de trampa iónica cuadrupolar (QIT) permite la fragmentación de iones mediante el proceso de Disociación Inducida por Colisiones (CID, por sus siglas en inglés). En una QIT es posible seleccionar, aislar y posteriormente fragmentar un ión por colisiones con el gas buffer que está presente siempre en la trampa (He). La energía cinética del ión seleccionado se incrementa mediante la aplicación de una radiofrecuencia de excitación que coincide con su frecuencia secular de oscilación. De esta forma es posible inducir colisiones con el He en las cuales parte de la energía cinética del ión excitado se convierte en energía interna suficiente para causar fragmentación (Cole, 1997; Esteban, 1993; Gross, 2017).

En el caso de los oligosacáridos, la fragmentación produce fragmentos característicos acuerdo con el siguiente diagrama de fragmentación desarrollado por Domon B y Costello C E. (**Figura 10**).

Figura 10

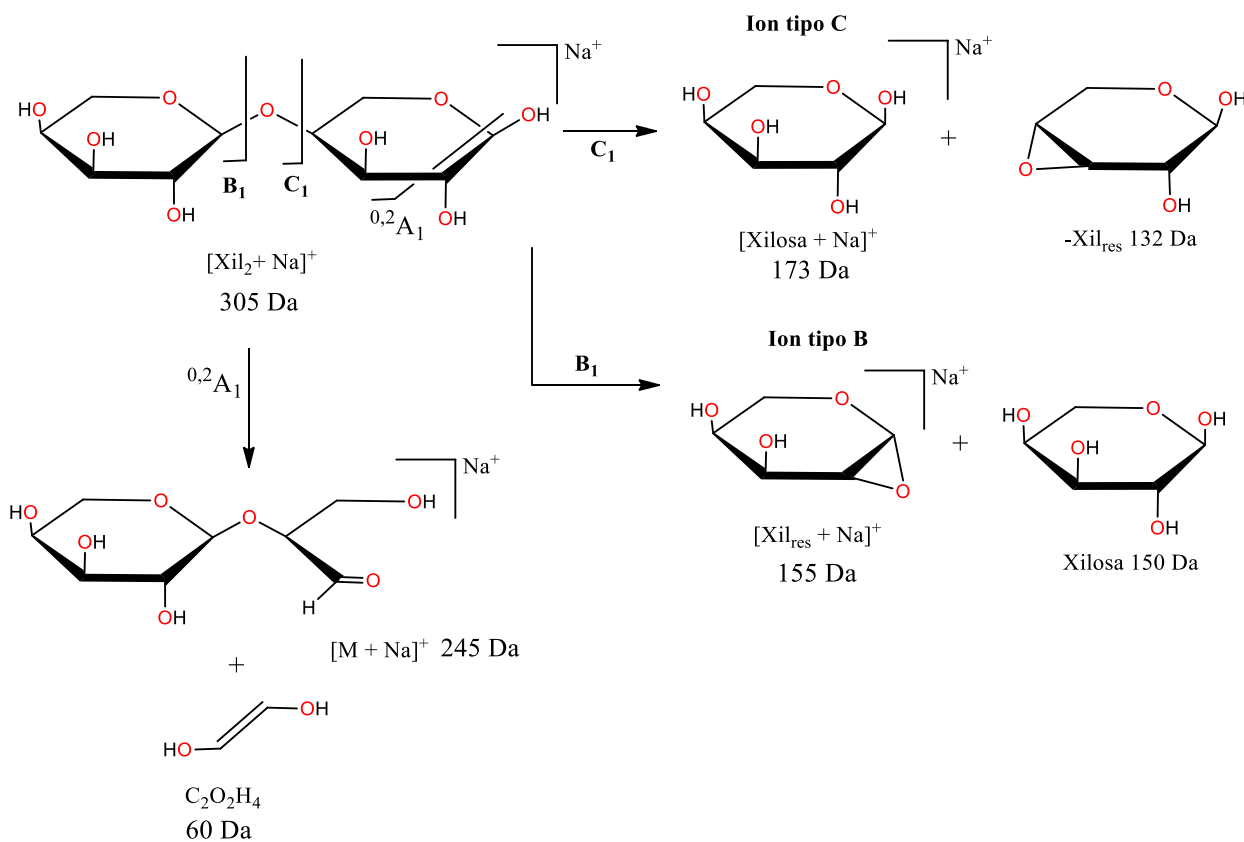
Nomenclatura propuesta por Domon y Costello para caracterizar las fragmentaciones en oligosacáridos



Cuando ocurre fragmentación a través del enlace glucosídico, se etiqueta el fragmento producido con el extremo no reductor con las tres primeras letras del alfabeto en mayúscula (A,B,C) y aquellos fragmentos con el extremo reductor del oligosacárido son etiquetados con la tres últimas letras del alfabeto (X,Y,Z), además, los subíndices indican cuantos monosacáridos hay presentes en el fragmento (**Figura 10**). Los iones etiquetados con las letras A y X revelan que hubo fragmentación a través del anillo, el superíndice indica el número del enlace que se fragmenta en el anillo y se cuenta en el sentido de las agujas del reloj. Los iones producidos a partir de la división de residuos sucesivos están etiquetados como A_m , B_m , C_m , con $m=1$ para el extremo no reductor; y X_n , Y_n , y Z_n , con $n=1$ para el residuo del extremo reductor (Gross, 2017; Zaia, 2004).

Figura 11

Tres posibles rutas de fragmentación de xilo-oligosacáridos observados en el espectro de masas como aductos de sodio $[M+Na]^+$



Nota: Adaptado de (Zaia, 2004)

Estudios previos sobre la fragmentación de especies ácidas de XO_s muestran una pérdida característica de 190 Da correspondiente a un residuo neutro de ácido 4-O-metil-D-glucurónico (AMeGlc) (Ana Reis et al., 2002, 2005). Según la nomenclatura propuesta por Domon y Costello, para la fragmentación de carbohidratos (**Figura 10**), las especies de xilo-oligosacáridos neutros, ácidos, y acetilados exhiben rutas características de fragmentación a través del anillo y del enlace glucosídico (**Figura 11**) (Zaia, 2004).

La fragmentación a través del anillo y del enlace glucosídico es típica para XOs, con pérdidas predominantes de residuos neutros de xilosa en el extremo no reductor ($-\text{Xil}_{\text{res}}$) 132 Da (para producir un ion tipo Y o C), mientras que la pérdida en el extremo reductor corresponde a molécula neutra de xilosa con una masa de 150 Da (para producir un ion tipo B o Z). En el caso de las fragmentaciones de los anillos de xilosa, la más común es entre los carbonos C_2 y C_3 del anillo, lo que puede generar la pérdida de una molécula neutra con una masa de 60 Da (para producir un ion tipo A), con posible fórmula molecular $\text{C}_2\text{O}_2\text{H}_4$.

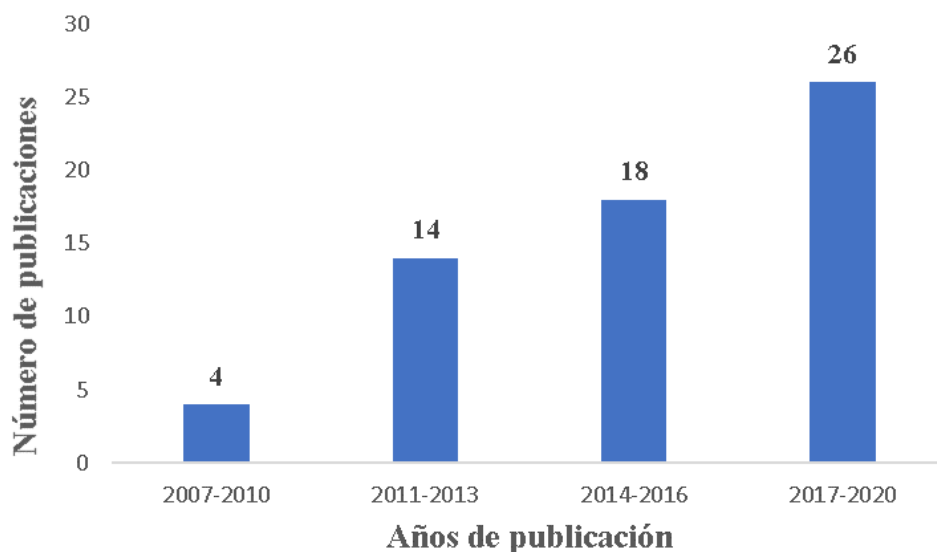
3. Antecedentes

En la **Figura 12** se presenta un diagrama de barras con el número de artículos científicos que se han publicado en los últimos trece años relacionados con la caracterización de xilo-oligosacáridos obtenidos a partir de distintas fuentes residuales agrícolas. Se utilizó la base de datos *Scopus (Elsevier)* con periodo de búsqueda desde el 2007 hasta el 2020, y ecuación de búsqueda TITLE-ABS-KEY (“*Characterization, XOs, Mass Spectrometry, Purification*”).

En el periodo de análisis (**Figura 12**) se han publicado un total de 62 artículos científicos sobre la caracterización de xilo-oligosacáridos extraídos de diferentes fuentes lignocelulósicas y su potencial uso como aditivos prebióticos (Qiang et al., 2009; Samanta, Jayapal, Kolte, et al., 2015). No obstante, no se encontraron resultados relacionados con rutas específicas de purificación que inicien desde el hidrolizado original, eliminación de productos secundarios como el furfural, HMF y otros monosacáridos, hasta llegar al producto grado comercial.

Figura 12

Publicaciones científicas en el periodo 2007-2020. Fecha de búsqueda: 20 Junio de 2020. Fuente: Scopus (Elsevier). Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“Characterization, XOs, Mass Spectrometry, Purification”)



Los artículos analizados presentan información sobre la extracción y caracterización de xilooligosacáridos de diferentes fuentes residuales mediante el proceso de autohidrólisis *e.g.* mazorcas de maíz, cáscaras de almendras, semillas de olivo, cáscara de arroz, paja de trigo, paja de cebada, bagazo de caña de azúcar y raquis de palma. Los estudios concluyen que todos estos residuos lignocelulósicos poseen XOs ácidos con sustituyentes de tipo ácido 4-O-metil-D-glucourónico en el hidrolizado inicial (Acosta et al., 2018; Nabarlatz et al., 2007). Otros artículos tratan sobre los métodos de purificación de los XOs *e.g.* carbón activado, cromatografía de permeación de gel (GPC), procesos de filtración de membrana, y extracción y separación por medio de solventes (Aachary y Prapulla, 2011). Se reportan buenos resultados del carbón activado como adsorbente para retirar compuestos secundarios como furfural e hidroximetilfurfural (Xu et

al., 2019), pero se menciona la necesidad de usar rutas más complejas de purificación para obtener XOs comercializables.

Se han utilizado diversas técnicas analíticas para la caracterización química de XOs como resonancia magnética nuclear (RMN), Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Por ejemplo, se reporta el uso de la técnica de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) para el análisis de XOs puros extraídos en residuos de mazorca de maíz (Pu, Zhao, Wang, Xiao, y Zhao, 2016). Por otra parte, la espectrometría de masas con fuente de ionización *electrospray* (ESI-MS) ha sido reportada como una herramienta útil para la caracterización de oligómeros (MWD, Mn, Mw, GP) y el estudio de su estructura utilizando pruebas tándem (*MS/MS*) (Quéméner et al., 2015). La resonancia magnética nuclear (RMN) también es útil para la determinación estructural y ubicación de algunos sustituyentes como grupos acetilo, ácidos urónicos, otros monosacáridos, para establecer el tipo de enlace O-glucosídico y la presencia de isómeros como los arabinoxilanos (Chemin et al., 2015; Nabarlatz et al., 2007)

4. Metodología

La metodología experimental involucra el establecimiento de condiciones adecuadas para el análisis de xilo-oligosacáridos por espectrometría de masas ESI-QIT, utilizando xilano y bagazo de caña de azúcar como compuestos de referencia. Una vez establecidas las condiciones de análisis se utiliza la técnica ESI-QIT como estrategia de seguimiento del proceso de purificación de un extracto crudo de XOs extraído de muestras de raquis de palma de aceite.

4.1. Muestras

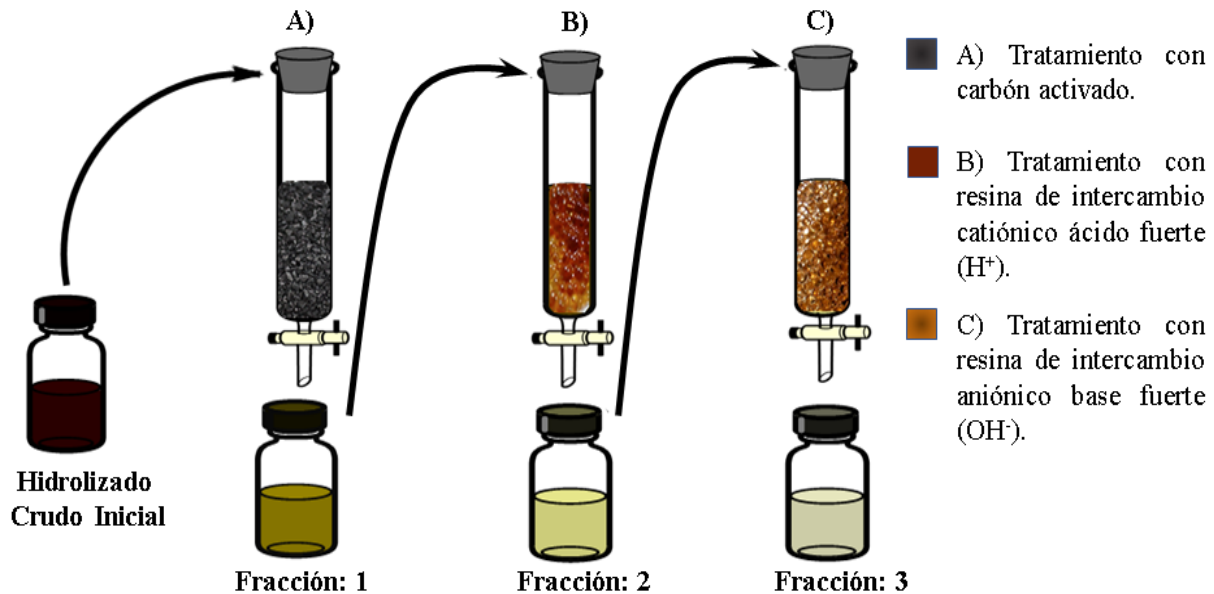
Las muestras y los estándares que se utilizaron para el desarrollo de este proyecto de investigación fueron entregados por el Grupo de Investigación en Tecnologías de Valoración de Residuos y Fuentes Agrícolas e Industriales para la Sustentabilidad Energética – (INTERFASE), dirigido por la Dra. Debora Nabarlatz, que hace parte de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander.

Las muestras fueron divididas en 2 grupos: 1), el hidrolizado crudo inicial, que proviene de la autohidrólisis de cada una de las fuentes de la biomasa residual de palma africana (raquis) y bagazo de caña de azúcar; y 2), tres fracciones, productos de la ruta de purificación realizada a la muestra de hidrolizado inicial de raquis de palma mediante; a), carbón activado; b), resina de intercambio aniónico base fuerte (OH^-); y c), resina de intercambio catiónico ácido fuerte (H^+) liofilizada. Adicionalmente, se utilizó el estándar de xilano derivado de la mazorca de maíz al 90% de pureza (*Biosynth Carbosynth*) como puesto de referencia.

El grupo INTERFASE obtuvo el hidrolizado crudo inicial de raquis de palma y bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento hidrotérmico (autohidrólisis), en un reactor Parr serie 4848 de acero inoxidable de 50 mL. Las muestras se mezclaron en agua destilada en una relación sólido/líquido de 1:8 (p/v) con una cantidad de 3,75 g de biomasa a una temperatura de 180 °C con un tiempo de reacción de 45 minutos. Luego de finalizada la reacción el reactor se enfrió rápidamente y el sobrenadante (hidrolizado inicial) y la fase sólida (celulosa y lignina) se separaron por filtración (papel filtro franja azul) (Acosta et al., 2018).

Figura 13

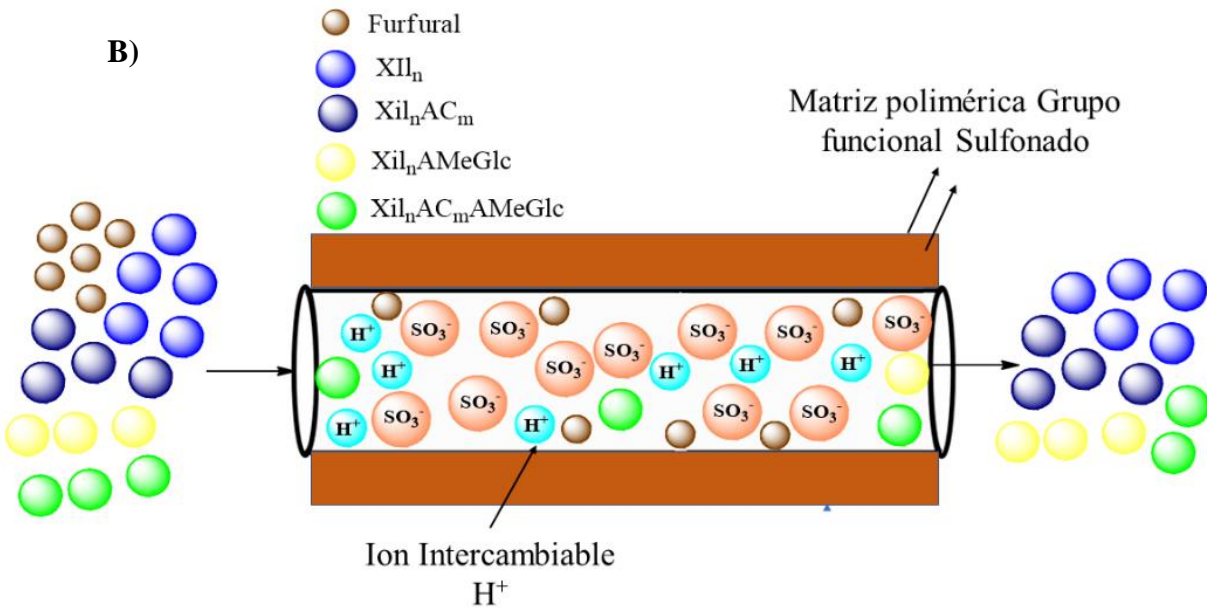
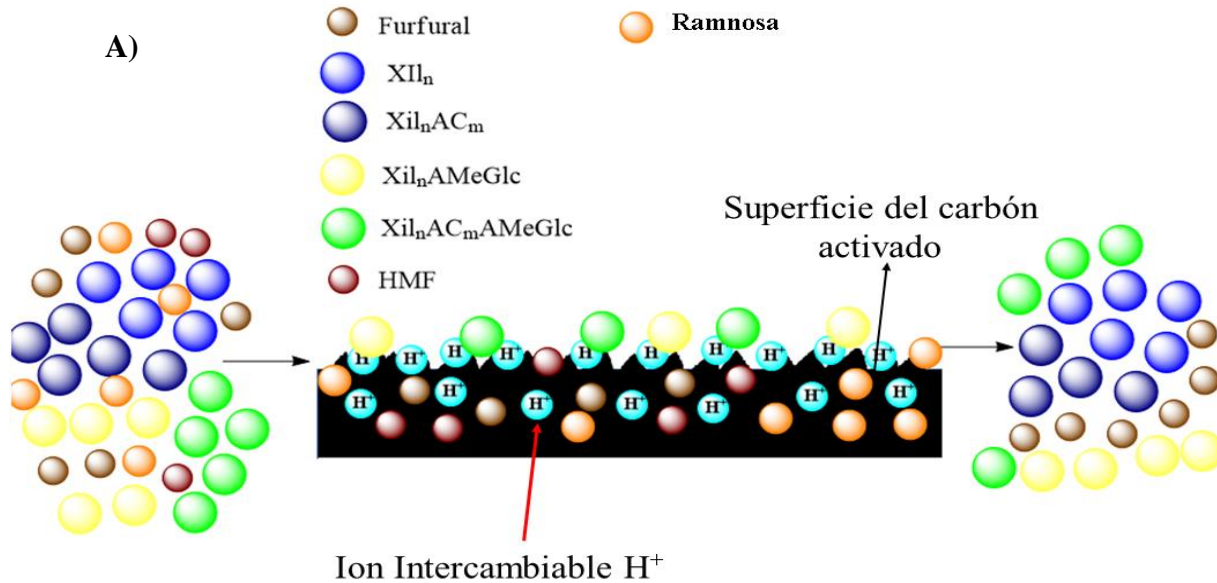
Ruta de purificación propuesta al hidrolizado crudo inicial de raquis de palma africana. Utilizando A) Tratamiento con carbón activado, B) Tratamiento con resina de intercambio catiónico ácido fuerte y C) Tratamiento con resina de intercambio aniónico base fuerte

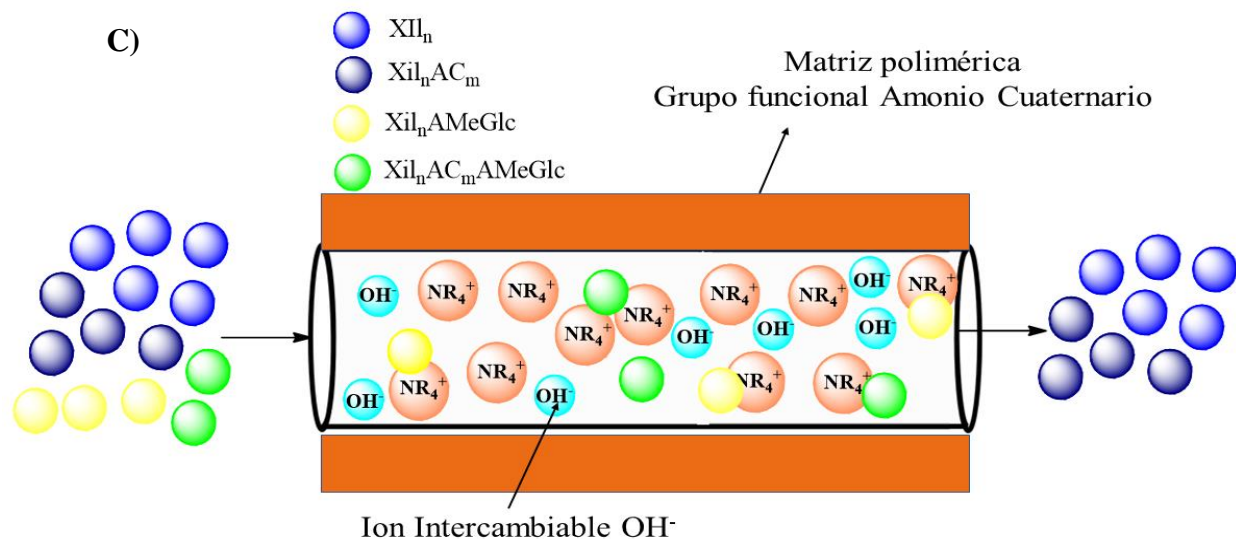


Luego del proceso de autohidrólisis, las muestras finalmente fueron purificadas mediante una ruta de purificación (**Figura 13**) propuesta por el grupo de investigación INTERFASE (Guerrero Serrano, 2018), utilizando: a), carbón activado Merck Ref. 1.02186.1000; b), resina de intercambio catiónico ácido fuerte (H⁺) Lewatit® MonoPlus S 108 H; y c), resina de intercambio aniónico base fuerte (OH⁻) Lewatit® MonoPlus M 800 OH. Se espera eliminar moléculas indeseadas *e.g.* Monosacáridos, Furfural, HMF, XO_s ácidos y acetilados ácidos, mediante intercambio iónico o interacciones débiles con la superficie de los adsorbentes (**Figura 14**).

Figura 14

Esquema de las interacciones de cada uno de los pasos de la ruta de purificación propuestos. A) Tratamiento con Carbón Activado B) Tratamiento con Resina de Intercambio Cationico ácido fuerte y C) Tratamiento con Resina de Intercambio Aniónico base fuerte





Las muestras resultantes de estos procesos de purificación se analizaron mediante ESI-QIT para determinar la presencia de XO_s y sus derivados, como XO_s neutros y ácidos. Además, junto con los XO_s, se caracterizaron compuestos subproductos de cada paso de la purificación. El estándar de xilano y la muestra de bagazo de caña de azúcar se utilizaron como compuestos de referencia para el análisis. Todas las muestras se analizaron por medio de espectrometría de masas con fuente de ionización ESI.

4.2. Preparación de las muestras para el análisis por ESI

Los análisis ESI-IT se realizaron en un espectrómetro de masas (MS) marca Amazon X (*Bruker Daltonics, Billerica MA, USA*) equipado con una fuente de ionización ESI tipo Apolo y un analizador de trampa iónica cuadrupolar (*Quadrupole Ion Trap QIT*), en modo de ionización positivo. Las muestras para ESI MS se prepararon disolviendo la muestra en una solución de ACN/H₂O en relación (1:1, v/v) con 1% (v/v) de hidróxido de amonio (NH₄OH) para una concentración final de 10 ppm. (A. Reis, Domingues, Ferrer-Correia, y Coimbra, 2003).

Una vez obtenidos los espectros de masas se procedió a realizar los experimentos tándem a la muestra de máxima purificación. En estos ensayos se obtuvo información sobre la composición estructural de los xilo-oligosacáridos mediante un análisis detallado de las fragmentaciones de enlaces glucosídicos y de los anillos de los oligosacáridos.

Las condiciones de operación de la fuente de ionización ESI fueron: voltaje del capilar y el electrodo 5kV y -500V respectivamente; gas nebulizador (N₂) con velocidad de flujo de 5.0 L/min y temperatura de 250 °C; acumulación diez espectros en la región de m/z 70 a 2000. Para los análisis de los espectros se utilizó el *software Bruker Compass DataAnalysis*[®] 4.4 y *Origin pro-2019*[®]. Las estructuras se dibujaron utilizando el *software ChemDraw Ultra 12.0*[®].

5. Análisis de resultados

Los análisis por espectrometría de masas ESI del estándar de xilano, los hidrolizados iniciales del bagazo de caña de azúcar y raquis de palma africana y cada una de las fracciones del proceso de purificación del hidrolizado de raquis permitieron efectivamente obtener información composicional sobre los grupos de XO_s presentes. En las muestras analizadas se detectaron XO_s neutros, acetilados y ácidos. El seguimiento por ESI-QIT al proceso de purificación del hidrolizado crudo de raquis de palma mostró que las etapas propuestas fueron efectivas en remover compuestos indeseados de la muestra inicial y para obtener al final del proceso un producto enriquecido en XO_s neutros y acetilados. Los experimentos de espectrometría de masas tándem en tiempo, realizados con el analizador de trampa iónica cuadrupolar (QIT), permitieron confirmar la identidad de las especies observadas.

A continuación, se discuten con detalle los resultados obtenidos.

5.1. Caracterización del estándar de xilano por espectrometría de masas ESI-QIT

El proceso de caracterización de las muestras vía ESI-QIT inició con el estudio de un estándar de xilano proveniente de mazorca de maíz al 90% de pureza. La **Figura 15A** muestra un espectro de masas ESI *full scan* del estándar de xilano en modo ionización positivo en el rango de m/z 100 a 1600. La **Figura 15B** muestra un acercamiento en la región del espectro de m/z 300 a 800, que corresponde a XOs neutros acetilados. En todos los análisis los xilo-oligosacáridos fueron detectados como iones aductos de sodio $[M+Na]^+$ y amonio $[M+NH_4]^+$. En el espectro de masas ESI del estándar de xilano, se identificaron 26 xilo-oligosacáridos neutros, ácidos y acetilados los cuales se muestran en la **Tabla 1**. El espectro de masas del estándar de xilano es similar a otros reportados en la literatura (Matamoros Fernández, Obel, Scheller, y Roepstorff, 2003; Quéméner et al., 2015; Ana Reis et al., 2004).

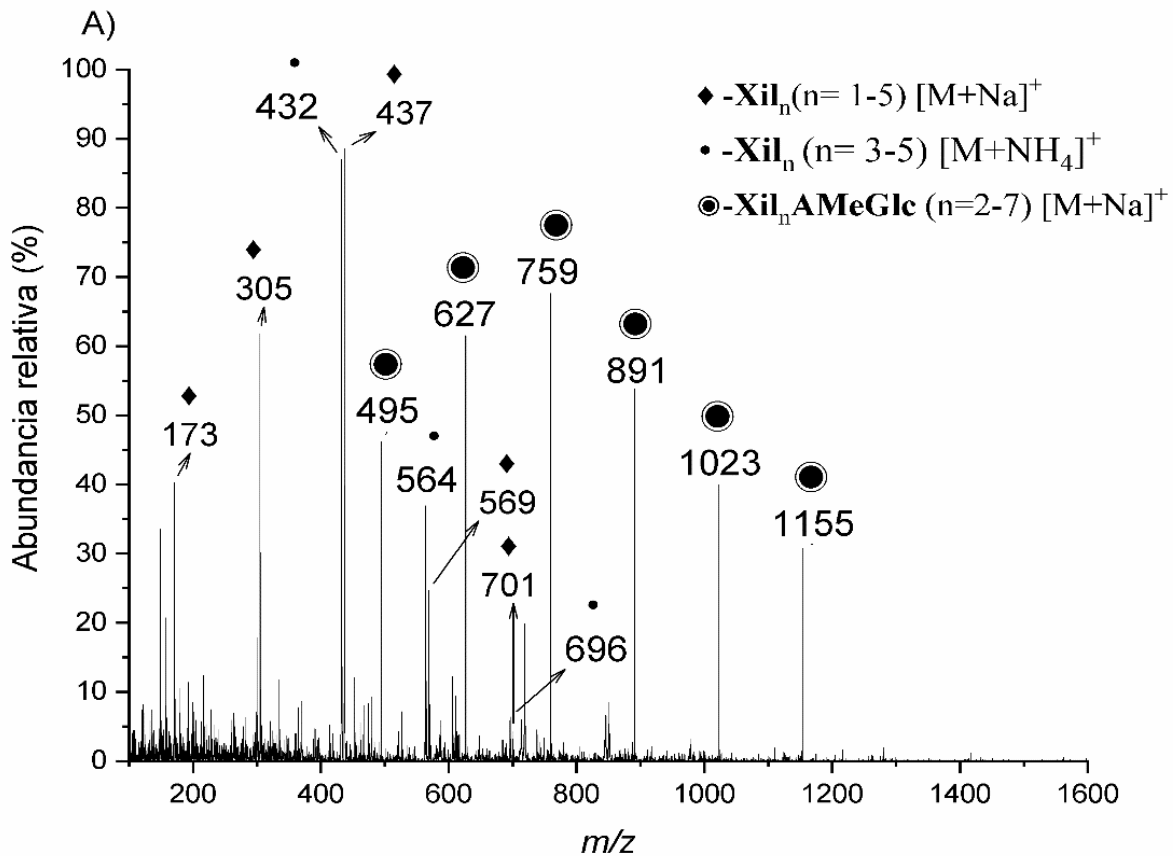
En la **Figura 15A** las señales correspondientes a iones aducto de sodio de tres familias de xilanos identificadas se etiquetan de la siguiente forma: (♦) Xil_{1-5} neutros sin sustituyentes, (●) $Xil_{2-7}AMeGlc$ ácidos con sustituyente 4-O-metil-D-glucurónico y (◇) $Xil_{2-5}Ac$ oligosacáridos con grupos acetilo como sustituyentes, con un grado de sustitución de 1 a 2 grupos acetilo por cadena de oligosacárido. También se detectaron las siguientes series de xilo-oligosacáridos como aductos de amonio $[M+NH_4]^+$: (•) Xil_{3-5} neutros sin sustituyentes y (★) $Xil_{4-5}Ac_1$ oligosacáridos con sustituyente grupo acetilo. En el espectro no se detectaron aductos de amonio de xilo-oligosacáridos con sustituyentes de ácido 4-O-metil-D-glucurónico (AMeGlc).

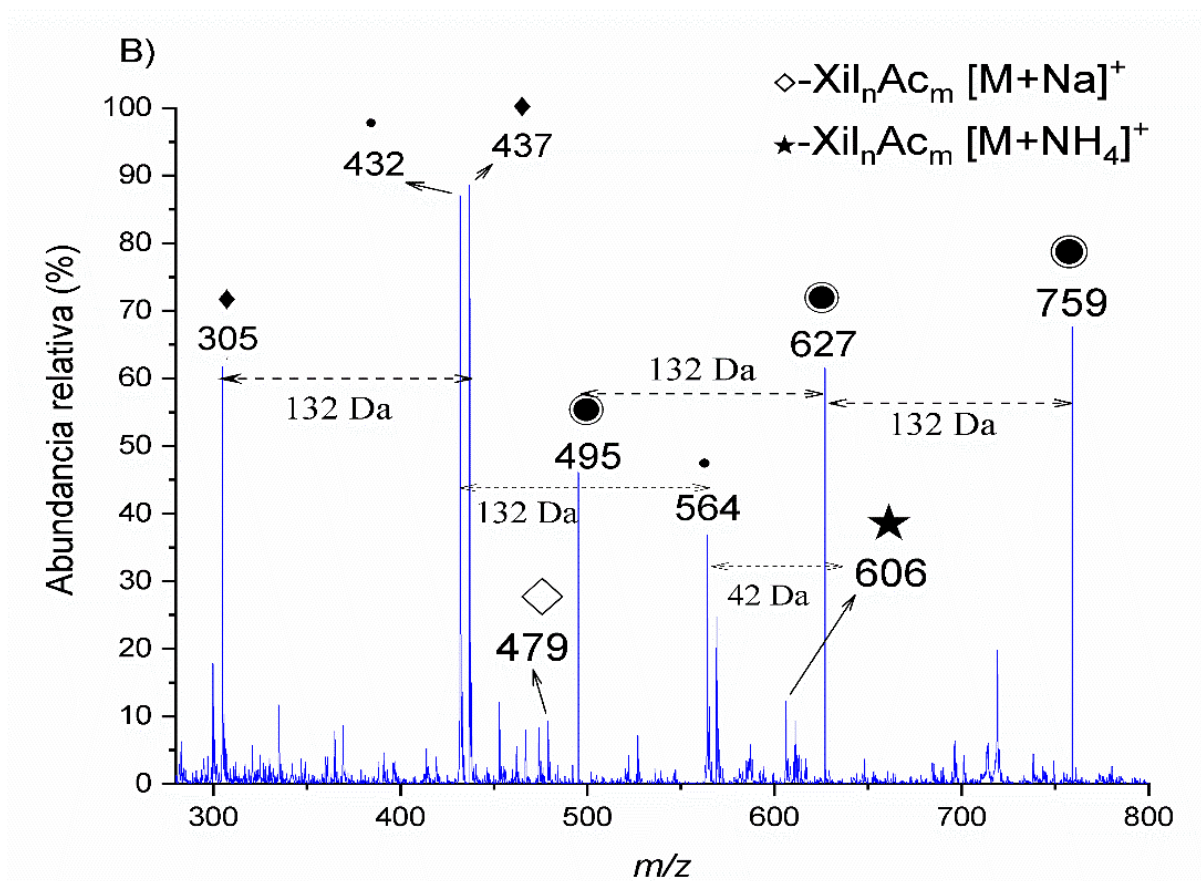
La serie de iones más abundantes en la **Figura 15A** con m/z 173, 305, 437, 569 y 701 corresponde a aductos de sodio, $[M+Na]^+$, mientras la serie con m/z 432, 564 y 696 se debe a aductos de amonio, $[M+NH_4]^+$. Las dos series corresponden a la cadena de xilosa sin sustituyentes como se observa en la **Figura 16**. La diferencia de 132 Da entre las señales de las series se debe a

la adición de unidades de xilosa a las cadenas del oligosacárido (Ana Reis et al., 2005). El proceso de condensación de las unidades de xilosa para formar el enlace O-glucosídico ocurre con pérdida de agua, por lo que la masa de la xilosa de 150 Da se reduce en 18 unidades cuando se forma el polímero (Reddy y Krishnan, 2016).

Figura 15

Espectros de masas ESI del estándar de xilano, modo ionización positivo, A) Full Scan y B) Zoom en la región del espectro m/z 300 a m/z 800





Por otra parte, la serie de iones en m/z 495, 627, 759, 891, 1023 y 1155 (**Figura 15A**), detectados como aductos de sodio $[\text{M}+\text{Na}]^+$, se debe a xilo-oligosacáridos ácidos con estructura (●) $\text{Xil}_n\text{AMeGlc}$. Esta serie presenta también la diferencia característica de 132 Da entre sí, y de 58 Da con respecto a los xilo-oligosacáridos neutros Xil_n de la serie m/z 437, 569 y 701 (**Figura 17**). La diferencia de 58 Da se debe a la presencia de ácido glucurónico como sustituyente (Ana Reis et al., 2002). Estos iones corresponden a la segunda serie más abundante en el espectro (**Figura 15B**).

Tabla 1

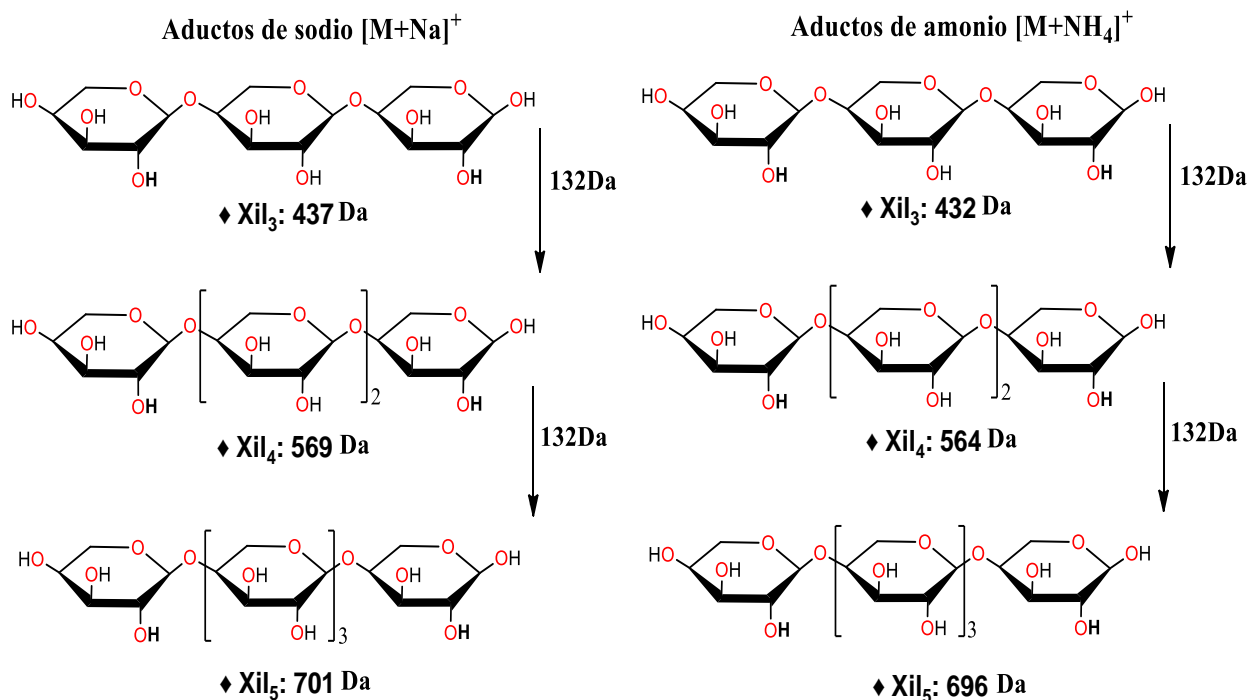
Número de residuos de xilosa (Xil_n) en los xilo-oligosacáridos neutros y ácidos, identificados por espectrometría de masas ESI en modo de ionización positivo, full scan, como aductos de sodio y amonio, respectivamente

| Xilo-oligosacáridos | n-Residuos de xilosa | Especie química detectada | Rango m/z |
|---|--|----------------------------------|-------------------------------|
| Xilo-oligosacáridos neutros | | | |
| Xil_n | 1-5 | $[M + Na]^+$ | 173-701 |
| | 3-5 | $[M + NH_4]^+$ | 492-696 |
| Xilo-oligosacáridos neutros acetilados (Ac_m) | | | |
| Xil_nAc_1 | 2-5 | $[M + Na]^+$ | 347-743 |
| | 4-5 | $[M + NH_4]^+$ | 606-738 |
| Xil_nAc_2 | 2-5 | $[M + Na]^+$ | 389-785 |
| | 4-5 | $[M + NH_4]^+$ | 648-780 |
| Xilo-oligosacáridos ácidos | | | |
| $Xil_nAMeGlc$ | 2-7 | $[M + Na]^+$ | 495-1155 |

Como se puede observar en la **Tabla 1**, y en el inserto de la **Figura 15B**, en el rango de masas entre m/z 300 y 800 se observan series de XOs con un sustituyente acetilo del tipo Xil_nAc_m , corresponden a la serie de aductos de sodio $[M+Na]^+$ en m/z 347, 479, 611 y 743 como estructura tipo $(\diamond)Xil_{2.5}AC_1$. También se presentan como aductos de amonio $[M+NH_4]^+$ XOs monoacetilado con serie en m/z 606 y 738.

Figura 16

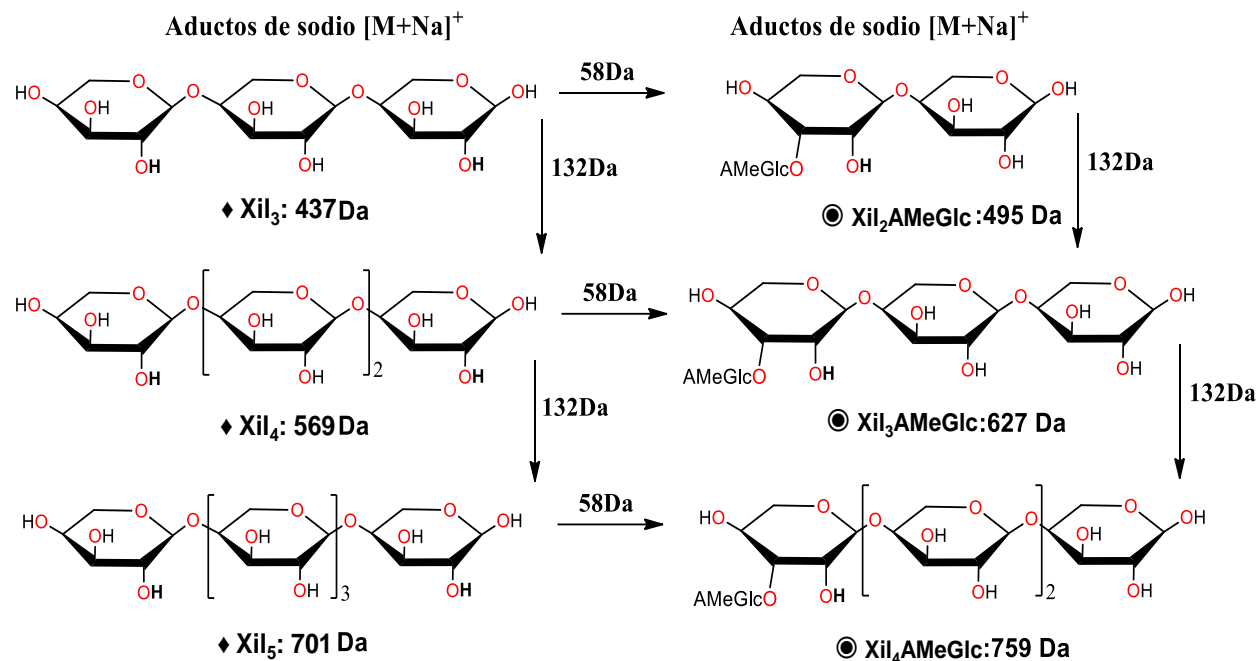
Series de aductos de sodio [M+Na]⁺ y amonio [M+NH₄]⁺ de xilo-oligosacáridos neutros de tipo (Xil_n), observados en el espectro de masas ESI



Los XO_s acetilados se caracterizan por diferencias de 42 Da por cada grupo acetilo (Ac) que se le añade a la estructura (Pu et al., 2016; Quéméner et al., 2015; Ana Reis et al., 2002, 2005). Los grupos Ac pueden estar presentes como una ramificación o sustituyendo un hidrogeno en el hidroxilo del residuo del xilosa, principalmente en la posición 1 o 2 del anillo (Ana Reis et al., 2005). La familia de XO_s acetilados también se caracteriza por presentar diferencias de 132 Da entre las señales de la serie (Ana Reis et al., 2005).

Figura 17

Series de aductos de sodio [M+Na]⁺ de xilo-oligosacáridos neutros de tipo (Xil_n) y (Xil_nAMeGlc), observados en el espectro de masas ESI



5.2. Caracterización de un hidrolizado de bagazo de caña de azúcar por espectrometría de masas ESI-QIT

La **Figura 18** muestra un espectro de masas ESI *full scan* de una muestra de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, en modo ionización positivo en el rango de m/z 100 a 2000. El aspecto del espectro es diferente al del estándar de xilano debido a la presencia de un rango amplio de oligómeros y de familias de XO_s ácidos y acetilados. Entre las especies detectadas se encuentran series de iones de aductos de sodio $[M+Na]^+$ como: (●)-Xil₂₋₁₁AMeGlc, (▼)-Xil₃₋₉Ac₁AMeGlc, (▼)-Xil₄₋₉Ac₂AMeGlc y (▼)-Xil₅₋₈Ac₃AMeGlc. También se identificaron aductos de amonio $[M+NH_4]^+$ que corresponden a las series del XO_s ácidos, a saber: (■)-Xil₃₋₉AMeGlc, (▲)-Xil₃₋₈Ac₁AMeGlc y (▲)-Xil₄₋₇Ac₂AMeGlc. En total se identificaron 48 XO_s ácidos en el hidrolizado de bagazo de caña (**Figura 18**), los cuales se agrupan en la **Tabla 2**, con su respectivo grado máximo de polimerización (GP) (Ho et al., 2014; A. Reis et al., 2003). En el espectro de la **Figura 18** no se detectaron series de XO_s neutros del tipo (Xil_n). Esto se puede deber a que durante el

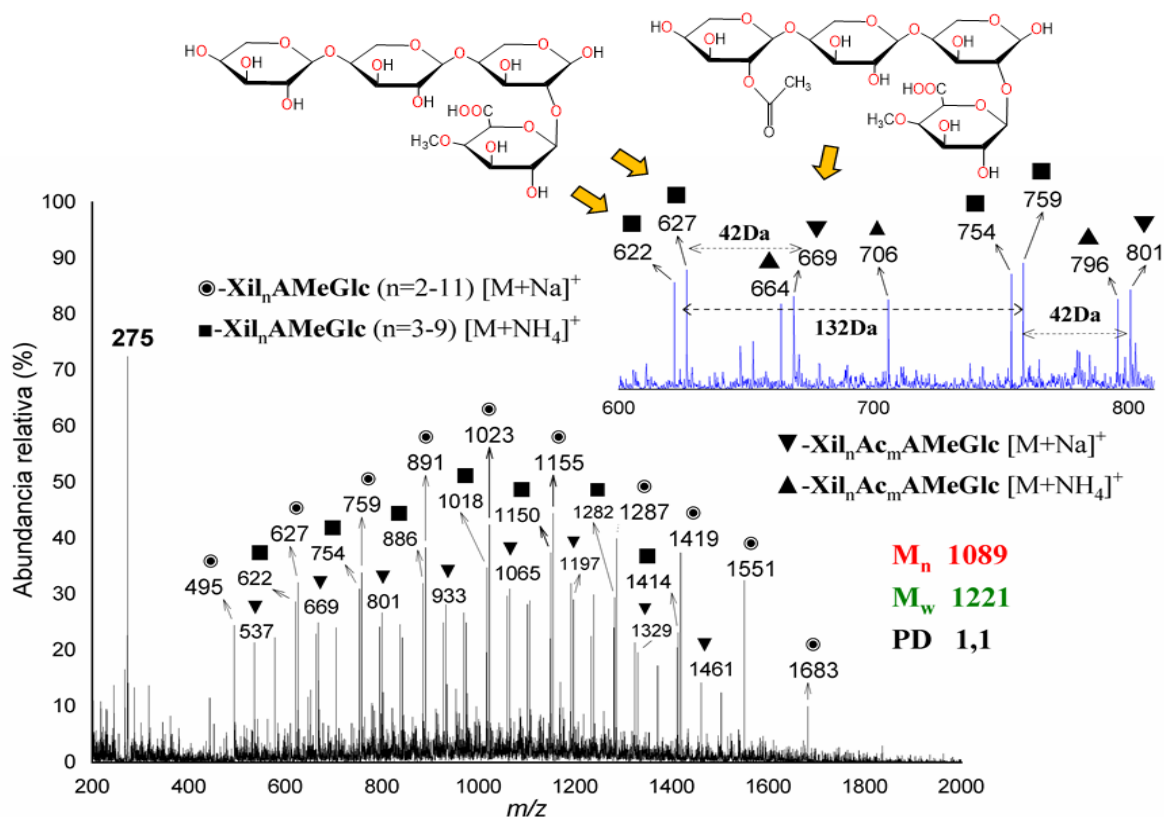
proceso de autohidrólisis los iones hidronio reaccionan selectivamente con los enlaces glucosídicos de la cadena principal del polímero de xilosa y no atacan las ramificaciones ácidas (Chemin et al., 2015).

En la **Figura 18** también se observa que las series de iones, tanto aductos de sodio $[M+Na]^+$ como de amonio $[M+NH_4]^+$, presentan la diferencia característica de 132 Da que confirma la presencia de xilosa (A. Reis et al., 2003; Ana Reis et al., 2005). En el espectro de masas de la **Figura 18** los iones más abundantes corresponden a la serie de aductos de sodio $[M+Na]^+$ en m/z 495, 627, 759, 891, 1023, 1155, 1287, 1419, 1551 y 1683, atribuidos a especies del tipo (\bullet) -Xil₂₋₁₁AMeGlc con un grado de polimerización (GP) de hasta 11 residuos de xilosa (Ana Reis et al., 2005). Por otra parte, la serie de iones en m/z 622, 754, 886, 1018, 1150, 1282 y 1414, también con 132 Da de diferencia, corresponde a aductos de amonio $[M+NH_4]^+$ con estructura similar a la de los aductos de sodio. Estos iones se atribuyen a las series (\blacksquare) -Xil₃₋₉AMeGlc con un grado de polimerización (GP) de hasta 9 residuos de xilosa.

Como se puede observar en el inserto de la **Figura 18**, en el rango de masas entre m/z 600 y 800 se observan series de XOs con un sustituyente acetilo del tipo Xil_nAc_mAMeGlc (**Tabla 2**). Los XOs acetilados se caracterizan por diferencias de 42 Da por cada grupo acetilo (Ac) que se le añade a la estructura (Pu et al., 2016; Quéméner et al., 2015; Ana Reis et al., 2002, 2005). Los grupos Ac pueden estar presentes como una ramificación o sustituyendo un hidrógeno en el hidroxilo del residuo de xilosa, principalmente en la posición 1 o 2 del anillo (Ana Reis et al., 2005). La familia de XOs acetilados también se caracteriza por presentar diferencias de 132 Da entre las señales de la serie (Ana Reis et al., 2005).

Figura 18

Espectro de masas ESI-IT de una muestra de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, modo ionización positivo, full scan y acercamiento en la región de m/z 600-800



A partir de las distribuciones de peso molecular observadas en el espectro de masas (MWD) es posible calcular los parámetros M_n (peso molecular promedio en número), M_w (peso molecular promedio en peso) y la polidispersidad (PD) de la muestra. Los valores obtenidos para M_n , M_w y PD en el espectro de bagazo de caña de azúcar (**Figura 18**) son: 1089, 1221 y 1,1 respectivamente.

Tabla 2

XOs ácidos y acetilados ácidos identificados como aductos de sodio y amonio en el espectro ESI de una muestra de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar

| Xilo-oligosacáridos | n-Residuos de xilosa | Grado máximo de polimerización (GP) | Especie química detectada | Rango <i>m/z</i> |
|---|----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------|
| Xilo-oligosacáridos ácidos (AMeGlc) | | | | |
| Xil _n AMeGlc | 2-11 | 11 | [M + Na] ⁺ | 495-1683 |
| | 3-9 | 9 | [M + NH ₄] ⁺ | 622-1414 |
| Xilo-oligosacáridos acetilados ácidos (Ac_mAMeGlc) | | | | |
| Xil _n Ac ₁ AMeGlc | 2-9 | 9 | [M + Na] ⁺ | 537-1461 |
| | 3-8 | 8 | [M + NH ₄] ⁺ | 664-1324 |
| | | | [M+NH ₄] ⁺ | |
| Xil _n Ac ₂ AMeGlc | 4-9 | 9 | [M + Na] ⁺ | 843-1503 |
| | 4-7 | 7 | [M + NH ₄] ⁺ | 838-1234 |
| Xil _n Ac ₃ AMeGlc | 5-8 | 8 | [M + Na] ⁺ | 1017-1413 |

El peso molecular promedio en número (M_n), indica el promedio estadístico del peso molecular de todas las cadenas de xilo-oligosacáridos, dividido por el número total de oligómeros presentes en la muestra de bagazo de caña de azúcar. Mientras que el peso molecular promedio en peso (M_w) se basa en que hay presente una sola cadena de xilo-oligosacárido que contiene más de la masa total promedio presente en el espectro. La polidispersidad, muestra la amplitud o la diferenciación que se presenta por los pesos moleculares y la amplitud de las distintas cadenas de xilo-oligosacáridos de una muestra de polímero. EL valor de la polidispersidad en este caso es > 1 , e indica que las cadenas de los XO_s no son iguales en longitud y especies (Montaudo et al., 2006).

En la **Figura 18** se observó la presencia del ión en m/z 275 que corresponde a una impureza, posiblemente un residuo de polímero como el polipropileno (C_3H_6)_n, presente en las jeringas plásticas utilizadas en la preparación de las muestras (**Figura 20**). El ion m/z 275 está presente como un aducto de sodio $[M+Na]^+$ y posee 6 unidades repetitivas $[(C_3H_6)_6 + Na]^+$.

Los resultados de análisis de espectrometría de masas para el hidrolizado de bagazo de caña de azúcar son similares a otros reportados en la literatura. El análisis MALDI, en modo de ionización positivo, para una fracción pura de XOs de bagazo de caña mostró la presencia de aductos de sodio $[M+Na]^+$ y aductos de potasio $[M+K]^+$ de xilanos neutros (Reddy y Krishnan, 2016). El espectro en masas de XOs extraídos del bagazo de caña de azúcar exhibe series de iones separados por 132 Da, de manera similar a los extraídos de otros materiales lignocelulósicos *e.g.* maíz, aserrín de madera, trigo y cascara de oliva (Matamoros Fernández et al., 2003; Pu et al., 2016; Ana Reis et al., 2002, 2005). Las series de iones observadas tanto en el estándar de xilano como en el hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, sirven como referencia para los análisis de las muestras de XOs de raquis de palma y su respectiva ruta de purificación como se discute en las siguientes secciones del documento.

5.3. Caracterización del hidrolizado crudo de raquis de palma africana por espectrometría de masas ESI-QIT

En el espectro del hidrolizado inicial de raquis de palma (**Figura 19**), se puede apreciar una distribución de peso molecular del polímero (MWD), con valores de M_n y M_w de 813 y 872, respectivamente. Además, se calculó una polidispersidad (PD): 1,1. Por lo tanto, la polidispersidad se mantiene y los valores de M_n y M_w en el hidrolizado inicial de raquis de palma fueron menores comparados con los del hidrolizado inicial de bagazo de caña de azúcar, demostrando así una menor masa y longitud en las cadenas de las especies de XOs respecto a la que se observa en el espectro de bagazo de caña de azúcar, pero una mayor variedad en cuanto a especies o familias.

La **Figura 19** muestra un espectro de masas ESI *full scan* de una muestra de hidrolizado crudo del raquis de palma africana, en modo ionización positivo en el rango de m/z 70 a 2000. El espectro

difiere en aspecto al del bagazo de caña de azúcar debido a la presencia de una amplia variedad de oligómeros y de familias de XOs neutros sin sustituyentes, ácidos con sustituyente 4-O-metil-D-glucurónico y xilo-oligosacáridos neutros y ácidos con grupos acetilo como sustituyentes. Además, en el espectro ESI del hidrolizado de raquis de palma, se puede observar la presencia de otros grupos o especies de xilo-oligosacáridos neutros, las cuales fueron identificados en el estándar de xilano (**Figura 15**). Entre las especies detectadas se encuentran series de iones de aductos de sodio $[M+Na]^+$ como: (◆)-Xil₃₋₅, (◇)-Xil₄₋₆Ac₁, (◇)-Xil₄₋₆Ac₂, (●)-Xil₂₋₇AMeGlc, (▼)-Xil₂₋₇Ac₁AMeGlc, (▼)-Xil₂₋₇Ac₂AMeGlc y (▼)-Xil₄₋₆Ac₃AMeGlc. También se identificaron aductos de amonio $[M+NH_4]^+$ que corresponden a las series del XOs neutros, neutros acetilados, ácidos y ácidos acetilados a saber: (●)-Xil₃₋₆, (★)-Xil₃₋₇Ac₁, (★)-Xil₃₋₇Ac₂, (★)-Xil₄₋₇Ac₃, (■)-Xil₂₋₇AMeGlc, (▲)-Xil₆₋₇Ac₁AMeGlc y (▲)-Xil₃₋₆Ac₂AMeGlc. En total se identificaron 56 XOs, 30 XOs neutros y 26 XOs ácidos en el hidrolizado de raquis de palma africana (**Figura 19**), los cuales se agrupan en la **Tabla 3**, con su respectivo grado máximo de polimerización (GP) (Ho et al., 2014; A. Reis et al., 2003).

En la **Figura 19** y al igual que las muestras de referencia, se observa que las series de iones, tanto aductos de sodio $[M+Na]^+$ como de amonio $[M+NH_4]^+$, presentan la diferencia característica de 132 Da que confirma la presencia de xilosa (A. Reis et al., 2003; Ana Reis et al., 2005).

Como se puede observar en el inserto de la **Figura 19**, en el rango de masas entre m/z 600 y 800 se observan series de XOs con un sustituyentes acetilo del tipo Xil_nAc_m y (Xil_nAc_mAMeGlc) (**Tabla 3**). Los XOs acetilados se caracterizan por diferencias de 42 Da por cada grupo acetilo (Ac) que se le añade a la estructura (Pu et al., 2016; Quéméner et al., 2015; Ana Reis et al., 2002, 2005).

Tabla 3

XO_s neutros, neutros acetilados, ácidos y acetilados ácidos identificados como aductos de sodio y amonio en el espectro ESI de una muestra de hidrolizado de raquis de palma africana

| Xilo-oligosacáridos | n-Residuos de xilosa | Grado máximo de polimerización (GP) | Especie química detectada | Rango m/z |
|---|-----------------------------|--|-------------------------------------|------------------|
| Xilo-oligosacáridos neutros | | | | |
| Xil _n | 3-5 | 5 | [M + Na] ⁺ | 437-569 |
| | 3-6 | 6 | [M + NH ₄] ⁺ | 432-828 |
| Xilo-oligosacáridos neutros acetilados (Ac_m) | | | | |
| Xil _n Ac ₁ | 4-6 | 6 | [M + Na] ⁺ | 611-875 |
| | 3-7 | 7 | [M + NH ₄] ⁺ | 474-1002 |
| Xil _n Ac ₂ | 4-6 | 6 | [M + Na] ⁺ | 653-917 |
| | 3-7 | 7 | [M + NH ₄] ⁺ | 516-1044 |
| Xil _n Ac ₃ | - | - | - | - |
| | 4-7 | 7 | [M + NH ₄] ⁺ | 690-1086 |
| Xilo-oligosacáridos ácidos (AMeGlc) | | | | |
| Xil _n AMeGlc | 2-7 | 7 | [M + Na] ⁺ | 495-1155 |
| | 2-5 | 5 | [M + NH ₄] ⁺ | 490-886 |
| Xilo-oligosacáridos acetilados ácidos (Ac_mAMeGlc) | | | | |
| Xil _n Ac ₁ AMeGlc | 2-7 | 7 | [M + Na] ⁺ | 537-1197 |
| | 6-7 | 7 | [M + NH ₄] ⁺ | 1060-1192 |
| Xil _n Ac ₂ AMeGlc | 2-7 | 7 | [M + Na] ⁺ | 579-1239 |
| | 3 y 6 | 6 | [M + NH ₄] ⁺ | 706 y 1234 |
| Xil _n Ac ₃ AMeGlc | 4-6 | 6 | [M + Na] ⁺ | 885-1149 |

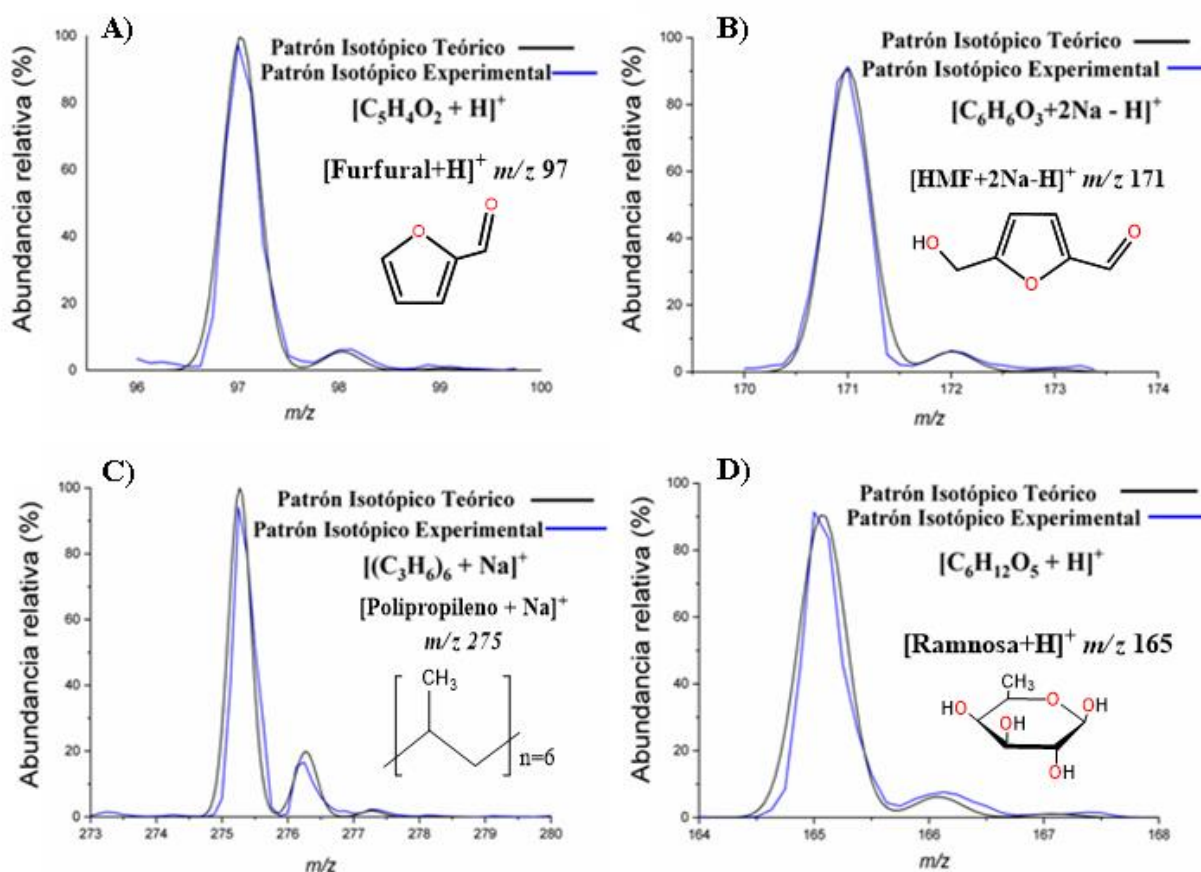
En el desecho de raquis de palma, el furfural, el HMF y la ramnosa, son subproductos hidrotermales -compuestos mayoritarios de degradación- del proceso extractivo de XO_s de la

biomasa (Acosta et al., 2018; Imman et al., 2013; Nabarlantz et al., 2007). En la **Figura 19**, los iones ubicados a masas bajas *e.g.* m/z 97, 171, 165 y 275, son compuestos típicos de degradación, productos del proceso hidrotermal de autohidrólisis (Liu, Ren, Zhang, Liu, y Ouyang, 2018; Montané et al., 2006; Vinueza et al., 2015). Los demás iones presentes a masas bajas son representados por el background del equipo y hace parte de la contaminación de la fuente y el detector. En el caso particular del ion m/z 275, corresponde contaminación del proceso de preparación de la muestra de hidrolizado de raquis de palma. El ion m/z 97 corresponde a una molécula protonada de furfural, $[M+H]^+$ (Vinueza et al., 2015), y el ion m/z 171 corresponde a una molécula de HMF doblemente sodiada y deprotonada, $[M+2Na-H]^+$ (**Figura 20**).

El furfural ($C_5H_4O_2$) y el hidroximetilfurfural (HMF) ($C_6H_6O_3$) son productos de degradación y buenos indicadores de la calidad o deterioro de productos de grado alimenticio (Mesías-García, Guerra-Hernández, y García-Villanova, 2010). Se producen a partir de pentosas y hexosas *e.g.* xilosa y glucosa, que a altas temperaturas y a pH ácido se “desprenden” de la cadena polimérica y se degradan (G Garrote y Dominguez, 2002; Ho et al., 2014; Nabarlantz et al., 2007; Rivas Siota, 2014). Estas moléculas son tóxicas y pueden ocasionar problemas en la salud humana como daños en los riñones, hígado y crecimiento anormal en tejidos (cáncer) (Lee et al., 2019; Mesías-García et al., 2010). Debido a lo mencionado previamente, es necesario eliminar estos componentes de la matriz del hidrolizado crudo de raquis de palma para finalmente obtener un producto de grado alimenticio (Moure et al., 2006).

Figura 20

Patrones isotópicos experimentales y calculados de las especies: A) Furfural $[M+H]^+$ m/z 97, B) HMF $[M+2Na-H]^+$ m/z 171, C) Polipropileno $[M+Na]^+$ m/z 275 y D) Ramnosa $[M+H]^+$ m/z 165. Línea de color azul: Patrón Isotópico Experimental, línea de color negro: Patrón Isotópico Teórico



El ion m/z 165, corresponde a un residuo de monosacárido de 6 carbonos (hexosa) denominado ramnosa protonado, $[M+H]^+$, ($C_6H_{12}O_5$). La ramnosa ($C_6H_{12}O_5$) es un subproducto del proceso de autohidrólisis realizado al raquis de palma, posiblemente el residuo de ramnosa pudo ser parte de alguna ramificación del polímero xilano en la hemicelulosa (Previato, Wait, Jones, y Mendonça-Previato, 1994; Rivas Siota, 2014).

Para tener una mejor certeza en la identificación de los compuestos de degradación *e.g.* furfural, $[M+H]^+$ (m/z 97), ramnosa, $[M+H]^+$ (m/z 165), HMF, $[M+2Na-H]^+$ (m/z 171) y polipropileno, $[M+Na]^+$ (m/z 275), se compararon los patrones isotópicos experimentales y calculados de cada uno de ellos (**Figura 20**). El patrón isotópico teórico se calculó utilizando el *software* libre “*enviPat: Isotope Pattern 2.4*” (Loos, M, Gerber, C, Corona, F, Hollender, J, Singer, 2015).

En la **Figura 20**, se puede observar que los patrones isotópicos experimentales de los compuestos de degradación identificados en el hidrolizado inicial de raquis de palma, coinciden con los patrones isotópicos calculados mediante el *software Isotope Pattern 2.4*. Lo anterior, es un criterio adicional para la identidad de estas especies.

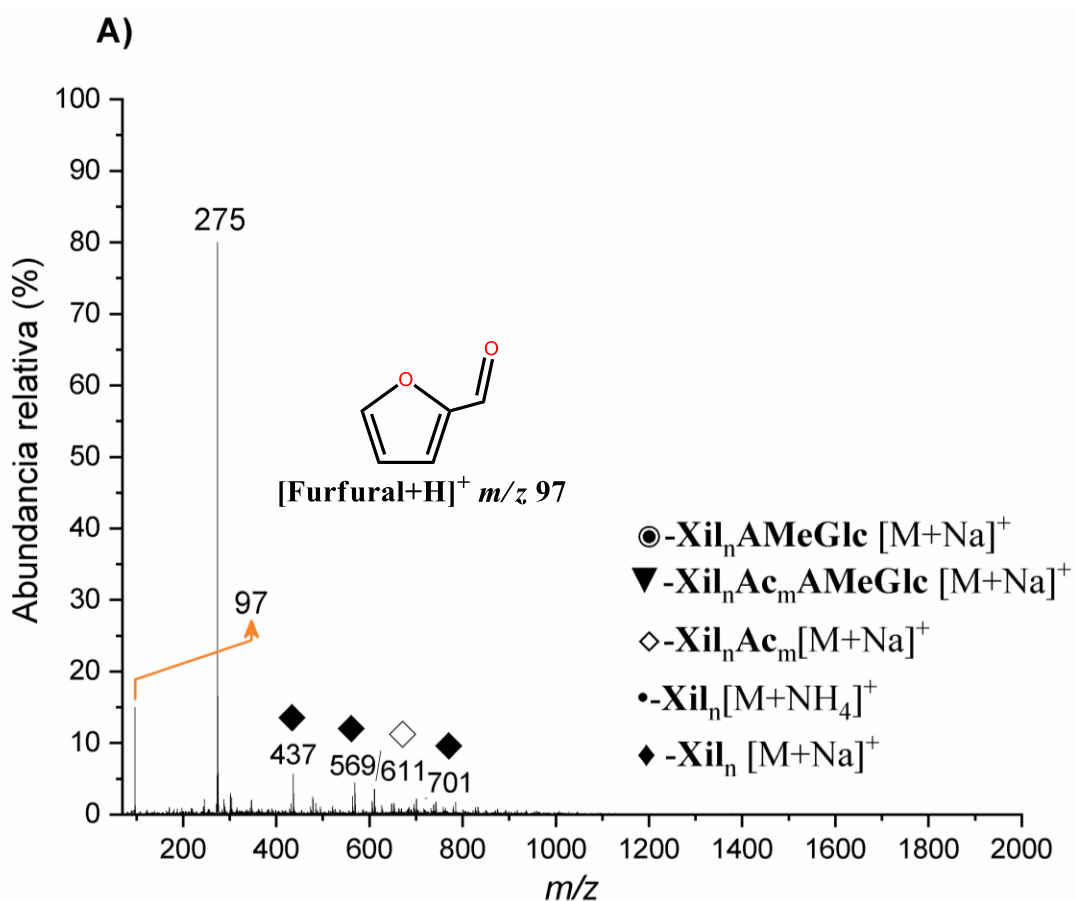
5.4. Caracterización de la fracción obtenida mediante el tratamiento con carbón activado del hidrolizado inicial de raquis de palma por espectrometría de masas ESI-QIT

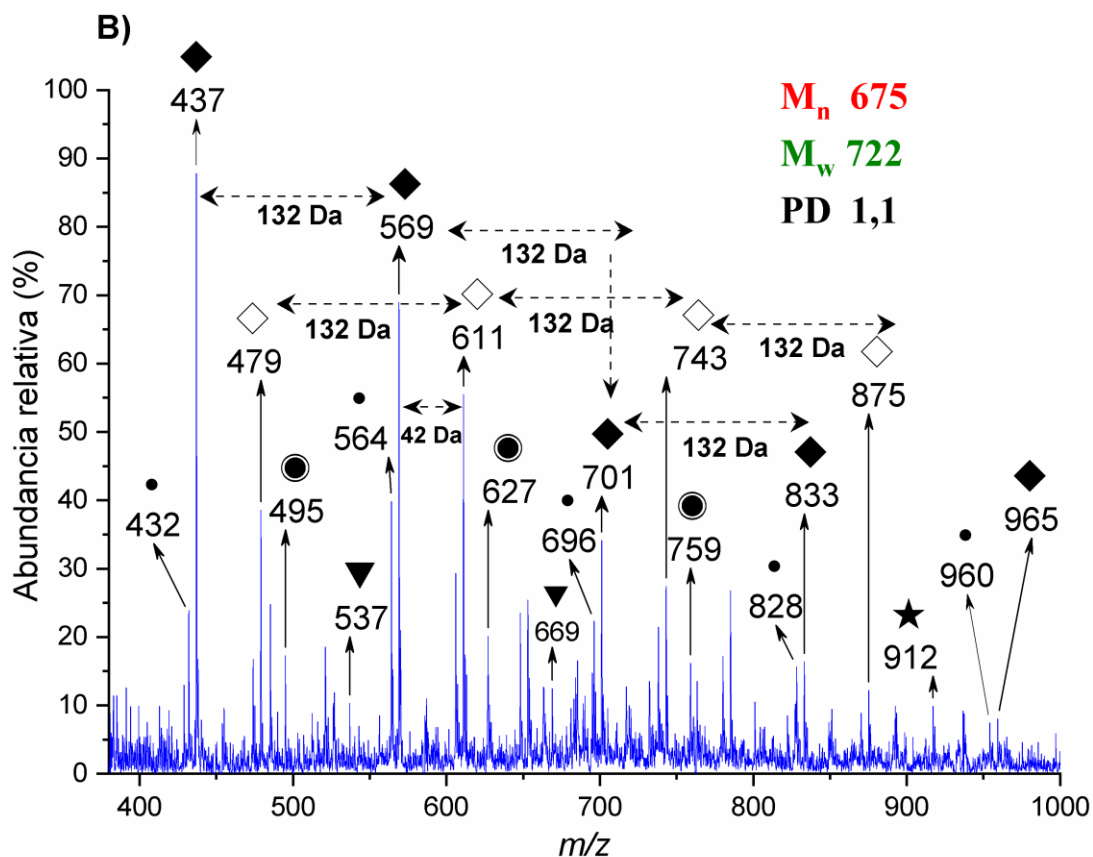
La **Figura 21A** muestra un espectro de masas ESI *full scan* de la fracción obtenida a partir del tratamiento con carbón activado, (primer paso de la ruta de purificación propuesta al hidrolizado inicial de raquis de palma **Sección 5.3.** de la metodología), en modo ionización positivo en el rango de m/z 70 a 2000. A partir de las distribuciones de peso molecular observadas en el espectro de masas (MWD) es posible calcular los parámetros M_n (peso molecular promedio en número), M_w (peso molecular promedio en peso) y la polidispersidad (PD) de la muestra. Los valores obtenidos para M_n , M_w y PD en el espectro del tratamiento con carbón activado (**Figura 21B**) son: 675, 722 y 1,1 respectivamente. Los promedios en número y peso M_n y M_w , respectivamente son más pequeños debido a que el carbón activado retuvo en su superficie algunas especies de XO_s ácidos. Para el caso de las polidispersidad se mantiene > 1 , indicando variedad de cadenas y especies de XO_s (Montané et al., 2006).

El aspecto del espectro es similar al del hidrolizado de raquis de palma (**Figura 19**) y difiere del de bagazo de caña de azúcar debido a la presencia de una amplia variedad de oligómeros y de familias de XO_s neutros sin sustituyentes, ácidos con sustituyente 4-O-metil-D-glucurónico y xilooligosacáridos neutros y ácidos con grupos acetilo como sustituyentes.

Figura 21

A) Espectro de masas ESI-IT de la muestra obtenida a partir del tratamiento con carbón activado de raquis de palma africana, modo ionización positivo, full scan, B) acercamiento en la región de m/z 400-1000





En el espectro ESI de la fracción con carbón activado, se puede observar la presencia de grupos o especies de xilo-oligosacáridos neutros y la ausencia de varias cadenas de XO_s ácidos acetilados. Entre las especies detectadas se encuentran series de iones de aductos de sodio $[M+Na]^+$ como: (◆)-Xil₂₋₇, (◇)-Xil₂₋₇Ac₁, (◇)-Xil₃₋₆Ac₂, (●)-Xil₂₋₅AMeGlc, (▼)-Xil₂₋₄Ac₁AMeGlc y (▼)-Xil₃Ac₂AMeGlc. También se identificaron aductos de amonio $[M+NH_4]^+$ que corresponden a las series del XO_s neutros, neutros acetilados y ácidos, a saber: (•)-Xil₃₋₇, (★)-Xil₃₋₆Ac₁, (★)-Xil₄₋₅Ac₂ y (■)-Xil₂AMeGlc. En este espectro (**Figura 21**), se identificaron un total de 36 xilo-oligosacáridos, 27 XO_s neutros y 9 ácidos (**Tabla 4**). Además, se reporta el grado máximo de polimerización (GP).

En la muestra de hidrolizado inicial de raquis de palma obtenida luego del tratamiento con carbón activado, se identificaron las mismas especies de XO_s, comparada con la muestra sin

tratamiento (**Tabla 4**). La muestra obtenida luego del tratamiento con carbón activado posee las mismas especies de xilo-oligosacáridos neutros y sus respectivos acetilados. Aún así, las especies de xilo-oligosacáridos ácidos y sus acetilados identificados como $[M+Na]^+$ y $[M+NH_4]^+$, disminuyeron.

En la **Figura 21 A**), se observa que los iones más abundantes en el espectro de masas están ubicados en zonas de masas bajas. La señal m/z 97 corresponde a un aducto protonado, $[M+H]^+$, y se etiquetó como furfural ($C_5H_4O_2$) (Vinueza et al., 2015). El ion en m/z 275, tal como se explicó anteriormente, corresponde a polipropileno (C_3H_6)_n, identificado como un aducto de sodio, y posiblemente fue adquirido en el proceso de filtrado de las muestras (**Figura 20**).

En el tratamiento con carbón activado, se retuvo 17 especies de XOs ácidos (**Tabla 4**). La efectividad del tratamiento con carbón activado se debe principalmente a la capacidad de adsorción que posee el adsorbente (carbón activado), la carga neta presente en los adsorbatos, las interacciones de los solutos con el solvente *e.g.* Compuestos de degradación y XOs, la superficie del carbón activado y el pH que se manejó durante el proceso de purificación (Montané et al., 2006; Xu et al., 2019). Luego del proceso de autohidrólisis, el hidrolizado crudo inicial de raquis presenta una alta concentración de iones hidrógeno (pH bajo), por lo que la superficie del carbón activado se carga positivamente y los XOs ácidos van a quedar con una distribución de carga negativa, debido a la ionización de los sustituyentes ácidos glucurónicos (AMeGlc) en la estructura de los XOs ácidos, por lo tanto, habrá más interacciones electrostáticas entre el adsorbente y los adsorbatos (Xu et al., 2019).

Tabla 4

XO_s neutros, neutros acetilados, ácidos y acetilados ácidos identificados como aductos de sodio y amonio en el espectro ESI de la fracción al tratamiento con carbón activado al hidrolizado de raquis de palma africana

| Xilo-oligosacáridos | n-Residuos de xilosa | Grado máximo de polimerización (GP) | Especie química Detectada | Rango m/z |
|---|-----------------------------|--|-------------------------------------|------------------|
| Xilo-oligosacáridos neutros | | | | |
| Xil _n | 2-7 | 7 | [M + Na] ⁺ | 305-965 |
| | 3-7 | 7 | [M + NH ₄] ⁺ | 432-960 |
| Xilo-oligosacáridos neutros acetilados (Ac_m) | | | | |
| Xil _n Ac ₁ | 2-7 | 7 | [M + Na] ⁺ | 347-1007 |
| | 3-6 | 6 | [M + NH ₄] ⁺ | 474-870 |
| Xil _n Ac ₂ | 3-6 | 6 | [M + Na] ⁺ | 521-917 |
| | 4-5 | 6 | [M + NH ₄] ⁺ | 648-912 |
| Xilo-oligosacáridos ácidos (AMeGlc) | | | | |
| Xil _n AMeGlc | 2-5 | 5 | [M + Na] ⁺ | 495-891 |
| | 2 | 2 | [M + NH ₄] ⁺ | 490 |
| Xilo-oligosacáridos acetilados ácidos (Ac_mAMeGlc) | | | | |
| Xil _n Ac ₁ AMeGlc | 2-4 | 4 | [M + Na] ⁺ | 537-801 |
| | - | - | [M + NH ₄] ⁺ | - |
| Xil _n Ac ₂ AMeGlc | 3 | 3 | [M + Na] ⁺ | 711 |
| | - | - | [M + NH ₄] ⁺ | - |

Adicionalmente, y con respecto a los subproductos de la autohidrólisis (furfural, HMF, y ramnosa) reportados en la **Sección 5.3**, debido a que estos compuestos de degradación son especies químicas neutras (Heinonen y Sainio, 2013), interactúan con interacciones hidrofóbicas en la

superficie del carbón activado, de esta manera el adsorbente retuvo estos compuestos en su superficie (Montané et al., 2006).

5.5. Caracterización de la fracción obtenida mediante el tratamiento con resinas de intercambio iónico del hidrolizado inicial de raquis de palma por espectrometría de masas ESI-QIT

5.5.1. Tratamiento con resina de intercambio catiónico ácido fuerte (H^+)

Con el objetivo de eliminar compuestos de interferencia remanentes luego del proceso de purificación con carbón activado al hidrolizado inicial de raquis de palma (**Sección 5.4.**) y así poder obtener XOs con un grado de pureza mayor, el segundo paso en la ruta de purificación fue el tratamiento con resina de intercambio catiónico (ácido fuerte, H^+).

En la **Figura 22B**), en el acercamiento m/z 300-1000, aunque la abundancia de los iones detectados fue baja comparada con el ion pico de base -contaminante- se puede observar una distribución de peso molecular del polímero (MWD) de varias especies o grupos de XOs neutros y XOs neutros acetilados, con valores de M_n y M_w de 655 y 703, respectivamente. Además, se obtuvo una polidispersidad PD: 1,1, manteniendo variedad de cadenas y especies de XOs. Para el caso de la disminución de los promedios en peso y número (M_n y M_w), se debe principalmente a la pérdida de XOs ácidos durante los pasos de purificación de los XOs obtenidos a partir del hidrolizado inicial de raquis de palma.

La **Figura 22** muestra un espectro de masas ESI *full scan* de la segunda fracción obtenida a partir del tratamiento con resina de intercambio catiónico ácido fuerte, en modo ionización positivo en el rango de m/z 70 a 2000. El aspecto del espectro es similar al del estándar de xilano (**Figura**

15) debido a la presencia de un rango amplio de oligómeros y de familias de XOs neutros, neutros acetilados y ácidos. Entre las especies detectadas se encuentran series de iones de aductos de sodio $[M+Na]^+$ como: (\blacklozenge)-Xil₂₋₇, (\blacklozenge)-Xil₂₋₇Ac₁, (\blacklozenge)-Xil₃₋₅Ac₂ y (\bullet)-Xil₂₋₄AMeGlc. También se identificaron aductos de amonio $[M+NH_4]^+$ que corresponden a las series de XOs neutros y neutros acetilados, a saber: (\bullet)-Xil₃₋₆, (\blackstar)-Xil₃₋₆Ac₁, (\blackstar)-Xil₄₋₅Ac₂. Se identificaron un total de 28 xilo-oligosacáridos, 25 XOs entre las especies neutras y acetiladas, y 3 ácidos. Además, se reporta el grado máximo de polimerización (GP), los cuales se agrupan en la **Tabla 5** (Ho et al., 2014; A. Reis et al., 2003). En el espectro no se identificó especies de XOs ácidos como aductos de amonio.

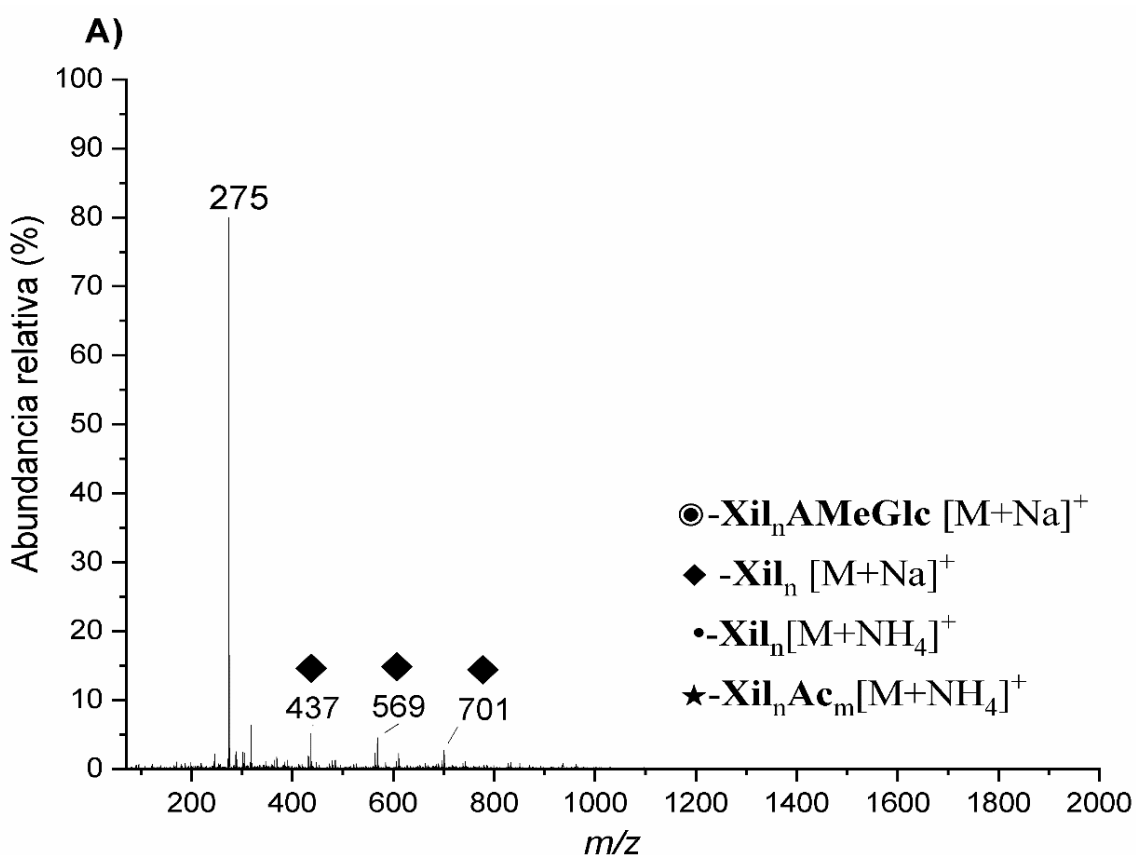
En el acercamiento de la **Figura 22B** también se observa que las series de iones, tanto aductos de sodio $[M+Na]^+$ como de amonio $[M+NH_4]^+$, presentan la diferencia característica de 132 Da que confirma la presencia de xilosa (A. Reis et al., 2003; Ana Reis et al., 2005). En el espectro de masas de la **Figura 22B** los iones más abundantes corresponden a la serie de aductos de sodio $[M+Na]^+$ en m/z 437, 569, 701, 833 y 965, atribuidos a especies del tipo (\blacklozenge)-Xil₃₋₇ con un grado de polimerización (GP) de hasta 7 residuos de xilosa (Ana Reis et al., 2005). Por otra parte, la serie de iones en m/z 432, 564, 696 y 828, también con 132 Da de diferencia, corresponde a aductos de amonio $[M+NH_4]^+$ con estructura similar a la de los aductos de sodio. Estos iones se atribuyen a las series (\bullet)-Xil₃₋₆ con un grado de polimerización (GP) de hasta 6 residuos de xilosa.

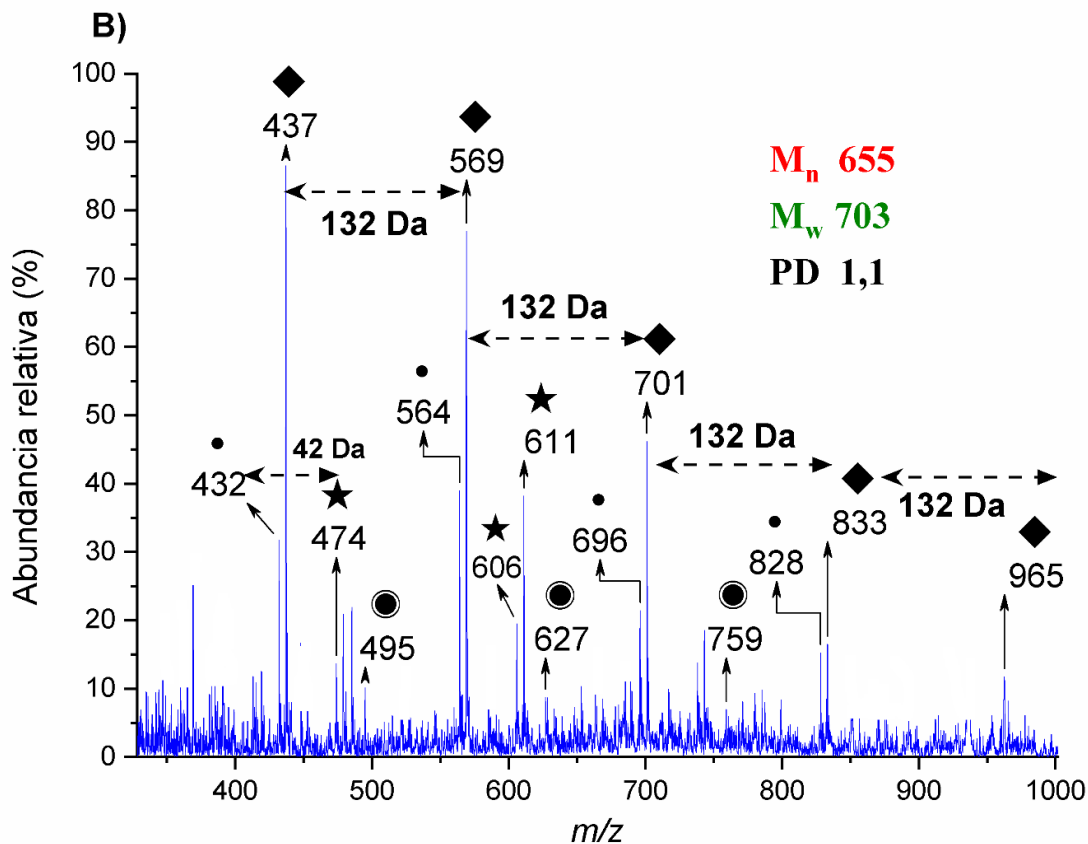
En la **Figura 22 B** los iones como aductos de amonio en m/z 474, 606, 738 y 870 atribuidos a especies del tipo (\blackstar) Xil₃₋₆Ac₁ con diferencias de 132 Da y la característica de poseer diferencias de 42 Da por cada grupo acetilo (Ac) que se le añade a la estructura, (Pu et al., 2016; Quéméner et al., 2015; Ana Reis et al., 2002, 2005). Los grupos Ac pueden estar presentes como una ramificación o sustituyendo un hidrogeno en el hidroxilo del residuo del xilosa, principalmente en la posición 1 o 2 del anillo (Ana Reis et al., 2005).

Los únicos iones identificados para xilo-oligosacáridos ácidos como aductos de sodio atribuidos a especies del tipo (●) $\text{Xil}_{2-4}\text{AMeGlc}$ presentes en el espectro y en el acercamiento de la **Figura 22B**), son m/z 495, 627 y 759 con 132 Da de diferencia entre ellos y 58 Da de diferencia entre los XO_s neutros sodiados. La diferencia de 58 Da se debe a la presencia de ácido glucurónico como sustituyente (AMeGlc: 58 Da) (Ana Reis et al., 2005).

Figura 22

A) Espectro de masas ESI-IT de la muestra purificada con resina de intercambio catiónico ácido fuerte de raquis de palma africana, modo ionización positivo Full Scan. B) zoom de m/z 400-1000





El subproducto furfural remanente que no fue retirado durante del proceso de purificación con carbón activado (**Sección 5.4.**), fue removido en su totalidad gracias a la resina de intercambio iónico ácido fuerte (H^+) (**Figura 22A**)) (Heinonen y Sainio, 2013). El furfural al ser una molécula neutra y aromática pudo ser adsorbido en la superficie de la matriz de la resina PS/DVB (**Figura 8**), debido a interacciones electrostáticas fuertes y débiles de Van Der Waals, de tipo London, dipolo-dipolo y ion-dipolo (Heinonen y Sainio, 2013).

Las interacciones de tipo London, dependen de la estructura molecular del adsorbato (en este caso el furfural) y de la estructura de la resina, *i.e.* las regiones aromáticas que hacen parte de la resina (**Figura 8**). El componente aromático del furfural, permite fácilmente las interacciones de tipo London y por lo tanto una adsorción fuerte (Heinonen y Sainio, 2013).

Tabla 5

XO_s neutros, neutros acetilados y ácidos identificados como aductos de sodio y amonio en el espectro ESI de la fracción al tratamiento con resina de intercambio catiónico ácido fuerte al hidrolizado de raquis de palma africana

| Xilo-oligosacáridos | n-Residuos de Xilosa | Grado máximo de polimerización (GP) | Especie química detectada | Rango m/z |
|--|-----------------------------|--|-------------------------------------|------------------|
| Xilo-oligosacáridos neutros | | | | |
| Xil _n | 2-7 | 7 | [M + Na] ⁺ | 305-965 |
| | 3-6 | 6 | [M + NH ₄] ⁺ | 432-828 |
| Xilo-oligosacáridos neutros acetilados (Ac_m) | | | | |
| Xil _n Ac ₁ | 2-7 | 7 | [M + Na] ⁺ | 347-1007 |
| | 3-6 | 6 | [M + NH ₄] ⁺ | 474-870 |
| Xil _n Ac ₂ | 3-5 | 5 | [M + Na] ⁺ | 521-785 |
| | 4-5 | 5 | [M + NH ₄] ⁺ | 648-780 |
| Xilo-oligosacáridos ácidos (AMeGlc) | | | | |
| Xil _n AMeGlc | 2-4 | 4 | [M + Na] ⁺ | 495-759 |
| | - | - | [M + NH ₄] ⁺ | - |

Las interacciones de tipo dipolo-dipolo, se pueden dar entre las moléculas de furfural y el solvente que se utilizó durante el proceso, en este caso agua. Las interacciones de tipo dipolo-dipolo son interacciones fuertes que dan como consecuencia la posible formación de coágulos, lo que provoca la salida del furfural de la fase resina-solución. En el último caso posible de interacciones del subproducto furfural con la resina, la interacción ion-dipolo es una de las más posibles, debido a que la resina de intercambio catiónico posee en su estructura el grupo sulfónico (SO₃⁻) y este al ser un anión puede interactuar con el furfural en la región con baja densidad electrónica que posee la molécula y de esta manera ser retenido (Heinonen y Sainio, 2013).

De manera similar algunos XOs ácidos y neutros pudieron ser retenidos por la resina de intercambio catiónico ácido fuerte, debido a interacciones de tipo Van Der Waals y no a un posible intercambio iónico. En el caso de los XOs ácidos, la región ionizada con una carga negativa en el carboxilo (COO^-) del ácido 4-O-metil-D-glucurónico (AMeGlc), no entra en la región interna de la resina debido a interacciones de carácter repulsivo entre las cargas negativa del anión carboxilo del sustituyente en el xilo-oligosacárido y el grupo funcional sulfónico de la resina. Sin embargo, hay una posible interacción de tipo dipolo-dipolo inducido entre el XOs y la superficie de la resina. Los XOs neutros que se adsorbieron en la resina, los hicieron de manera similar al furfural debido a que estos si lograron entrar en los poros de la resina e interaccionar con fuerzas tipo London entre los anillos constituyentes de la cadena de xilo-oligosacárido y la superficie interna de PS/DVB (**Figura 8**) de la resina, logrando así retenerse (Heinonen y Sainio, 2013).

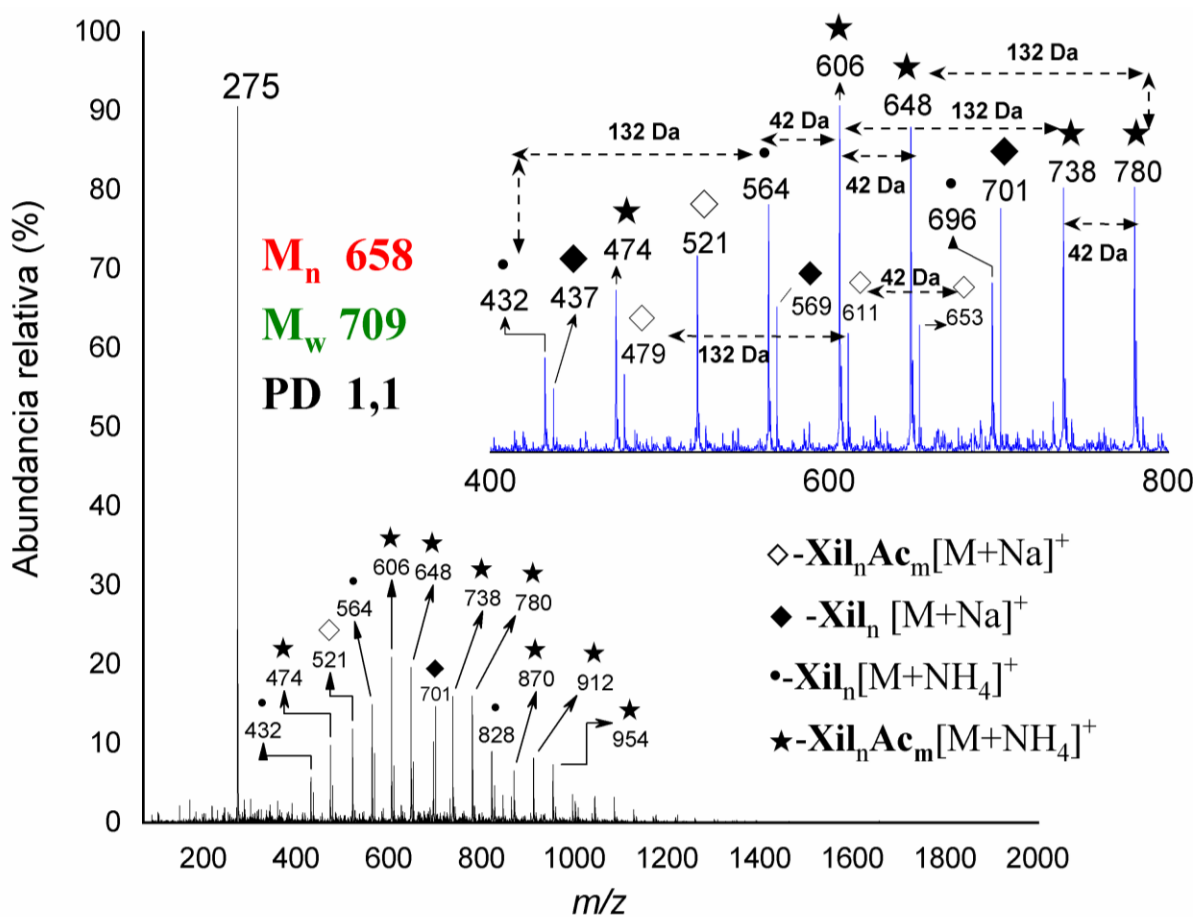
5.5.2. Tratamiento con resina de intercambio aniónico base fuerte (OH^-) liofilizada

Este es el último paso propuesto por el grupo de investigación INTERFASE de la escuela de ingeniería química de la Universidad Industrial de Santander (Guerrero Serrano, 2018), como tratamiento de purificación al hidrolizado inicial de raquis de palma. En este tratamiento se termina de retirar los interferentes que el tratamiento con carbón activado y resina de intercambio catiónico ácido fuerte (H^+) no removieron.

La (**Figura 23**), se puede observar una distribución de peso molecular del polímero (MWD) de varias especies o grupos de XOs neutros y acetilados con valores de M_n y M_w de 658 y 709, respectivamente, con una polidispersidad PD 1,1. Se mantiene la variedad de especies a pesar de la remoción de algunas de ellas como los XOs ácidos.

Figura 23

Espectro de masas ESI-IT de la muestra purificada con resina de intercambio aniónico base fuerte (OH⁻) de raquis de palma africana, modo ionización positivo Full Scan y acercamiento en la región en m/z 400-800



La **Figura 23** muestra un espectro de masas ESI *full scan* de la tercera fracción obtenida a partir del tratamiento con resina de intercambio aniónico base fuerte, en modo ionización positivo en el rango de m/z 70 a 2000. El espectro (**Figura 23**) es muy similar en aspecto al del estándar de xilano, se puede observar la presencia de grupos o especies de xilo-oligosacáridos neutros y neutros acetilados las cuales fueron identificados en el espectro (**Figura 15**).

Tabla 6

XOs neutros y neutros acetilados identificados como aductos de sodio y amonio en el espectro ESI de la fracción al tratamiento con resina de intercambio aniónico base fuerte al hidrolizado de raquis de palma africana

| Xilo-oligosacáridos | n-Residuos de Xilosa | Grado máximo de polimerización (GP) | Especie química Detectada | Rango <i>m/z</i> |
|--|-----------------------------|--|-------------------------------------|-------------------------|
| Xilo-oligosacáridos neutros | | | | |
| Xil _n | 2-7 | 7 | [M + Na] ⁺ | 305-965 |
| | 3-6 | 6 | [M + NH ₄] ⁺ | 432-828 |
| Xilo-oligosacáridos neutros acetilados (Ac_m) | | | | |
| Xil _n Ac ₁ | 2-7 | 7 | [M + Na] ⁺ | 347-1007 |
| | 3-6 | 6 | [M + NH ₄] ⁺ | 474-870 |
| Xil _n Ac ₂ | 3-5 | 5 | [M + Na] ⁺ | 521-785 |
| | 4-5 | 5 | [M + NH ₄] ⁺ | 648-780 |

Entre las especies detectadas se encuentran series de iones de aductos de sodio [M+Na]⁺ como: (♦)-Xil₂₋₇, (◇)-Xil₂₋₇Ac₁ y (◇)-Xil₃₋₅Ac₂. También se identificaron aductos de amonio [M+NH₄]⁺ que corresponden a las series de XOs neutros y neutros acetilados, a saber: (●)-Xil₃₋₆, (★)-Xil₃₋₆Ac₁, (★)-Xil₄₋₅Ac₂. En total se identificaron 25 XOs de las especies neutras y acetiladas (**Figura 23**), los cuales se agrupan en la **Tabla 6**, con su respectivo grado máximo de polimerización (GP) (Ho et al., 2014; A. Reis et al., 2003).

En la **Figura 23**, los iones como aductos de amonio en *m/z* 432, 564, 696 y 828 atribuidos a especies del tipo (●) Xil₃₋₆ con diferencias de 132 Da entre las señales de las series se debe a la adición de unidades de xilosa a las cadenas del oligosacárido (Ana Reis et al., 2005). La serie de

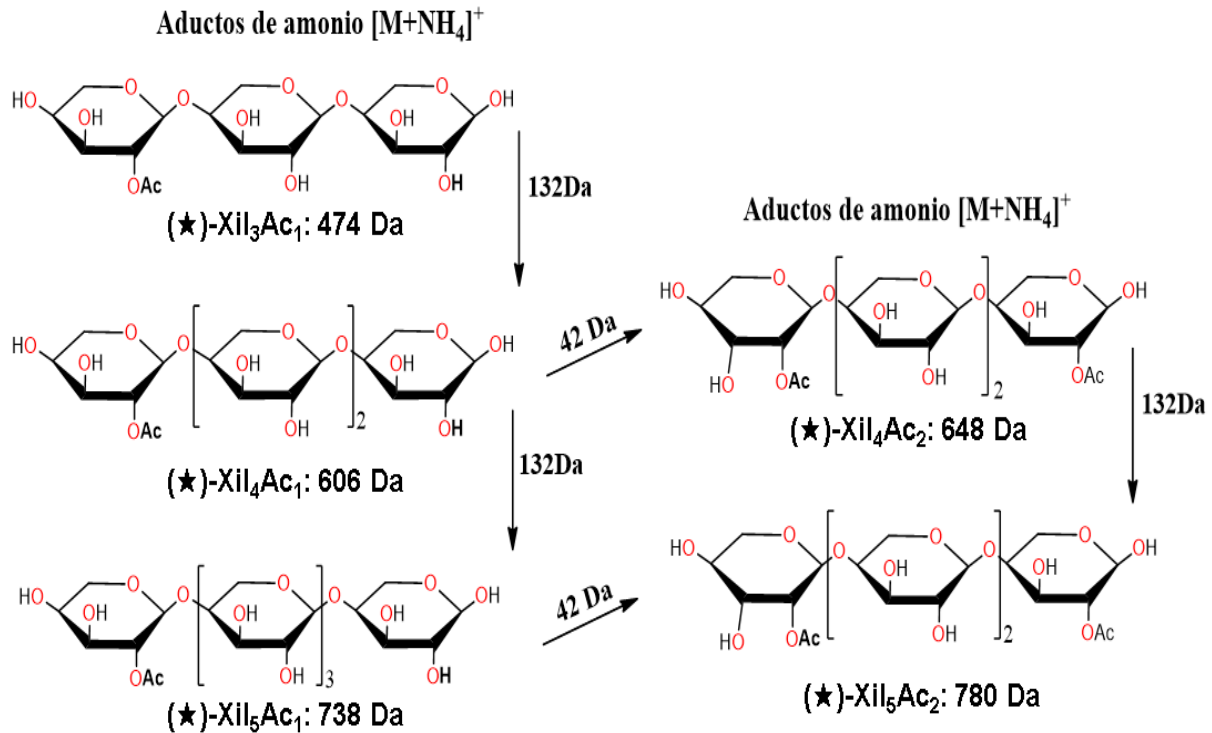
aductos de amonio $[M+NH_4]^+$ en m/z 474, 606, 738 y 870 atribuidos a especies del tipo (★) $Xil_{3-6}Ac_1$ (**Figura 24**), acetilados por sustitución de un átomo de hidrógeno en la posición 1 o 2 del anillo de xilosa por un grupo acetilo (CH_3CO-). En esta serie también se observa la diferencia característica de 132 Da (anillo de pentosa xilosa). Los iones m/z 648 y 780 son aductos de amonio $[M+NH_4]^+$ atribuidos a especies del tipo (★) $Xil_{4-5}Ac_2$, doblemente acetilados (Ac) con 132 Da de diferencia entre ellos, pero poseen diferencias de 84 y 42 Da respectivamente entre los XOs neutros y los XOs neutros acetilados, esto debido a que en su estructura hay dos grupos acetilos como sustituyentes enlazados a un anillo de xilosa (**Figura 24**).

Los iones sodiados $[M+Na]^+$, en m/z 437, 569, 701 y 833, representados como especies del tipo (◆) Xil_{3-6} , con estructura similar a los aductos de amonio. Cada ion tiene la característica diferencia de 132 Da. También existen aductos de XOs neutros acetilados como aductos de sodio con un grupo acetilo (◇) $Xil_{3-6}Ac_1$ representados en m/z 479, 611, 743 y 875 y dos grupos acetilo como sustituyentes (◇) $Xil_{3-5}Ac_2$, representados en m/z 521, 653 y 785.

La resina de intercambio aniónico base fuerte (OH^-), fue útil para remover los XOs ácidos remanentes que quedaron en el paso anterior con el uso de la resina de intercambio catiónico (**Sección 5.5.1, Tabla 5**). El grupo carboxilo (COO^-) del ácido 4-O-metil-D-glucurónico (AMeGlc) está presente como un anión en la fase resina-solución y de esta manera es posible el intercambio iónico en la resina, uniéndose fácilmente al grupo funcional (amonio cuaternaria NR_4^+) presente en la estructura de PS/DVB (Huber y Bonn, 2002).

Figura 24

Series de aductos de amonio [M+NH₄]⁺ de xilo-oligosacáridos neutros acetilados de tipo (Xil_nAc_m), observados en el espectro de masas ESI



Los XO_s extraídos y purificados de raquis de palma africana, se reportan por el grupo INTERFASE con alrededor de un 80% de pureza (Guerrero Serrano, 2018), más que los valores reportados por la empresa de productos nutricionales NutriCology®. Los cuales producen xilo-oligosacáridos derivados de la mazorca del maíz con porcentaje de pureza de 70%. Por lo tanto, se pueden obtener XO_s derivados de otras fuentes agrícolas como el raquis de palma africana y obtener un grado de pureza mayor.

5.6. Fragmentación de xilo-oligosacáridos ácidos acetilados y xilo-oligosacáridos neutros acetilados

La espectrometría de masas tándem (MS^n) es una herramienta fundamental para la elucidar la estructura de biomoléculas como oligosacáridos, péptidos e incluso proteínas (Gross, 2017; Zaia, 2004). Con los espectros tándem se logra obtener una huella digital o patrón característico de fragmentación. También se puede determinar el tipo de sustituyentes o grupos funcionales presentes *e.g.* monosacáridos, grupos acetilo y grupos ácidos (Ana Reis et al., 2002, 2005). El analizador de masas de trampa iónica cuadrupolar (QIT) del equipo *Amazon X* (*Bruker Daltonics, Billerica MA, USA*) permite realizar experimentos de espectrometría de masas tándem en tiempo (Cole, 1997; Gross, 2017; Zaia, 2004). Para estos experimentos se seleccionaron las señales en m/z 537 y 479, que corresponden a aductos de sodio de XO_s ácidos acetilados ($Xil_nAc_mAMeGlc$) y XO_s neutro acetilado (Xil_nAc_m), respectivamente. Estos iones están presentes en casi todos los espectros full scan, desde el estándar de xilano hasta las muestras de XO_s de raquis de palma.

5.6.1. Fragmentación del ion aducto $[M+Na]^+$ en m/z 537 correspondiente al tipo $Xil_nAc_mAMeGlc$

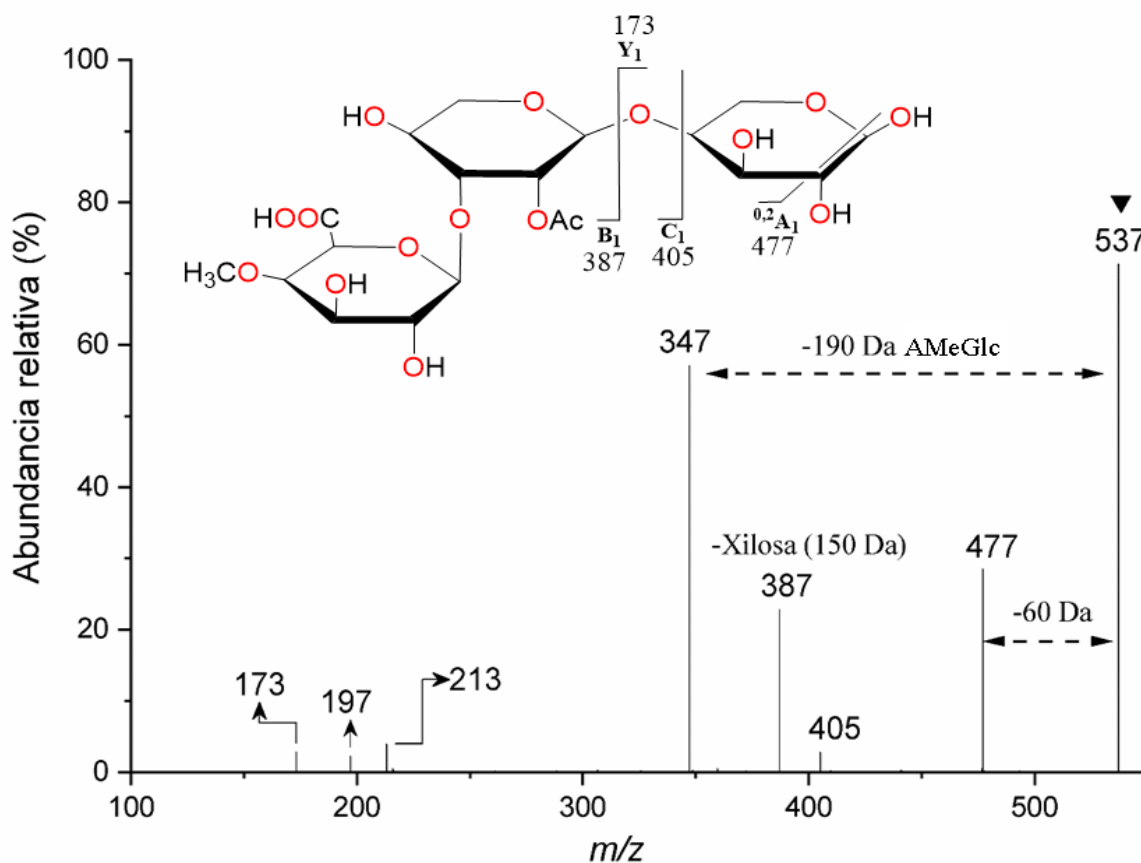
Del análisis expuesto en secciones anteriores, se propone que el aducto de sodio $[M+Na]^+$ en m/z 537 corresponde a un xilo-oligosacárido ácido monoacetilado de tipo $Xil_nAc_mAMeGlc$ (**Figura 25**). Este ion está presente en los espectros de los hidrolizados crudos iniciales del bagazo de caña de azúcar y de raquis de palma africana (**Figuras 18 y 19**). Igualmente, este ion aparece en el producto de la primera etapa de purificación con carbón activado del hidrolizado crudo de raquis de palma (**Figura 21**).

De acuerdo con la estructura propuesta para el ión en m/z 537 (**Figura 25**), el grupo acetilo puede estar ubicado en tres posiciones diferentes, lo que unido a las posibles posiciones del grupo AMeGlc, resulta en 6 isómeros probables para el ion $[\text{Xil}_2\text{Ac}_1\text{AMeGlc}+\text{Na}]^+$. Estos isómeros se pueden reducir a 4 estructuras posibles (**Figura 26**) si no se tiene en cuenta la ubicación del grupo acetilo en los carbonos C₂ o C₃ del anillo de xilosa. En el espectro CID MS² de la **Figura 25**, el ion en m/z 347 es el más abundante y corresponde a la pérdida del grupo ácido (AMeGlc (190Da)) como molécula neutra. Los iones en m/z 387 y 405 se deben, respectivamente, a la pérdida de una molécula de xilosa (150 Da) y a un residuo de xilosa (132 Da). Estas pérdidas sugieren la existencia de residuos de xilosa libres de grupo acetilo y de ácido metil glucurónico en el ión en m/z 537. Esto significa que de acuerdo con la **Figura 26**, las especies I y II probablemente representen la estructura del ión en m/z 537.

Según la nomenclatura Domon y Costello (**Figuras 10 y 11**, sección 2.7.1.), la estructura I puede dar lugar a iones tipo B, C y Y. El ion tipo B se forma debido a la escisión del enlace O-glucosídico y posterior pérdida de una molécula de xilosa (150 Da) hacia el extremo no reductor. La formación del ion tipo Y corresponde a la pérdida de un residuo de xilosa (Xil_{res} + Grupo acetilo + Grupo ácido 364 Da) hacia el extremo reductor. Finalmente, la formación de un ion tipo C se debe a la pérdida de un residuo de xilosa (Xil_{res} 132Da) hacia el extremo no reductor de la molécula.. Además, el isómero I puede sufrir fragmentación a través del anillo en el extremo reductor para producir un ion de tipo ^{0,2}A (-60 Da), lo que indica la pérdida de una molécula neutra con formula molecular C₂O₂H₄ y estructura HOHC=CHOH (**Figura 11**, sección 2.7.1.).

Figura 25

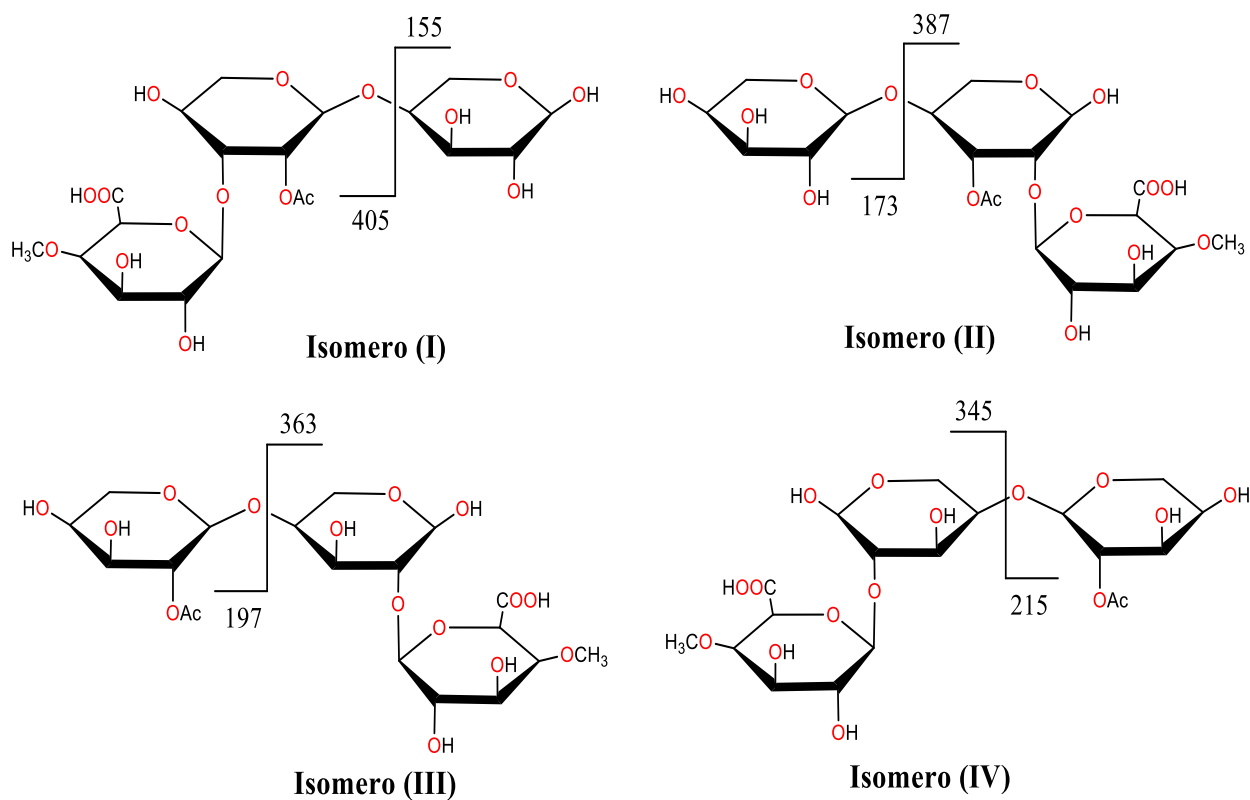
Espectro ESI-MS/MS del ion $[M+Na]^+$ con estructura $Xil_2Ac_1AMeGlc$ en m/z 537



Los isómeros con estructuras III y IV (**Figura 26**) no se encuentran en el espectro de fragmentación *MS/MS* debido a una muy poca abundancia de los iones m/z 363 (pérdida de $-Xil_{res}+$ Grupo acetilo (174 Da)) y el ion m/z 345 (pérdida de xilosa + Grupo acetilo (192 Da)), esto sugiere que tanto los grupo acetilo como los grupos ácidos siempre están juntos en un residuo de xilosa en la posición 2 y 3 del anillo (Chemin et al., 2015; Moure et al., 2006). Los iones m/z 173, 197 y 213 se atribuyen a los monómeros de $[Xil+Na]^+$, $[XilAc+Na]^+$ y $[AMeGlc+Na]^+$, respectivamente (Ana Reis et al., 2005).

Figura 26

Isómeros estructurales de la especie química $[M+Na]^+$ en m/z 537

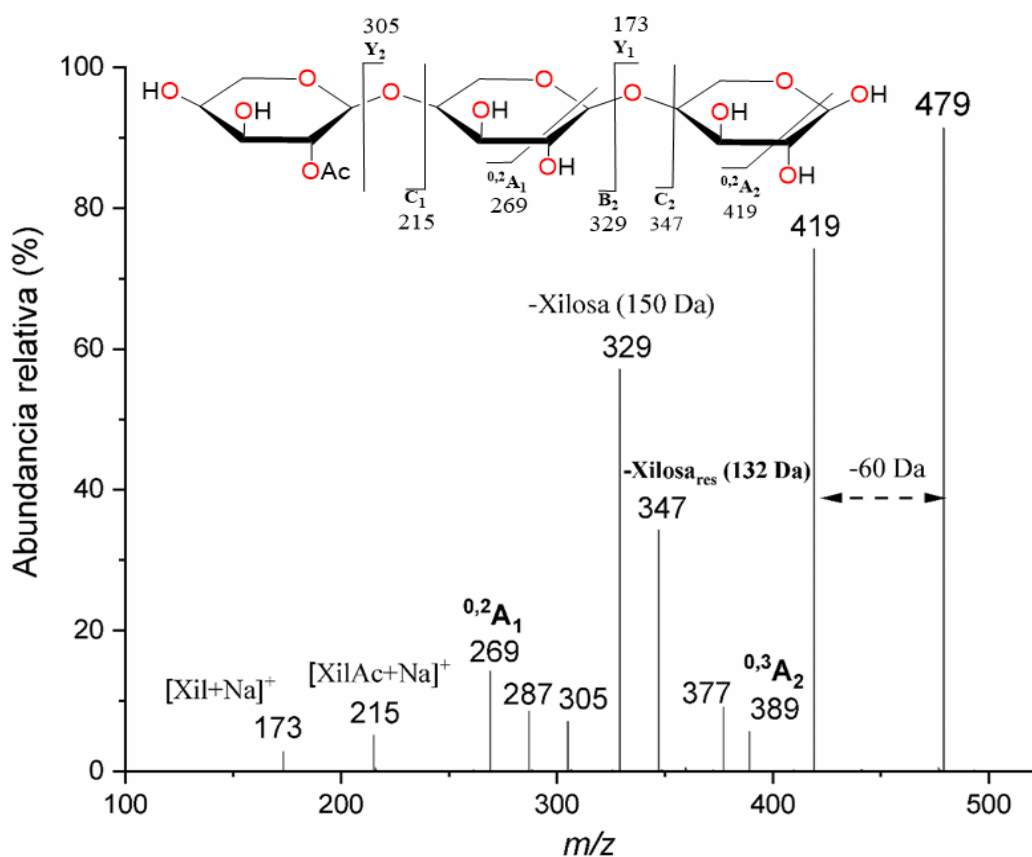


5.6.2. Fragmentación del ion aducto $[M+Na]^+$ en m/z 479 correspondiente al tipo Xil_nAc_m

Del análisis expuesto en secciones anteriores, se propone que el aducto de sodio $[M+Na]^+$ en m/z 479 corresponde a un xilo-oligosacárido monoacetilado de tipo Xil_nAc_m (**Figura 27**). Este ion está presente en los espectros del estándar de xilano (**Figura 15**), en el hidrolizado crudo inicial de raquis de palma africana (**Figura 19**). Igualmente, este ion aparece en el producto de la primera etapa de purificación con carbón activado del hidrolizado crudo de raquis de palma (**Figura 21**) y los tratamientos con resinas de intercambio iónico ácido y base fuertes respectivamente (**Figuras 22 y 23**).

Figura 27

Espectro ESI-MS/MS del ion $[M+Na]^+$ con estructura Xil_3Ac_1 m/z 479

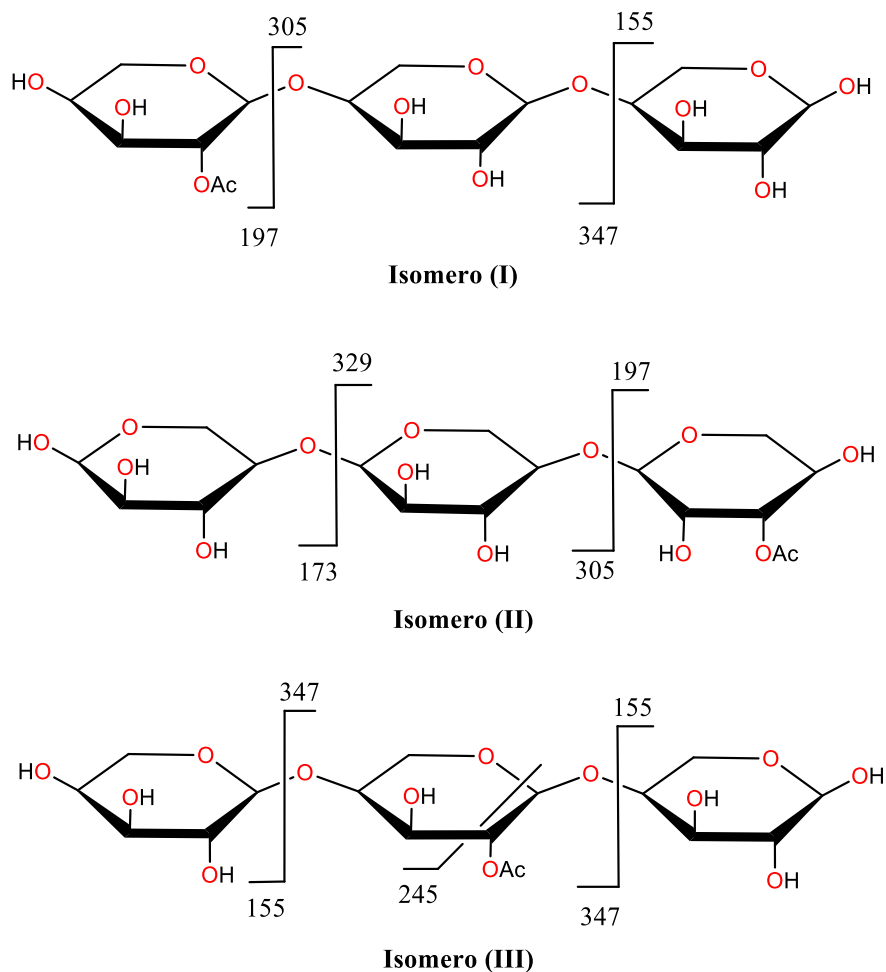


De acuerdo con la estructura propuesta para el ión en m/z 479 (**Figura 27**), el grupo acetilo puede estar ubicado en seis posiciones diferentes, resultando en 6 isómeros probables para el ion $[Xil_2Ac_1+Na]^+$. Estos isómeros se pueden reducir a 3 estructuras posibles (**Figura 28**) si no se tiene en cuenta la ubicación del grupo acetilo en los carbonos C_2 o C_3 del anillo de xilosa. En el espectro CID MS^2 de la **Figura 28**, el ion en m/z 419 es el más abundante y corresponde a la pérdida del grupo acetilo (60Da) como molécula neutra (Isómero I). Los iones en m/z 347 y 329 se deben, respectivamente, a la pérdida de moléculas neutra de Xil_{res} (132 Da) y de xilosa (150 Da). Estas pérdidas sugieren la existencia de residuos de xilosa libres de grupo acetilo en el ión en

m/z 479. Esto significa que de acuerdo con la **Figura 28**, las especies I y II probablemente representen la estructura del ión en m/z 537.

Figura 28

Isómeros estructurales de la especie química en m/z 479



Según la nomenclatura Domon y Costello (**Figuras 10 y 11**, sección 2.7.1.), la estructura I puede dar lugar a iones tipo B, C, Y y Z. El ion tipo B se forma debido a la escisión del enlace O-glucosídico y posterior pérdida de una molécula de xilosa (150 Da) hacia el extremo no reductor. La formación de iones tipo Y corresponde a la pérdida de un residuo de xilosa ($Xil_{res} + \text{Grupo acetilo } 174 \text{ Da}$) y dos residuos de xilosa ($2Xil_{res} + \text{Grupo acetilo } 306 \text{ Da}$) respectivamente hacia el

extremo reductor. La formación de dos iones tipo C se debe a la pérdida de un residuo de xilosa (Xil_{res} 132Da) y dos residuos de xilosa ($2Xil_{res}$ 264 Da) respectivamente hacia el extremo no reductor de la molécula.

Finalmente, el ion en m/z 287 es un tipo Z, este ion es formado por la pérdida de una molécula neutra de xilosa acetilada (Xilosa + Grupo acetilo 194 Da). Además, el isómero I puede sufrir fragmentación a través del anillo en dos anillos diferentes de xilosa, ambos hacia el extremo reductor para producir un iones de tipo $^{0,2}A$ (-60 Da) y lo que indica la pérdida de una molécula neutra con formula molecular $C_2O_2H_4$ y estructura $HOHC=CHOH$ (**Figura 11**, sección 2.7.1.) (Ana Reis et al., 2002, 2005). Por último, el ion representado por la señal en m/z 389, es debido a la pérdida de 90 Da y se da en el anillo de xilosa ubicado hacia el extremo reductor de la cadena con formación del ion tipo $^{0,3}A$.

6. Conclusiones

El estándar de xilano al 90% de pureza derivado de mazorca de maíz y la muestra del hidrolizado inicial del bagazo de caña de azúcar, extraído bajo las mismas condiciones que el raquis de palma, fueron los compuestos de referencia utilizados. En la identificación, se observó la presencia de familias o grupos de xilo-oligosacáridos neutros (Xil_n), ácidos ($Xil_nAMeGlc$) y sus correspondientes acetilados (Xil_nAc_m y $Xil_nAc_mAMeGlc$). El análisis de muestras estándar permitió establecer el tipo de XOs presentes, así como las condiciones operacionales para la detección e identificación de estos oligómeros de bajo a mediano peso molecular.

El carbón activado utilizado como material adsorbente en la ruta de purificación, retuvo especies interferentes como furfural $[C_5H_4O_2+H]^+$ m/z 97, hidroximetilfurfural HMF, $[C_6H_6O_3+2Na-H]^+$ m/z 171, monosacáridos ramnosa $[C_6H_{12}O_5+H]^+$ m/z 165 y XOs ácidos mediante procesos de adsorción. Al final del proceso con carbón activado, se recuperaron la mayoría de los compuestos de interés comercial *i.e.*, XOs neutros y acetilados $[Xil_2+Na]^+$ m/z 305, $[Xil_3+Na]^+$ m/z 437, $[Xil_2Ac_1+Na]^+$ m/z 347 y algunos XOs ácidos.

Mediante las resinas de intercambio iónico, se logró retirar los compuestos secundarios remanentes en el hidrolizado de raquis de palma. La resina de intercambio catiónico ácido fuerte, mediante procesos de adsorción en su superficie, retiró el remanente de furfural $[C_5H_4O_2+H]^+$ m/z 97 y algunas cadenas de XOs ácidos y neutros.

La resina de intercambio aniónico base fuerte, último paso de la ruta de purificación de XOs, permitió remover XOs ácidos remanentes del paso anterior. En la fracción final obtenida, solo se identificaron XOs neutros y acetilados $[Xil_4+Na]^+$ m/z 569, $[Xil_5+NH_4]^+$ m/z 696, $[Xil_3Ac_1+Na]^+$ m/z 479, compuestos de alto valor e interés comercial.

La identificación realizada anteriormente se confirmó mediante pruebas tándem MS/MS. La estructura y ruta de fragmentación de las señales m/z 537 y 479 representadas por los XO_s ácidos acetilados (Xil₂Ac₁AMeGlc) y XO_s neutro acetilados (Xil₃Ac₁), respectivamente, fue determinada mediante pruebas tándem MS/MS. Los XO_s Xil₂Ac₁AMeGlc y Xil₃Ac₁, presentaron fragmentaciones a través del anillo de xilosa con formación de iones tipo A, y a través del enlace glucosídico con formación de iones tipo B, C, Y y Z.

La espectrometría de masas ESI-IT, es una técnica útil para la caracterización de las diferentes especies de XO_s obtenidos mediante autohidrólisis a partir de residuos agroindustriales de raquis de palma de aceite africana. Además, MS ESI permitió monitorear compuestos de degradación presentes en el hidrolizado inicial y en las fracciones de la ruta de purificación propuesta por el grupo de investigación INTERFASE, de la escuela de Ingeniería Química, de la Universidad Industrial de Santander.

Referencias Bibliográficas

- Aachary, A. A., y Prapulla, S. G. (2011). Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(1), 2–16.
- Acosta, R., Viviescas, P., Sandoval, M., y Nabarlatz, D. (2018). Autohydrolysis of sugarcane bagasse and empty fruit bunch from oil palm: Kinetics model and analysis of xylo-Oligosaccharides yield. *Chemical Engineering Transactions*, 65(1), 307–312.
- Akpinar, O., Erdogan, K., y Bostanci, S. (2009). Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. *Carbohydrate Research*, 344(5), 660–666.
- Arai, T., Biely, P., Uhliariková, I., Sato, N., Makishima, S., Mizuno, M., ... Amano, Y. (2019). Structural characterization of hemicellulose released from corn cob in continuous flow type hydrothermal reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127(2), 222–230.
- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., y Mussatto, S. I. (2014). Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3493–3503.
- Blundell, C. D., Reed, M. A. C., Overduin, M., y Almond, A. (2006). NMR spectra of oligosaccharides at ultra-high field (900 MHz) have better resolution than expected due to favourable molecular tumbling. *Carbohydrate Research*, 341(12), 1985–1991.
- Carvalho, A. F. A., Neto, P. de O., da Silva, D. F., y Pastore, G. M. (2013). Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by

chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 51(1), 75–85.

Chemin, M., Wirocius, A. L., Ham-Pichavant, F., Chollet, G., Da Silva Perez, D., Petit-Conil, M., ... Grelier, S. (2015). Well-defined oligosaccharides by mild acidic hydrolysis of hemicelluloses. *European Polymer Journal*, 66, 190–197.

Cole, R. B. (1997). *Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fundamentals Instrumentation y Applications*. New York, Estados Unidos: John Wiley y Sons, Inc.

Crompton, T. . (2006). Polymer Reference Book. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Primera). Shropshire, United Kingdom: Rapra Technology Limited.

Derrien, M., Alvarez, A.-S., y de Vos, W. M. (2019). The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends in Microbiology*, 27(12), 997–1010.

Esteban, L. (1993). *La Espectrometría de Masas en Imágenes*. Madrid, España: ACK.

Garrote, G, y Dominguez, H. (2002). Autohydrolysis of corncob: Study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. *Journal of Food Engineering*, 52(3), 211–218.

Garrote, Gil, Domínguez, H., y Parajó, J. C. (2002). Autohydrolysis of corncob: Study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. *Journal of Food Engineering*, 52(3), 211–218.

Gibson, G. R., y Roberfroid, M. (2008). *Handbook of Prebiotics*. New York, Estados Unidos: CRC Press.

Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., y Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4775–4800.

Gross, J. H. (2017). *Mass Spectrometry A Textbook Third Edition*. Gewerbestrasse, Suiza: Springer

International Publishing.

Guerrero Serrano, J. M. (2018). *Evaluación de Metodologías Para la Purificación de Hidrolizados de Biomasa Lignocelulósica Residual de la Agroindustria Colombiana (Tesis de pregrado)*.

Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Heinonen, J., y Sainio, T. (2013). Chromatographic Fractionation of Lignocellulosic Hydrolysates.

In D. Y. Murzin (Ed.), *Advances in Chemical Engineering* (pp. 261–349). Lappeenranta, Finland: Elsevier Inc.

Hernandez, A. G., y de Medina Contreras, F. S. (2010). *Tratado de nutricion: Bases Fisiologicas Y Bioquimicas De La Nutricion*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana

S.A.

Hernandez, A. G., y Lopez, M. D. R. (2010). *Tratado de nutricion Composicion Y Calidad*

Nutritiva De Los Alimentos. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana S.A.

Hernandez, O. (2012). *Desarrollo de nuevos métodos para la caracterización estructural de carbohidratos prebióticos y péptidos funcionales de interés (Tesis doctoral)*. Universidad

Autonoma de Madrid, Madrid, España.

Ho, A. L., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Roseiro, L. B., Charalampopoulos, D., y Rastall, R. A.

(2014). Production and purification of xylooligosaccharides from oil palm empty fruit bunch fibre by a non-isothermal process. *Bioresource Technology*, 152(1), 526–529.

Hoffmann, E., y Stroobant, V. (2002). *Mass Spectrometry Principles and Applications*. Chichester,

Inglaterra: John Wiley y Sons LTD.

Huber, C. G., y Bonn, G. K. (2002). Chapter 5 HPLC of Carbohydrates with Cation- and Anion-

- Exchange Silica and Resin-Based Stationary Phases. *Journal of Chromatography Library*, 66, 165–205.
- Imman, S., Arnthong, J., Burapatana, V., Laosiripojana, N., y Champreda, V. (2013). Autohydrolysis of tropical agricultural residues by compressed liquid hot water pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(8), 1982–1995.
- Kailemia, M. J., Ruhaak, L. R., Lebrilla, C. B., y Amster, I. J. (2014). Oligosaccharide Analysis by Mass Spectrometry: A Review of Recent Developments. *Anal. Chem.*, 86(1), 196–212.
- Kumar, V., y Satyanarayana, T. (2011). Applicability of thermo-alkali-stable and cellulase-free xylanase from a novel thermo-halo-alkaliphilic *Bacillus halodurans* in producing xylooligosaccharides. *Biotechnology Letters*, 33(11), 2279–2285.
- Kunz, C., y Rudloff, S. (2006). Health promoting aspects of milk oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 16(1), 1341–1346.
- Lee, C. H., Chen, K. T., Lin, J. A., Chen, Y. T., Chen, Y. A., Wu, J. T., y Hsieh, C. W. (2019). Recent advances in processing technology to reduce 5-hydroxymethylfurfural in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 93, 271–280.
- Liu, L., Ren, J., Zhang, Y., Liu, X., y Ouyang, J. (2018). Simultaneously separation of xylo-oligosaccharide and liginosulfonate from wheat straw magnesium bisulfite pretreatment spent liquor using ion exchange resin. *Bioresource Technology*, 249, 189–195.
- Lodish, H. (2005). *Biología celular y molecular*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Loos, M., Gerber, C., Corona, F., Hollender, J., Singer, H. (2015). *enviPat: Isotope Pattern Calculator (2.4) [Software]*. Retrieved from <https://www.envipat.eawag.ch/index.php>

- Manahan, S. E. (2007). *Introducción a la química ambiental*. México, México DF: Reverté.
- Matamoros Fernández, L. E., Obel, N., Scheller, H. V., y Roepstorff, P. (2003). Characterization of plant oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 38(4), 427–437.
- Mescua, L. M. (2016). *Purificación de fructooligosacáridos de yacón (Smallanthus sonchifolius Poepp. y Endl) mediante técnicas cromatográficas (Tesis de maestría)*. Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima, Perú.
- Mesías-García, M., Guerra-Hernández, E., y García-Villanova, B. (2010). Determination of furan precursors and some thermal damage markers in baby foods: Ascorbic acid, dehydroascorbic acid, hydroxymethylfurfural and furfural. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6027–6032.
- Montané, D., Nabarlantz, D., Martorell, A., Torné-Fernández, V., y Fierro, V. (2006). Removal of lignin and associated impurities from xylo-oligosaccharides by activated carbon adsorption. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 45(7), 2294–2302.
- Montaudo, G., Samperi, F., y Montaudo, M. S. (2006). Characterization of synthetic polymers by MALDI-MS. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(3), 277–357.
- Monti, L., Cattaneo, T. M. P., Orlandi, M., y Curadi, M. C. (2015). Capillary electrophoresis of sialylated oligosaccharides in milk from different species. *Journal of Chromatography A*, 1409(1), 288–291.
- Morales, S. (2015). *Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos (Tesis doctoral)*. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.

- Moure, A., Gullón, P., Domínguez, H., y Parajó, J. C. (2006). Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry*, 41(1), 1913–1923.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., y Pfaller, M. A. (2006). *Microbiologia Medica*. Madrid, España: Elsevier Mosby.
- Nabarlatz, D., Ebringerová, A., y Montané, D. (2007). Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 69(1), 20–28.
- Nutricology. (2020). Nutricology® Innovative Nutrition. Retrieved July 22, 2020, from www.nutricology.com website: <https://www.nutricology.com/xos-xylooligosaccharides-100-grams-powder>
- Peña Díaz, A. (2002). *Bioquímica*. México, México DF: Limusa.
- Previato, J. O., Wait, R., Jones, C., y Mendonça-Previato, L. (1994). Structural analysis of novel rhamnose-branched oligosaccharides from the glycoposphosphingolipids of *Leptomonas samueli*. *Glycoconjugate Journal*, 11(1), 23–33.
- Pu, J., Zhao, X., Wang, Q., Xiao, L., y Zhao, H. (2016). Structural characterization of xylo-oligosaccharides from corncob residues. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 35(6), 344–354.
- Qiang, X., YongLie, C., y QianBing, W. (2009). Health benefit application of functional oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 77(3), 435–441.
- Qing, Q., Li, H., Kumar, R., y Wyman, C. E. (2013). Xylooligosaccharides Production, Quantification, and Characterization in Context of Lignocellulosic Biomass Pretreatment. In

- C. E. Wyman (Ed.), *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals* (pp. 391–415). Chichester, West Sussex, United Kingdom: John Wiley y Sons, Ltd.
- Quéméner, B., Vigouroux, J., Rathahao, E., Tabet, J. C., Dimitrijevic, A., y Lahaye, M. (2015). Negative electrospray ionization mass spectrometry: A method for sequencing and determining linkage position in oligosaccharides from branched hemicelluloses. *Journal of Mass Spectrometry*, 50(1), 247–264.
- Quigley, E. M. . (2018). Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 17(2), 333–344.
- Reddy, S. S., y Krishnan, C. (2016). Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude β -xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their bifidogenic function. *LWT - Food Science and Technology*, 65(1), 237–245.
- Reis, A., Domingues, M. R. M., Ferrer-Correia, A. J., y Coimbra, M. A. (2003). Structural characterisation by MALDI-MS of olive xylo-oligosaccharides obtained by partial acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 53(1), 101–107.
- Reis, Ana, Coimbra, M. A., Domingues, P., Ferrer-Correia, A. J., Rosário, M., y Domingues, M. (2002). Structural characterisation of underivatized olive pulp xylo-oligosaccharides by mass spectrometry using matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray ionisation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(22), 2124–2132.
- Reis, Ana, Pinto, P., Coimbra, M. A., Evtuguin, D. V., Neto, C. P., Ferrer Correia, A. J., y Domingues, M. R. M. (2004). Structural differentiation of uronosyl substitution patterns in acidic heteroxylans by electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of the American*

Society for Mass Spectrometry, 15(1), 43–47.

Reis, Ana, Pinto, P., Evtuguin, D. V., Neto, C. P., Domingues, P., Ferrer-Correia, A. J., y Domingues, M. R. M. (2005). Electrospray tandem mass spectrometry of underivatized acetylated xylo-oligosaccharides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(23), 3589–3599.

Rivas Siota, S. (2014). *Valoración de Hemicelulosas de Biomasa Vegetal (Tesis doctoral)*. Universidad de Vigo, Vigo, España.

Samanta, A. K., Jayapal, N., Jayaram, C., Roy, S., Kolte, A. P., Senani, S., y Sridhar, M. (2015). Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(1), 62–71.

Samanta, A. K., Jayapal, N., Kolte, A. P., Senani, S., Sridhar, M., Dhali, A., ... Prasad, C. S. (2015). Process for Enzymatic Production of Xylooligosaccharides from the Xylan of Corn Cobs. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 1–8.

Sánchez Montoya, N. (2013). *Síntesis, caracterización y evaluación de una resina de intercambio catiónico con forma de empaque para una columna de destilación reactiva (Tesis de maestría)*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Santos Meneses, T. M. (2018). *Autohidrólisis y deslignificación organosolv de madera de Pinus radiata para la recuperación de hemicelulosas y lignina con aprovechamiento de la fracción celulósica por vía enzimática (Tesis doctoral)*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

Skoog, D., West M, D., Holler, F, J., y Crouch, S. R. (2005). *Fundamentos de Química Análítica*.

México, México DF: International Thomson Editores, S.A.

Szilágyi, T. G., Vecseri, B. H., Kiss, Z., Hajba, L., y Guttman, A. (2018). Analysis of the oligosaccharide composition in wort samples by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection. *Food Chemistry*, 256(1), 129–132.

Vinueza, N. R., Kim, E. S., Gallardo, V. A., Mosier, N. S., Abu-Omar, M. M., Carpita, N. C., y Kenttämä, H. I. (2015). Tandem mass spectrometric characterization of the conversion of xylose to furfural. *Biomass and Bioenergy*, 74, 1–5.

Xu, F., Chen, J., Yang, G., Ji, X., Wang, Q., y Liu, S. (2019). Combined Treatments Consisting of Calcium Hydroxide and Activate Carbon for Purification of Xylo-Oligosaccharides of Pre-Hydrolysis Liquor. *Polymers*, 11(10), 2–14.

Yuan, Q. P., Zhang, H., Qian, Z. M., y Yang, X. J. (2004). Pilot-plant production of xylo-oligosaccharides from corncob by steaming, enzymatic hydrolysis and nanofiltration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(10), 1073–1079.

Zaia, J. (2004). Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrometry Reviews*, 23(3), 161–227.