



**Evaluación de Metodologías Para la Purificación de Hidrolizados de Biomasa  
Lignocelulósica Residual de la Agroindustria Colombiana**

**José Manuel Guerrero Serrano**

**Trabajo de Grado para Optar el Título de Ingeniero Químico**

**Directora**

**Debora Alcida Nabarlatz**

**Ph.D.en Ingeniería Química**

**Codirector**

**Rolando Andrés Acosta Fernández**

**M.Sc. en Ingeniería Química**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ingenierías Físicoquímicas**

**Escuela de Ingeniería Química**

**Bucaramanga**

**2018**



### **Agradecimientos**

A la profesora Debora Nabarlatz por estos últimos 2 años de enseñanzas siendo su auxiliar y el acompañamiento para poder culminar este trabajo de grado.

A Rolando Acosta que en medio de su humor me enseñó un poco lo que es ser un investigador y a buscar soluciones a los problemas que se presenten por sí mismo.

A todos los miembros del grupo INTERFASE que hicieron amenas las largas jornadas en el laboratorio y que de una forma u otra contribuyeron para la finalización de este trabajo.

Al grupo de investigación CICTA por su colaboración en el préstamo de los equipos utilizados para realizar la cuantificación y caracterización de los compuestos presentes en los hidrolizados.



## Dedicatoria

*A Dios primero que todo por haberme prestado la salud y la vida para realizar este trabajo ante todas las adversidades que se presentaron en el camino.*

*A mi mamá por su esfuerzo en darme la educación y madrugar cada día a prepararme la comida para que pudiera concentrarme en las obligaciones académicas.*

*A mi papá que está en el cielo por enseñarme a ser un hombre de bien, a saber, que las cosas se consiguen con trabajo fuerte y que lo único que nadie te puede quitar es la educación.*

*A mi hermano que a pesar de las peleas y discrepancias que hemos tenido, en los momentos difíciles nos hemos unido para salir adelante.*

*A mi mejor amiga Carolina Pedrozo que estuvo pendiente de mi durante la realización de este trabajo y fue testigo de mis frustraciones y mis ganas de abandonar, pero siempre conté con sus palabras de aliento para seguir adelante y poder terminar el mismo.*

*A todos mis compañeros de carrera y futuros colegas que contribuyeron de una u otra forma a mi crecimiento profesional durante estos 5 años de vida universitaria.*

***Jose Manuel Guerrero Serrano***



**Tabla de Contenido**

Introducción .....14

1. Marco Teórico/Estado del Arte..... 16

1.1. Definición de Xilooligosacáridos (XOs) ..... 16

1.2. Extracción del Xilano Presente en la BLR ..... 17

1.3. Presencia de Compuestos Indeseables en los Hidrolizados de Biomasa ..... 18

1.4. Procesos de Purificación de los Hidrolizados de Biomasa ..... 20

1.4.1. Adsorción sólido-líquido usando carbones activados..... 20

1.4.2. Selectividad por peso molecular empleando membranas dialíticas..... 21

1.4.3. Precipitación química sobre la concentración de impurezas hidrolizado ..... 22

1.4.4. Intercambio iónico ..... 23

2. Objetivos ..... 24

2.1. Objetivo General ..... 24

2.2. Objetivos Específicos..... 24

3. Metodología ..... 25

3.1. Producción del Hidrolizado ..... 25

3.2. Adsorción Sólido-Líquido Usando Carbones Activados ..... 26

3.3. Selectividad por Peso Molecular Mediante Diálisis ..... 27

3.4. Precipitación con no Solvente..... 27



3.5. Resinas de Intercambio Iónico.....	28
3.6. Cuantificación de XO <sub>s</sub> , Fenoles y Furfural .....	29
3.7. Ruta de Purificación.....	31
4. Resultados y Discusión.....	32
4.1. Adsorción Sólido-Líquido Usando Carbón Activado.....	33
4.2. Selectividad por Peso Molecular Mediante el Uso de Membranas de Diálisis .....	35
4.3. Precipitación Química Usando Diferentes no Solventes .....	37
4.4. Resinas de Intercambio Iónico.....	40
4.4.1. Tratamiento con resinas catiónicas fuertes en operación batch .....	40
4.4.2. Tratamiento con resinas aniónicas fuertes en modo batch.....	43
4.5. Ruta de Purificación.....	46
5. Conclusiones.....	49
6. Recomendaciones .....	51
Bibliografía .....	52
Apéndices.....	59



### Lista de Figuras

Figura 1: Esquema de la metodología llevada a cabo en el presente estudio.....	25
Figura 2: Efecto de la relación carbón activado-hidrolizado, sobre la concentración de carbohidratos presentes en el hidrolizado luego del tratamiento en operación batch durante 24 h bajo agitación constante a temperatura ambiente. ....	33
Figura 3: A: Efecto de la relación carbón activado-hidrolizado, sobre la concentración de furfural y polifenoles totales presente en el hidrolizado luego del tratamiento en operación batch durante 24 h bajo agitación constante a temperatura ambiente y B: Cromatograma obtenido por GPC. Efecto de la relación carbón activado-hidrolizado sobre la distribución de peso molecular a una longitud de onda UV 280 nm.....	35
Figura 4: Cromatogramas GPC. Efecto del uso de membranas dialíticas con MWCO 0,1 a 0,5 kDa y 0,5 a 1 kDa, sobre la distribución de peso molecular (A: Detector IR y B: Detector UV 280 nm) presente en el hidrolizado retenido una vez estabilizada la conductividad del solvente de diálisis. ....	36
Figura 5: Efecto de la precipitación química con distintos no solventes a relación 7:1 v/v no solvente-hidrolizado, sobre la concentración de carbohidratos presentes en el precipitado re-diluido obtenido en operación batch durante 24 h bajo agitación a temperatura ambiente. ....	38
Figura 6: Cromatogramas GPC. Efecto de la precipitación química con distintos no solventes a relación 7:1 no solvente-hidrolizado, sobre la distribución de peso molecular (A: Detector IR y	



B: Detector UV) presente en el precipitado re-diluido obtenido en operación batch durante 24 h bajo agitación constante a temperatura ambiente. .... 39

Figura 7: Efecto de la relación hidrolizado-resina catiónica a relaciones 1:1, 1:0,2 y 1:0,1 v/v y el tiempo de contacto, sobre la concentración de carbohidratos presentes en el hidrolizado sobrenadante posterior a la operación batch con resina catiónica fuerte bajo agitación constante a temperatura ambiente. .... 40

Figura 8: Efecto de la relación hidrolizado-resina catiónica a relaciones a relaciones 1:1, 1:0,2 y 1:0,1 v/v y el tiempo de contacto, sobre la concentración de furfural y compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado sobrenadante posterior a la operación batch con resina catiónica fuerte bajo agitación constante a temperatura ambiente. .... 42

Figura 9: Efecto de la relación hidrolizado-resina aniónica a relaciones 1:1, 1:0,2 y 1:0,1 v/v y el tiempo de contacto, sobre la concentración de carbohidratos presentes en el hidrolizado sobrenadante posterior a la operación batch con resina aniónica fuerte bajo agitación constante a temperatura ambiente. .... 43

Figura 10: Efecto de la relación hidrolizado-resina aniónica a relaciones a relaciones 1:1, 1:0,2 y 1:0,1 v/v y el tiempo de contacto, sobre la concentración de furfural y compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado sobrenadante posterior a la operación batch con resina aniónica fuerte bajo agitación constante a temperatura ambiente. .... 45

Figura 11: Efecto de cada etapa de la ruta de purificación seleccionada (CA: carbón activado, RC: resina catiónica y RA: resina aniónica), sobre la concentración de carbohidratos. .... 47



Figura 12: A: Efecto de cada etapa de la ruta de purificación seleccionada (CA: carbón activado, RC: resina catiónica y RA: resina aniónica), sobre la concentración de compuestos fenólicos y B: Cromatogramas GPC. Efecto de cada etapa de la ruta de purificación seleccionada, sobre la distribución de peso molecular, detector UV 280 nm..... 48



### Lista de Apéndices

Apéndice A: Estado del arte de los compuestos indeseados presentes en los hidrolizados .....	59
Apéndice B: Estado del arte de las metodologías de purificación de hidrolizados de BLR.....	62
Apéndice C: Rampa de calentamiento y enfriamiento del reactor .....	72
Apéndice D: Curvas de calibración para la cuantificación de XO <sub>s</sub> , fenoles y furfural .....	73
Apéndice E: Cuantificación de polifenoles totales usando el reactivo de Folin-Ciocalteu .....	79
Apéndice F: Resumen de los resultados obtenidos en el presente trabajo.....	80
Apéndice G: Resultados complementarios en la evaluación de metodologías de purificación....	84
Apéndice H: Registro fotográfico.....	87



## RESUMEN

**TITULO:** EVALUACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA LA PURIFICACIÓN DE HIDROLIZADOS DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA RESIDUAL DE LA AGROINDUSTRIA COLOMBIANA

**AUTOR:** Jose Manuel Guerrero Serrano\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Autohidrólisis, Purificación, Xilooligosacáridos, Pergamino de café, Furfural, Carbón activado, Diálisis, Precipitación química, Intercambio iónico.

**DESCRIPCIÓN:** Se realizó un proceso de purificación para recuperar xilooligosacáridos (XOs) del hidrolizado de pergamino de café obtenido por medio de autohidrólisis. Se evaluó el uso de las técnicas de: adsorción usando carbón activado, selectividad por peso molecular usando membranas de diálisis, precipitación química usando no solventes y el intercambio iónico usando resinas. El carbón activado y el intercambio iónico fueron técnicas de purificación efectivas eliminando una alta cantidad de compuestos indeseables como el furfural y los polifenoles, con una baja pérdida de XOs. Por otra parte, las técnicas de diálisis y precipitación química generaron una alta pérdida de oligómeros de bajo y medio peso molecular, por lo cual se decidió no trabajar con ellas. Se evaluó el uso de una ruta de purificación en serie a partir de los mejores resultados obtenidos en la evaluación individual de cada técnica. Se utilizó carbón activado a una relación de 20 g carbón/l hidrolizado con un tiempo de contacto de 24 h, resina catiónica fuerte y finalmente resina aniónica fuerte ambas a una relación 1:0,1 v/v hidrolizado/resina durante 20 min de contacto. Esa ruta permitió obtener un producto final en el que se recuperaron el 79,9% de los XOs con una concentración de los mismos de 9,9 g/l, remover el 92,6 % p/p de furfural y eliminar el 98,8 % p/p de los compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado inicial, obteniendo un hidrolizado transparente.

---

\* Trabajo de grado

\*\*Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química.



## ABSTRACT

**TITLE:** EVALUATION OF METHODOLOGIES FOR THE PURIFICATION OF HYDROLYSED RESIDUAL LIGNOCELULOSIS BIOMASS OF COLOMBIAN AGRIBUSINESS

**AUTHOR:** Jose Manuel Guerrero Serrano\*\*

**KEYWORDS:** Autohydrolysis, Purification, Xylooligosaccharides, Coffee parchment, Furfural, Activated carbon, Dialysis, Chemical precipitation, Ion exchange.

**DESCRIPTION:** A purification process was performed to recover xylooligosaccharides (XOs) from coffee parchment hydrolysate obtained by autohydrolysis. It assessed the use of techniques: adsorption by activated carbon, molecular weight selectivity by dialysis membranes, chemical precipitation by the use of non-solvents and ion exchange using resins. The adsorption with activated carbon and the ion exchange were proved effective as purification techniques in the elimination of high amounts of undesirable compounds such as furfural and polyphenols, in which the loss of XOs was minimum. On the other hand, the dialysis and chemical precipitation generated a high loss of oligomers (low and medium molecular weight) for which it was decided not to work with them. The use of a purification route in chain was evaluated, from the data of each individual technique. Activated carbon was used at a ratio of 20 g carbon / l hydrolyzed with a contact time of 24 h, strong cationic resin and finally strong anionic resin both at a ratio of 1: 0.1 v / v hydrolyzed / resin for 20 min of contact. The route allowed to obtain a final product in which the 79.9% of the XOs was recovered, a concentration of 9.9 g / l, in which were removed the 92.6% w / w and 98, 8% w / w of furfural and the phenolic compounds respectively present in the initial hydrolysate, for which was obtained a transparent hydrolysate.

---

\* Bachelor thesis

\*\*Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química.

Director: Ph.D Debora Alcida Nabarlatz, Co- Director: M.Sc. Rolando Andrés Acosta Fernández



## Introducción

La biomasa lignocelulósica residual (BLR) es una materia prima prometedora debido a su alto contenido de celulosa y hemicelulosa. En los últimos años han surgido estudios que aprovechan el xilano contenido en la hemicelulosa para la producción de xilooligosacáridos (XOs) como prebióticos en la industria alimentaria (Jayapal et al., 2013). El interés de darle valor agregado a esta materia prima para la producción de XOs radica en que estos poseen funciones biológicas en el cuerpo humano, en las que se destacan el crecimiento de bacterias prebióticas beneficiosas, la mejora en la absorción de calcio, la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), la reducción del riesgo de cáncer de colon y la disminución de lesiones de úlcera estomacal (Bian et al., 2013).

El pergamino de café es obtenido como residuo de la etapa de trilla en la cadena agroindustrial del café, generando 2,27 toneladas de pergamino/hectárea de café cultivada, usando una pequeña fracción del mismo en la generación energética por medio de combustión, pero desechando la mayoría en pilas y fuentes hídricas, lo cual genera un impacto ambiental negativo (Ardila et al., 2018). Los estudios del grupo INTERFASE han determinado que esta es una biomasa potencial en la generación de XOs, con un contenido del 29,29 % p/p de xilosa (Sanabria, 2016).

Se han estudiado diferentes métodos para la extracción de la hemicelulosa de la BLR, destacándose la autohidrólisis. Este proceso, el cual posee alta eficiencia, presenta la dificultad que al ser un tratamiento hidrotérmico ocurren procesos de degradación de carbohidratos que aportan compuestos indeseados a los hidrolizados de biomasa (Vázquez et al., 2005). Se han encontrado



en los hidrolizados de BLR diversos productos generados por la descomposición de azúcares (como lo son el furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y el ácido acético), productos derivados de la degradación de la lignina y compuestos fenólicos procedentes de los pretratamientos (Nabarlatz, 2007). Así mismo, se encuentran presentes una variedad de compuestos derivados de proteínas, lípidos, ácidos grasos libres, monosacáridos y derivados aminados (Chen et al., 2016).

La presencia de los compuestos indeseados mencionados ha representado un problema en el cumplimiento de las características prebióticas de los XO's citadas anteriormente, ya que estos actúan como inhibidores de la fermentación, lo cual se puede superar mediante la purificación del hidrolizado antes de la fermentación de los XO's (Aachary et al., 2011). Así mismo, los licores producidos deben ser purificados para lograr el grado de pureza a nivel comercial de los XO's, el cual se encuentra en un rango de 75-95% p/p seco (Moure et al., 2006), oscilando su precio entre los 22 y 50 USD/kg (Otieno et al., 2012).

Se han reportado diversas técnicas en la literatura para la purificación de los hidrolizados de biomasa, pero aún no ha sido posible establecer una metodología de separación eficiente. Las membranas poliméricas son una excelente alternativa, debido a que se basan en la separación por peso molecular, pero no son selectivas en la eliminación de compuestos indeseables de igual peso molecular que los azúcares, generando así una alta pérdida de los mismos (Gullón et al., 2008). La precipitación con solvente químico, como por ejemplo, el etanol evidenció la eliminación de impurezas de bajo peso molecular y su fácil recuperación, pero así mismo se ha reportado la pérdida de oligómeros de baja masa molar (Swennen et al., 2005). La adsorción con carbón activado ha mostrado una selectividad hacia la adsorción de compuestos derivados de lignina, pero cuando más del 80% de estos compuestos son eliminados, el porcentaje de recuperación de



azúcares disminuye drásticamente (Nabarlatz, 2007). Las resinas de intercambio iónico presentan la propiedad de retener compuestos indeseables cargados eléctricamente, sin embargo, la regeneración de las mismas presenta altos costos en tratamientos y disposición de residuos (Vázquez et al., 2001).

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este trabajo es evaluar diferentes metodologías de purificación y plantear una ruta de purificación que permita remover los compuestos indeseados de los hidrolizados de biomasa lignocelulósica residual para obtener XOs con un alto grado de pureza en el rango del producto comercial.

## 1. Marco Teórico/Estado del Arte

### 1.1. Definición de Xilooligosacáridos (XOs)

Los xilooligosacáridos (XOs) son oligómeros con su estructura central de xilosa. Estos poseen un arreglo conformado por unidades monoméricas unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,4 ;cuya distribución varía dependiendo de la biomasa de origen y el método utilizado para extraer el xilano (M. H. Chen et al., 2016). El término oligosacárido (Os) se refiere a un grado de polimerización (GP) entre 3 y 10, pero para los XOs, la definición se ha ampliado para incluir de 2 a 20. El GP, el tipo y patrón de sustitución determinan propiedades fisicoquímicas y biológicas de los mismos como lo es la solubilidad en agua (Moure et al., 2006).

Los XOs actúan como prebióticos (ingrediente alimentario no digerible que afecta de manera beneficiosa al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon), favoreciendo los probióticos (microorganismos



benéficos que se encuentran en los intestinos, entre los que se destacan las bifidobacterias y los lactobacilos) presentes en la flora intestinal, los cuales disminuyen el pH por medio de la generación de ácidos grasos que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (Aachary et., 2011)

### **1.2. Extracción del Xilano Presente en la BLR**

El primer paso en la producción de XOs consiste en la extracción del xilano contenido en la hemicelulosa presente en las BLR, destacándose la autohidrólisis. Otras técnicas han sido estudiadas, en las que se encuentran explosión a vapor y extracción con ácidos y bases. El uso de estas sustancias corrosivas (ácidos y bases) producen un alto rendimiento a determinadas condiciones, pero a su vez generan daño en los equipos. Así mismo, tecnologías que limitan su uso debido a su alto costo como lo son: el ultrasonido, microondas e hidrolisis enzimática, esta última produce una alta eficiencia como proceso secundario a la autohidrólisis (Otieno et., 2012).

La autohidrólisis consiste en la despolimerización hidrolítica de la hemicelulosa a oligosacárido de cadena larga para así fraccionarse en oligómeros de cadena corta, monosacáridos y productos de degradación como el furfural, por medio de reacciones sucesivas sin afectar significativamente los polímeros de celulosa y lignina; siendo la temperatura, el tiempo y la relación biomasa/solvente las variables más significativas (Leal, 2017).

La Tabla 1 muestra los diversos estudios que se han realizado para la producción de XOs por medio de autohidrólisis, en el cual el rendimiento máximo de XOs se alcanzó para la cáscara de café con 65,7 g XOs/g hemicelulosa % p/p, proceso en el que se utilizó un tiempo de reacción de 60 min a 190°C.



La extracción de XOs por medio de autohidrólisis para el pergamino de café (PC), se ha investigado en pequeños reactores de 50 ml con una relación PC/agua desionizada de 8 p/p, obteniendo una concentración de XOs de 12,38 g/l, con una región óptima de operación entre 170°C y 200°C y un tiempo de 30 min (Sandoval et al., 2017)

*Tabla 1: Estado del arte de la obtención de XOs por medio de autohidrólisis*

Oligosacárido	Biomasa	Condiciones	$\frac{g \text{ XOs}}{g \text{ hemicelulosa}}$ %p /p	Referencia
XOs	Cáscara de café	60 min, 190°C	65,7	(Leal, 2017)
XOs	Paja de trigo	23min, 79°C	41,2	(Nabarlatz, 2007)
	Cáscara de arroz		42,8	
	Semillas de olivo		50,17	
	Mazorca		53,5	
	Cáscara de almendra		61	
XOs	Cáscara de cebada	145-190 °C	27,1	(Parajó et al., 2004)
	Mazorca		24,8	
	Cáscara de arroz		18	
XOs	Madera de Eucalipto	5 min, 190°C	15,4	(Carvalho et al., 2004)
	Grano gastado de la cervecería		61	

### 1.3. Presencia de Compuestos Indeseables en los Hidrolizados de Biomasa

Producto de los tratamientos hidrotérmicos se han encontrado en los hidrolizados de biomasa distintos compuestos indeseables que deben ser eliminados para obtener XOs con alta pureza. Estos se pueden clasificar en cuatro grupos: compuestos derivados de azúcares (CDA) en los que se destacan el furfural, HMF y el ácido acético, compuestos derivados de lignina (CDL) con presencia significativa de ácido gálico y vanilina, compuestos que contienen nitrógeno (CCN)



siendo mayormente aminas y ácidos grasos (AG) entre los que se encuentran principalmente C6 y C8 (Gil Garrote et al., 2007).

De acuerdo con el estudio realizado para los hidrolizados de mazorcas de maíz y cáscaras de arroz, los CDL son los compuestos indeseados con presencia mayoritaria, en los que se destaca la vanilina; así mismo, se resalta la presencia de furfural con una concentración de 887,1 y 456,3 mg/kg biomasa seca (Gil Garrote et al., 2007). Igualmente, para el hidrolizado del grano gastado de la cervecería se ha reportado la presencia de compuestos CDA, en los que se destaca la presencia de furfural, ácido acético y ácido fórmico (Kabel et al., 2002; Carvalheiro et al., 2004). De la misma forma, para el hidrolizado de cáscara de cebada se destacó la presencia de furfural y ácido acético con 4,9 y 3 g/l, respectivamente, así como el contenido de compuestos CDL, destacándose la presencia de ácido benzoico con 3,4 g/l (Garrote, et al., 2008). Así mismo, la investigación para los hidrolizados de paja de trigo, bagazo de caña, harina de maíz y raquis de palma confirmó la presencia predominante de furfural e HMF con la mayor concentración para harina de maíz (Imman et al., 2013).

Para los hidrolizados de pergamino de café se ha confirmado la presencia de compuestos indeseables como lo son los monosacáridos y furfural, los cuales se investigó su remoción con una baja pérdida de XO<sub>s</sub> por medio de ultrafiltración usando membranas poliméricas (Ardila et al., 2018).

De la literatura mencionada y la complementada en el Apéndice A, se puede evidenciar que los compuestos indeseables con mayor presencia en los hidrolizados son: furfural, ácido acético, ácido fórmico y el HMF; productos de la degradación de pentosas y hexosas respectivamente, así como diferentes productos fenólicos derivados de la degradación de lignina, los cuales deben ser



removidos. Esto se debe a que el proceso de hidrólisis genera una serie de reacciones en serie cuyas variables más influyentes en la selectividad son el tiempo de reacción y la temperatura (Leal, 2017).

#### **1.4 Procesos de Purificación de los Hidrolizados de Biomasa**

**1.4.1. Adsorción sólido-líquido usando carbones activados.** Los carbones activados se han usado en investigaciones previas como medio de adsorción de furfural y compuestos fenólicos derivados de la lignina (Gütsch et al, 2012; Carvajal et al., 2014). El estudio realizado para hidrolizados obtenidos a partir de *Miscanthus x giganteus* (MxG) utilizó relaciones de 1%, 5%, 10% y 20% (g carbón/ml hidrolizado) en operación batch durante 60 min, adsorbiendo 5,8%, 46,8%, 98,3% y 100% (p/p) de XOS, respectivamente (Chen et al., 2014). En un trabajo posterior para MxG se utilizó la relación 10% (g carbón/ml hidrolizado) en operación batch a 60 min, con el fin de adsorber la mayor cantidad de XOs y posteriormente eluirlos con etanol para su recuperación (Chen et al., 2016). Así mismo, se han realizado estudios a bajas concentraciones con el fin de encontrar la relación óptima carbón/hidrolizado que permita adsorber los compuestos indeseables presentes en el hidrolizado. El trabajo realizado para hidrolizados del tallo de maíz, estudió la capacidad de adsorción de un carbón a bajas relaciones, obteniendo como proceso óptimo 0,04 (gramos de carbón/ml hidrolizado) a 50°C durante 40 min (Wang et al., 2017). De acuerdo con Nabarlatz, 2007 la adsorción de compuestos indeseables usando 1,5, 3,3, 10, 16,7, 30 y 50 (g carbón/l hidrolizado) a 30°C durante 24 h obtuvo que la relación de 16,7 g carbón/l hidrolizado era la mejor para la purificación de los hidrolizados, con una baja pérdida de azúcares y la retención del 64% de productos derivados de lignina en una operación en columna.



**1.4.2. Selectividad por peso molecular empleando membranas dialíticas.** El uso de tubos de diálisis es una metodología efectiva para realizar un fraccionamiento por peso molecular, el cual requiere una correcta elección del peso molecular de corte (MWCO) con el fin de perder la menor cantidad de XOs posible (Li et al., 2017). La investigación realizada para el hidrolizado de madera de álamo usó tubos de diálisis con MWCO de 1 y 3 kDa, empleando 20 veces el volumen de muestra como volumen de dializado, utilizando agua desionizada y realizando el seguimiento del proceso por medio de la medición del pH y la conductividad. En este proceso se logró una alta disminución del contenido de lignina hasta concentraciones de 0,72 y 0,42 mg/ml respectivamente, una pureza de Os de 94,1% y 95,6%, pero con una pérdida del 57,5% y del 60% de Os para cada MWCO estudiado (Chen et al., 2014). Del mismo modo, el trabajo realizado por Nabarlatz, 2007 evaluó el uso de diálisis con MWCO 12,4 kDa utilizando agua destilada como solvente y realizando el seguimiento del proceso por la medición de la conductividad, permitiendo eliminar iones, sales y otros compuestos de bajo peso molecular. (Nabarlatz, 2007) Así mismo, se ha implementado el uso de esta metodología para retener compuestos de alto peso molecular, eliminando monosacáridos (Ms) y Oligómeros de bajo peso molecular; en la experimentación realizada para el hidrolizado de bagazo de caña se utilizó una membrana con MWCO 3,5 kDa introducida en agua destilada durante 96 h a temperatura ambiente obteniendo una composición (%p/p) del 11,2% de arabinosa, 83,1% de xilosa, 0,5% de galactosa, 3% de glucosa y 2,1% de ácidos urónicos en el retenido liofilizado (Bian et al., 2013).



**1.4.3. Precipitación química sobre la concentración de impurezas.** La precipitación de azúcares utilizando solventes es la técnica en la cual se utilizan alcoholes de bajo peso molecular (metanol y etanol) para precipitar oligosacáridos (Chen, 2014). El trabajo realizado para el hidrolizado de harina de trigo evaluó la precipitación gradual de XOs añadiendo etanol al hidrolizado hasta alcanzar una concentración de 60% (v/v), permitiendo el equilibrio por 12 h, separando las fases y aumentando la concentración de etanol hasta el 90%. El estudio permitió concluir que a bajas concentraciones de etanol se precipitan XOs con altos GP y grado de sustitución (GS), mientras una alta concentración de etanol precipita XOs con bajos GP y GS (Swennen et al., 2005). De igual forma, el proyecto realizado por Nabarlatz, 2007, valoró el uso de etanol con el fin de eliminar impurezas de bajo peso molecular empleando una relación 7:1 (ml etanol/ml hidrolizado), permitiendo el equilibrio por 24 h a temperatura ambiente, logrando recuperar efectivamente XOs de alto peso molecular y perdiendo XOs de baja masa molar debido a la baja especificidad del proceso. Adicionalmente, se han realizado estudios para la precipitación de carbohidratos con sustancias de diferente polaridad, como el realizado para el hidrolizado de cáscaras de arroz, en el que se investigó la precipitación con acetona, etanol y 2-propanol usando 5 kg sustancia/kg hidrolizado, permitiendo el contacto por 12 h y obteniendo como resultado que el 2-propanol precipita la mayor cantidad de XOs (Vegas et al., 2004). Igualmente se realizó el mismo estudio por polaridad empleando las mismas sustancias para el hidrolizado de madera de eucalipto, utilizando la relación másica 7:1 solvente-hidrolizado por 24 h a temperatura ambiente, donde el eucalipto presentó un bajo rendimiento de precipitación debido a la presencia de altas cantidades de agua en los hidrolizados, lo cual se mejoró con hidrolizados liofilizados en los que el etanol logró el mejor rendimiento de XOs (Vázquez et al., 2005).



**1.4.4. Intercambio iónico.** El tratamiento por intercambio iónico usando resinas, se ha empleado para purificar Os como proceso único o como secuencia de otras técnicas, con el objetivo principal de realizar una desalinización y eliminar otros compuestos no deseados (Moure et al., 2006). La aplicación de resinas catiónicas fuertes se ha empleado principalmente en la eliminación de compuestos metálicos. El estudio realizado para el hidrolizado de MxG empleó la resina Amberlite IR 120Na usando una relación 1:10 g resina/ml hidrolizado durante 24 h, logrando un aumento en la concentración de XOs y una eliminación de los metales pesados contenidos en los hidrolizados (Chen et al., 2016). Así mismo, la investigación realizada para el hidrolizado del grano gastado de la cervecería usó la resina Amberlite 200 a relación 1:15 g resina/g licor durante 24 h, logrando una alta disminución de otros compuestos no volátiles (diferentes a carbohidratos) (Gómez et al., 2015).

En cuanto a las resinas aniónicas, se han estudiado para la remoción de compuestos CDA y CDL. El estudio para el hidrolizado de MxG empleó una resina aniónica débil en una relación 1:10 g resina/ml hidrolizado la cual eliminó ácidos orgánicos, y posteriormente se utilizó una resina aniónica fuerte a igual relación, la cual eliminó sustancias coloreadas atribuidas a compuestos fenólicos derivados de la lignina (Chen et al., 2016). De la misma forma, la investigación para el hidrolizado de cáscara de arroz comparó la resina básica débil Amberlite IRA 96 y la resina básica fuerte IRA 400, en contacto durante 12 h a relación 1:20 kg resina/kg licor, obteniendo una mayor eliminación de otros compuestos no volátiles y de azúcares para IRA 400 (Vegas et al., 2004).

Lo anterior muestra el estado del arte de las metodologías que serán estudiadas en el presente trabajo con un complemento del mismo en el Apéndice B.



## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Evaluar diferentes metodologías de purificación que permitan remover los compuestos indeseados de los hidrolizados de pergamino de café para obtener XOS con un alto grado de pureza (en el rango del producto comercial).

### 2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Analizar métodos de adsorción sólido-líquido, selectividad por peso molecular y precipitación sobre la concentración de impurezas presentes en los hidrolizados estudiados.
- ✓ Evaluar el uso de intercambio iónico como metodología de selección y retención de compuestos indeseados con carga iónica.
- ✓ Establecer una alternativa de purificación de hidrolizados que permita obtener XOS con alto grado de pureza (en el rango del producto comercial).



### 3. Metodología

El desarrollo de este trabajo se llevó a cabo en tres etapas principales las cuales se detallan en la Figura 1.

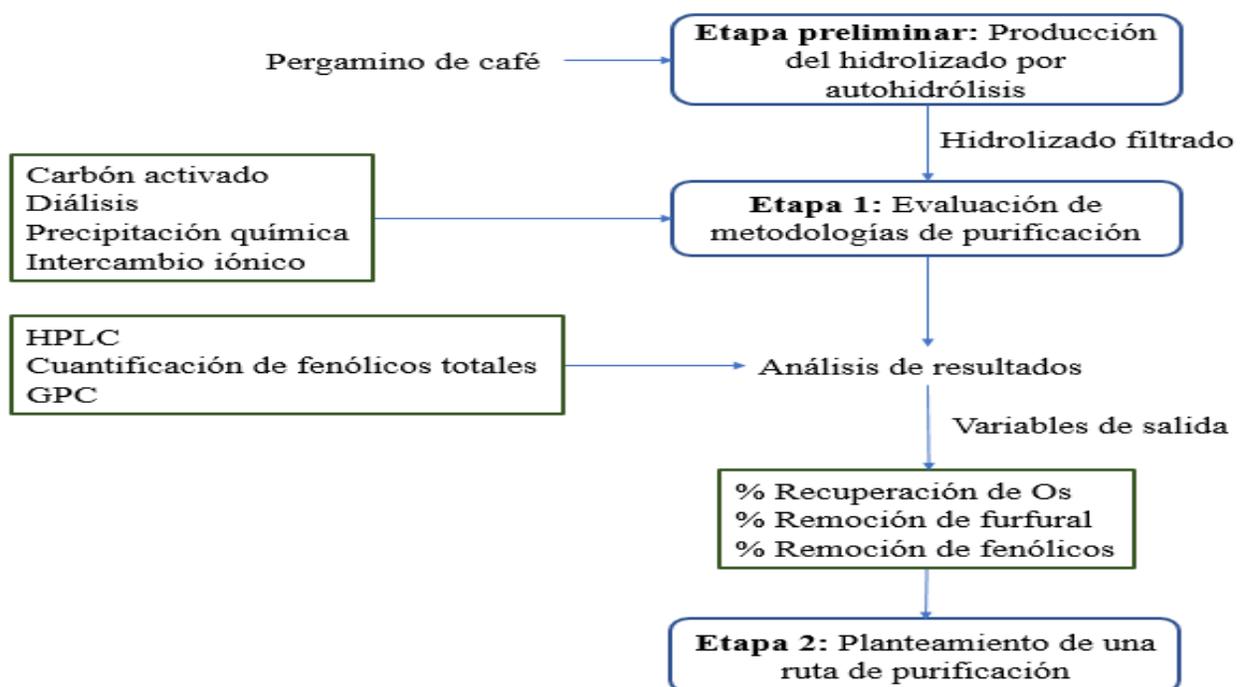


Figura 1: Esquema de la metodología llevada a cabo en el presente estudio.

#### 3.1 Producción del Hidrolizado

El hidrolizado de pergamino de café se obtuvo mediante autohidrólisis utilizando los parámetros establecidos en trabajos previos (Sandoval et al., 2017), utilizando un reactor Parr de la serie 4848 de acero inoxidable de 1 galón. La biomasa utilizada fue pergamino de café (PC) obtenido de la cooperativa de caficultores del municipio de San Gil, Santander, el cual fue secado en un horno a 105°C durante 24 h y posteriormente enfriado en un desecador. Para los experimentos se cargaron



en el reactor 2160 ml de agua destilada y 270 g de PC. La reacción de autohidrólisis se realizó utilizando una rampa de calentamiento en el reactor con un aumento promedio de 1,3 °C/min hasta llegar a 180°C y enfriando rápidamente el reactor con agua para detener la reacción (ver Apéndice C). Una vez terminada la reacción, el licor remanente conteniendo los XOs se separó del sólido mediante filtración en tela, y luego en papel cuantitativo franja azul. La muestra de licor se almacenó en congelador a -23°C para su posterior análisis. La distribución de peso molecular y la cuantificación de carbohidratos, furfural y compuestos fenólicos se determinó por GPG, HPLC y el método de cuantificación de fenoles totales, respectivamente, según el procedimiento descrito en la sección 3.6.

### **3.2 Adsorción Sólido-Líquido Usando Carbones Activados**

El proceso de adsorción en carbón activado se realizó en operación batch usando un carbón analítico Merck Ref. 1.02186.1000. El carbón se secó en una mufla a 120°C por 3 horas. Los ensayos se realizaron por duplicado usando tubos de ensayo de 10 ml, en los que se adicionan 8 ml de hidrolizado y se varió la relación carbón-hidrolizado (p/v) entre 5, 10, 15, 20 y 25; permitiendo un tiempo de contacto de 24 h con agitación constante a temperatura ambiente. Finalizadas las 24 h se centrifugó a 6000 rpm por 10 min con el fin de precipitar el carbón y proceder a retirar el sobrenadante. La mejor relación carbón-hidrolizado se determinó como aquella que permitió retirar la mayor cantidad de furfural y fenólicos sin afectar los XOs de bajo peso molecular, apoyado en el cálculo del porcentaje de recuperación de XOs, los porcentajes de remoción de furfural y compuestos fenólicos, cuyo procedimiento de cálculo se describe en la sección 3.6.



### 3.3 Selectividad por Peso Molecular Mediante Diálisis

La diálisis se realizó utilizando dos kits de diálisis Spectra/por de éster de celulosa de grado biotecnológico con diferente MWCO, de 0,1 a 0,5 kDa y 0,5 a 1 kDa respectivamente. Para ello se cortó una longitud de tubo de 6,95 cm (equivalente a 5,5 ml), el cual se remojó en agua desionizada durante 15 min a temperatura ambiente con el fin de eliminar la solución de almacenamiento; el tubo lavado se llenó con 2 ml de hidrolizado y se aseguró con los cierres universales incluidos en el kit de diálisis. Para este proceso se utilizaron 300 ml de agua desionizada como solvente de diálisis y el seguimiento del proceso se realizó con la medición constante de la conductividad. El recambio del solvente de diálisis se realizó cuando la medición de la conductividad se hizo estable, dando por finalizado el proceso una vez que la conductividad fue estable aún entre recambios del solvente de diálisis. Los ensayos se realizaron por duplicado. La eficiencia del proceso se determinó con el cambio de la distribución de peso molecular y el porcentaje de remoción de compuestos fenólicos según el procedimiento descrito en la sección 3.6.

### 3.4 Precipitación con no Solvente

Para este proceso se seleccionaron etanol, acetona y 2-propanol para estudiar la precipitación de azúcares presentes en el hidrolizado filtrado usando una relación 7:1 (ml de no solvente:ml de hidrolizado). Para ello, se pusieron en contacto 5 ml de hidrolizado en tubos falcon de 45 ml sellados, durante 24 h bajo agitación constante a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min con el fin de separar completamente el sobrenadante y el precipitado; el precipitado se secó al vacío a temperatura ambiente y fue re-disuelto en agua desionizada, en igual volumen al del hidrolizado inicial. Los ensayos se realizaron por duplicado.



El mejor no solvente para precipitar azúcares se determinó como aquel que permitió retirar la mayor cantidad de furfural y fenólicos sin afectar los XOs de bajo peso molecular, apoyado en el cálculo del porcentaje de recuperación de XOs, los porcentajes de remoción de furfural y compuestos fenólicos, cuyo procedimiento de cálculo se describe en la sección 3.6.

### **3.5 Resinas de Intercambio Iónico**

El proceso de intercambio iónico se realizó usando las resinas Lewatit® MonoPlus S 108 H (resina catiónica fuerte) y Lewatit® MonoPlus M 800 OH (resina aniónica fuerte). Las resinas se lavaron con agua desionizada para eliminar el exceso de solución activadora de almacenamiento, hasta que el pH del agua de lavado no varió al contactar con la resina. Las pruebas en configuración batch para cada resina se realizaron con el fin de obtener la mejor relación hidrolizado-resina y el tiempo de contacto; éstas se llevaron a cabo en vasos de precipitado de 50 ml por duplicado, en los que se añadió 8 ml de hidrolizado y se varió la relación v/v hidrolizado-resina a valores de 1:1, 1:0,2 y 1:0,1, para tiempos de 5, 10 y 20 min bajo agitación constante a temperatura ambiente. Para la recuperación del licor se permitió la decantación de la resina y la extracción del líquido remanente. El tratamiento con resina aniónica se realizó después de pre-tratar el licor con resina catiónica, debido a que en pruebas preliminares esta se contactó con hidrolizado fresco produciendo un precipitado indeseado, el cual no se presentó con el pretratamiento realizado. La mejor relación hidrolizado-resina y tiempo de contacto, se determinaron como aquellas que permitieron retirar la mayor cantidad de furfural y fenólicos sin afectar los XOs de bajo peso molecular, apoyado en el cálculo del porcentaje de recuperación de XOs, los porcentajes de remoción de furfural y compuestos fenólicos, cuyo procedimiento de cálculo se describe en la sección 3.6.



### 3.6 Cuantificación de XOs, Fenoles y Furfural

La cuantificación de los monómeros y el furfural presentes en el hidrolizado antes y después de pasar por los diferentes métodos de purificación, se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Por otra parte, la cuantificación de los Os presentes se realizó mediante el proceso de poshidrólisis (ruptura de los oligómeros presentes en el hidrolizado en sus monosacáridos constituyentes), en los que se tomó 5 ml de hidrolizado y se añadió 1 ml de solución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 N realizando la reacción en autoclave durante 45 min a 120°C. El cálculo de la concentración de Os se determinó por medio de la ecuación (1).

$$Os = Ms_T - Ms \quad (1)$$

Donde:

Os: Concentración de oligómeros presentes en el hidrolizado

Ms<sub>T</sub>: Concentración de monómeros de xilosa + monómeros de arabinosa cuantificados posterior a la poshidrólisis.

Ms: Concentración de monómeros de xilosa + monómeros de arabinosa cuantificados en el hidrolizado inicial.

El análisis mediante HPLC se realizó con la ayuda de un cromatógrafo Thermo Dionex Chromeleon equipado con una columna Zorbax Carbohydrate, acoplado con detector de índice de refracción (IR) y detector ultravioleta (UV Vis) a 280 nm. El método utilizó una fase móvil compuesta por 70% acetonitrilo/30% agua v/v, con un flujo de 1,2 ml/min a 30°C. Para la calibración se utilizaron patrones de xilosa, arabinosa y furfural cuyas curvas de calibración se



presentan en el Apéndice D. Esta técnica de cuantificación fue aplicada a los procesos descritos en las secciones 3.1, 3.2, 3.4, 3.5 y 3.7.

Por otra parte, la caracterización de los oligómeros y compuestos de bajo peso molecular presentes en los hidrolizados se llevó a cabo por cromatografía de permeación en gel (GPC) con el fin de determinar la distribución de peso molecular. Esta se llevó a cabo con la ayuda de un cromatógrafo Thermo Dionex Chromeleon equipado con una columna SRT-SEC 100 Sepax Thecnology, utilizando una fase móvil 10% acetonitrilo/90% agua v/v con un flujo de 0,3 ml/min a 30°C. El detector IR se utilizó para determinar la distribución de peso molecular de los compuestos sacáridos, cuya curva de calibración fue realizada usando los Dextranos con peso molecular 6, 20 y 40 kDa, xilano (0,329 kDa), xilosa (0,150 kDa), glucosa (0,180 kDa) y celobiosa (0,342 kDa) de la marca Alfa Aesar (Apéndice D). El detector UV a 280 nm se utilizó con el fin de determinar la distribución de peso molecular de compuestos no sacáridos como el furfural, cuya intensidad fue mayor a esta longitud de onda. Para este detector no fue posible realizar una completa relación del tiempo de retención y el peso molecular debido a la no disponibilidad de patrones de calibración que produjeran señal en el UV a 280 nm.

Así mismo, se empleó la técnica de cuantificación de compuestos fenólicos totales usando el reactivo de Folin-Ciocalteu, cuyo procedimiento detallado se describe en el Apéndice E. Este método permitió la detección por espectrofotometría de los compuestos fenólicos derivados de la lignina presentes en los hidrolizados a una longitud de onda de 765 nm. La concentración de dichos compuestos se determinó por medio de una curva de calibración con ácido gálico realizada entre concentraciones de 0,05 y 1,2 g/l por duplicado, en una cubeta de cuarzo con una trayectoria de la



luz de 10 mm y usando agua destilada como blanco (curva de calibración presente en el Apéndice D). Esta técnica fue aplicada a los procesos descritos en las secciones 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.7.

Los porcentajes de recuperación p/p de Os y porcentajes de remoción p/p de furfural y fenólicos, se determinaron a partir de las concentraciones obtenidas por las técnicas de HPLC y determinación de compuestos fenólicos totales respectivamente.

$$\% \text{ Recuperación de Os} = \frac{\text{Concentración de Os en el hidrolizado tratado}}{\text{Concentración de Os en el hidrolizado inicial}} * 100\%$$

*% Remoción de furfural*

$$= 100 - \left( \frac{\text{Concentración de furfural en el hidrolizado tratado}}{\text{Concentración de furfural en el hidrolizado inicial}} * 100\% \right)$$

*% Remoción de fenólicos*

$$= 100 - \left( \frac{\text{Concentración de fenólicos en el hidrolizado tratado}}{\text{Concentración de fenólicos en el hidrolizado inicial}} * 100\% \right)$$

### 3.7 Ruta de Purificación

Una vez evaluadas las distintas metodologías, se planteó una posible ruta de purificación con el fin de lograr la disminución de los compuestos indeseados recuperando los XO's con el mayor rendimiento posible. Para ello, se escogió la siguiente secuencia: 1) Tratamiento con carbón activado (CA) en operación batch a relación carbón-hidrolizado 20 g/l durante 24 h bajo agitación constante a temperatura ambiente, con el fin de eliminar un alto porcentaje de furfural y compuestos fenólicos; 2) Tratamiento con resina catiónica (RC) en operación batch a relación 1:0,1 hidrolizado-resina a un tiempo de contacto de 20 min bajo agitación constante a temperatura ambiente, con el fin de pretratar el licor para contactar con la resina aniónica; y 3) Tratamiento con resina aniónica (RA) en operación batch a relación 1:0,1 hidrolizado-resina a un tiempo de



contacto de 20 min, con el fin de realizar un refinado final al hidrolizado y obtener un color transparente del mismo.

El efecto de cada etapa se evaluó respecto a su eficiencia en retirar la mayor cantidad de furfural y fenólicos sin afectar los XOs de bajo peso molecular, apoyado en el cálculo del porcentaje de recuperación de XOs, los porcentajes de remoción de furfural y compuestos fenólicos, cuyo procedimiento de cálculo se describió en la sección 3.6.

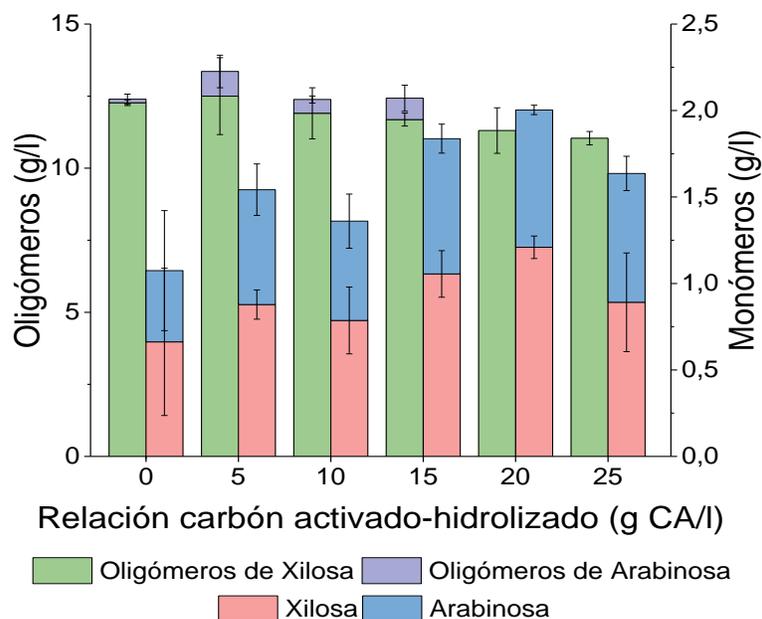
#### 4. Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos para la caracterización inicial del hidrolizado de pergamino de café, producido a las condiciones descritas en la metodología del presente trabajo, muestran que el mismo tiene una concentración inicial de monómeros de 0,66 g/l de xilosa y 0,4 g/l arabinosa, 12,3 g/l de XOs (en la literatura la suma de los oligómeros de xilosa y arabinosa se reportan como XOs (Leal, 2017)), 56 ppm de furfural y 1,2 g/l de equivalentes de ácido gálico atribuidos a los polifenoles totales. La distribución de peso molecular para los azúcares evidenció una presencia de compuestos en el rango de los 0,15 y los 800 kDa (ver Figura 4A curva roja). Estos resultados de concentración de XOs y distribución de peso molecular para los azúcares fueron similares a los obtenidos por Ardila et al., 2018 con un valor de 13 g/l y rango de peso molecular 0,15 a 800 kDa a las mismas condiciones de producción del hidrolizado descritas en el presente trabajo (sección 3.1).



#### 4.1 Adsorción Sólido-Líquido Usando Carbón Activado

La Figura 2 muestra la concentración de monómeros (eje izquierdo) y oligómeros (eje derecho) de carbohidratos presentes en el hidrolizado luego de haber sido tratado con carbón activado a distintas relaciones líquido:carbón. Como puede observarse, después del tratamiento realizado no se presenta una disminución considerable de los mismos (disminución del 10,9 %p/p para la relación 25 g/l). Estos resultados concuerdan con los obtenidos para el hidrolizado de madera de eucalipto empleando una relación carbón-licor de 20 g/l (Gütsch et al., 2012).



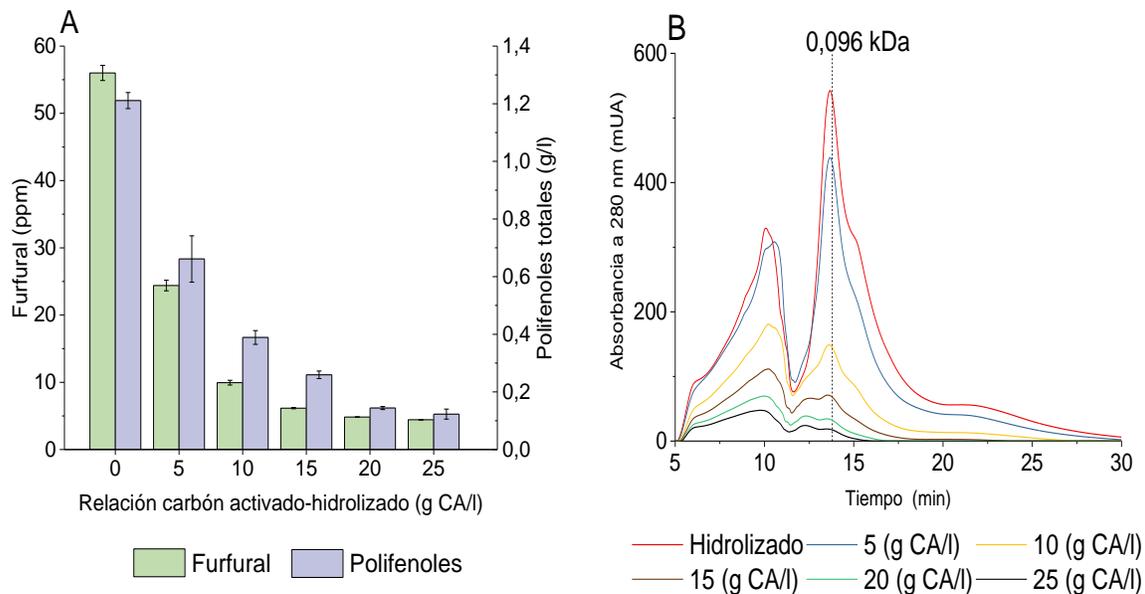
*Figura 2:* Efecto de la relación carbón activado-hidrolizado, sobre la concentración de carbohidratos presentes en el hidrolizado luego del tratamiento en operación batch durante 24 h bajo agitación constante a temperatura ambiente.

La concentración de furfural, como se puede apreciar en la Figura 3A, disminuye con el aumento de la relación de carbón hasta una concentración final de 4,43 ppm para la relación 25



g/l, equivalente a una remoción del 91,98 % p/p. Sin embargo, se evidencia que al pasar de la relación de 20 a 25 [g/l] la concentración de furfural se reduce sólo un 0,74% p/p y la concentración de XOs (oligómeros de xilosa+oligómeros de arabinosa) disminuye un 2,1% p/p. El porcentaje de adsorción de furfural -superior al 90%- obtenido en este estudio fue similar al obtenido por Nabarlatz, 2007 y mayor que el obtenido para el hidrolizado de madera de eucalipto (57,14 %p/p) (Gütsch et al., 2012).

La distribución por peso molecular en el UV a 280 nm (Figura 3B), evidencia el aumento de la remoción de compuestos no sacáridos con el aumento de la relación carbón-hidrolizado. Se determinó que el patrón de furfural tiene un tiempo de retención en el UV en 14 min (correspondiendo a un MW de 0,096 kDa), coincidente con el pico más alto que se observa a este tiempo en las muestras. Como puede observarse, existe una alta disminución de compuestos cercanos a este peso molecular coincidente con el furfural, lo cual se ratifica en el análisis por HPLC (Figura 3A). En cuanto a la cuantificación de compuestos fenólicos, la Figura 3A evidencia una notable disminución en la concentración de los mismos con el aumento de la relación carbón activado-hidrolizado. La adsorción preferencial de compuestos derivados de la lignina a las concentraciones de carbón estudiado, se puede atribuir a que éstos poseen una mayor naturaleza hidrófoba que los carbohidratos, por lo cual estos compuestos son adsorbidos gracias a que la superficie del carbón es también altamente hidrofóbica (Nabarlatz, 2007). El presente estudio permitió realizar una disminución en la concentración de compuestos fenólicos del 88,3 % y 90,0 % p/p para las relaciones 20 y 25 g/l.



*Figura 3:* A: Efecto de la relación carbón activado-hidrolizado, sobre la concentración de furfural y polifenoles totales presente en el hidrolizado luego del tratamiento en operación batch durante 24 h bajo agitación constante a temperatura ambiente y B: Cromatograma obtenido por GPC. Efecto de la relación carbón activado-hidrolizado sobre la distribución de peso molecular a una longitud de onda UV 280 nm.

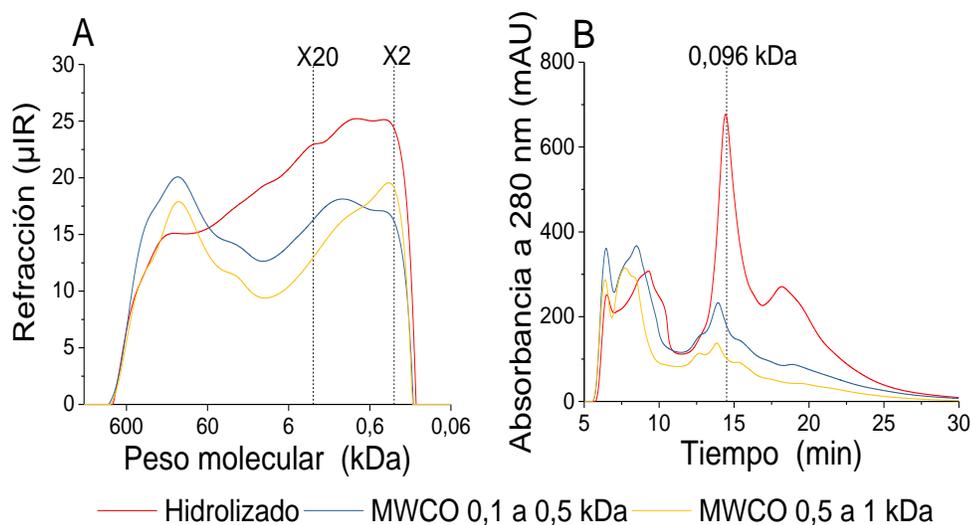
Del análisis anterior, se pudo evidenciar que la mejor relación fue 20 g CA/l hidrolizado, en la que se recuperó el 91,2 % p/p de los XO's con una concentración final de los mismos de 11,3 g/l, una eliminación de furfural del 91,4% p/p y una remoción de los polifenoles totales de 88,3 % p/p (ver Tabla F1 presente en el Apéndice F).

#### 4.2 Selectividad por Peso Molecular Mediante el Uso de Membranas de Diálisis

La Figura 4A muestra la distribución de peso molecular del hidrolizado antes y después de ser tratado mediante diálisis. Como puede observarse, los compuestos sacáridos en el rango de los XO's (GP 2-20), disminuye, mientras que la concentración de los compuestos de alto peso molecular se mantiene en el retenido de las membranas.



El mismo efecto se muestra en la Figura 4B, evidenciando la alta disminución de compuestos con peso molecular menor o igual a 0,096 kDa, entre los que se encuentra el furfural; estos resultados de fraccionamiento por peso molecular son ocasionados por el MWCO de la membrana, mostrando una mayor disminución en la intensidad de los azúcares para el tubo de diálisis con MWCO 0,5 a 1 kDa.



*Figura 4:* Cromatogramas GPC. Efecto del uso de membranas dialíticas con MWCO 0,1 a 0,5 kDa y 0,5 a 1 kDa, sobre la distribución de peso molecular (A: Detector IR y B: Detector UV 280 nm) presente en el hidrolizado retenido una vez estabilizada la conductividad del solvente de diálisis.

En cuanto a la eliminación de compuestos derivados de la lignina, la Figura G1 presentada en el Apéndice G muestra que la selectividad por peso molecular permitió disminuir la concentración de fenólicos en el hidrolizado de pergamino de café, en el cual se eliminó el 24,3% p/p para el MWCO 0,1 a 0,5 kDa y 50,3% p/p para el MWCO 0,5 a 1 kDa, siendo menor al comparado con el estudio realizado para el hidrolizado de madera de álamo (debido al MWCO empleado), que

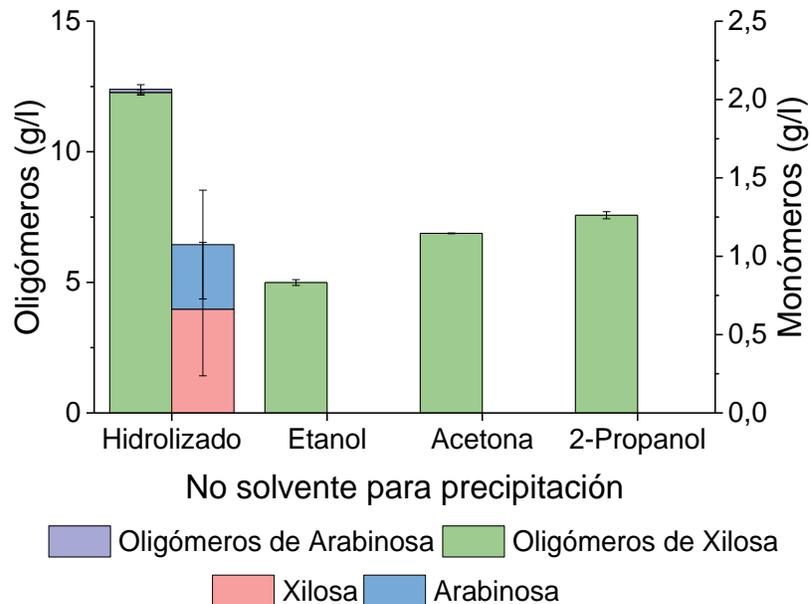


logró eliminar el 85,6 % p/p de los compuestos derivados de lignina para el MWCO de 1 kDa y el 91,6% p/p para el MWCO de 3 kDa (Chen et al., 2014).

Del análisis anterior, se pudo evidenciar que el MWCO de las membranas estudiadas no fue suficiente para eliminar los compuestos indeseables presentes en el hidrolizado (furfural y polifenoles totales) a las condiciones de operación estudiadas.

#### **4.3 Precipitación Química Usando Diferentes no Solventes**

La cuantificación de carbohidratos antes y después de ser precipitados utilizando diferentes solventes se analizó por medio de HPLC, y los resultados se ilustran en la Figura 5. En ella puede observarse que el precipitado re-diluido obtenido con 2-propanol presenta la mayor concentración de XOs (oligómeros de xilosa+oligómeros de arabinosa), seguido de acetona y de etanol, con una recuperación de oligosacáridos del 61,1%, 55,9% y 40,3 % p/p para cada solvente utilizado. Se atribuye que esta diferencia en la concentración de XOs precipitados es causada por la diferente polaridad de los solventes y la naturaleza química del hidrolizado. En este sentido, se debe comparar la constante dieléctrica del no solvente con el solvente del hidrolizado (agua): entre mayor sea la constante dieléctrica del no solvente, mayor será la solvatación de los compuestos presentes en el hidrolizado y por ende más solubles en el no solvente. El etanol siendo un solvente polar prótico presenta la mayor constante dieléctrica con un valor de 24, seguido de la acetona (solvente polar aprótico con una constante de 21) y finalizando con 2-propanol ( solvente polar prótico con una constante de 18); siendo el agua un solvente polar prótico con una constante de 79 (Beltrán et al., 2013).



*Figura 5:* Efecto de la precipitación química con distintos no solventes a relación 7:1 v/v no solvente-hidrolizado, sobre la concentración de carbohidratos presentes en el precipitado re-diluido obtenido en operación batch durante 24 h bajo agitación a temperatura ambiente.

La distribución por peso molecular para los compuestos sacáridos precipitados, así como para el hidrolizado inicial se muestra en la Figura 6A, en la cual se observa una considerable disminución de los oligosacáridos en el rango de peso molecular entre X2 y X20, mientras que se observa un cambio despreciable en la señal de los compuestos con peso molecular mayor a 200 kDa, lo cual es comparable con lo obtenido por Nabarlatz, 2007. Para los compuestos de degradación identificados mediante GPC en el detector UV a 280 nm, la Figura 6B evidencia que los compuestos con tiempo de retención mayor o igual a 10 min (entre los que se incluye el furfural) permanecen solubles en el no solvente, y no precipitan con los oligosacáridos, por lo que esta técnica permite la separación de los mismos.

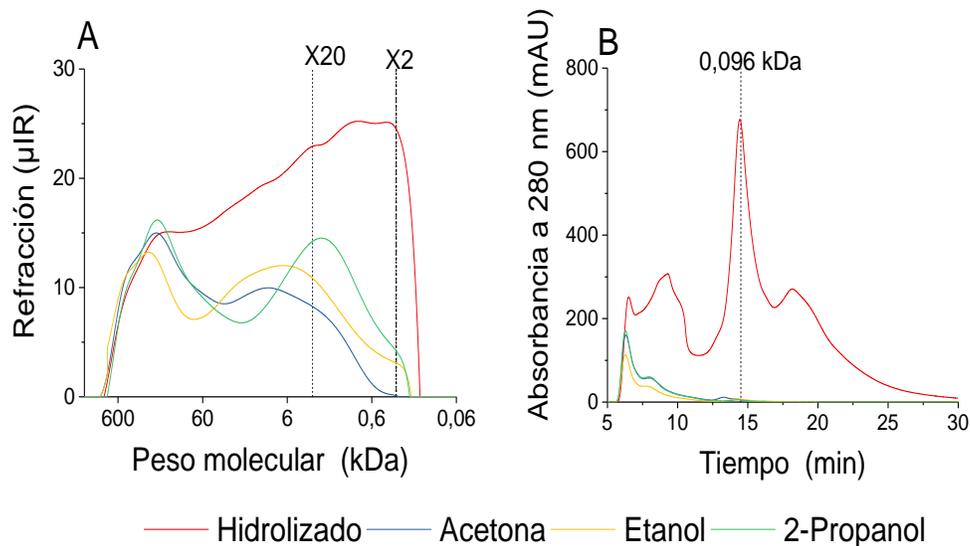


Figura 6: Cromatogramas GPC. Efecto de la precipitación química con distintos no solventes a relación 7:1 no solvente-hidrolizado, sobre la distribución de peso molecular (A: Detector IR y B: Detector UV) presente en el precipitado re-diluido obtenido en operación batch durante 24 h bajo agitación constante a temperatura ambiente.

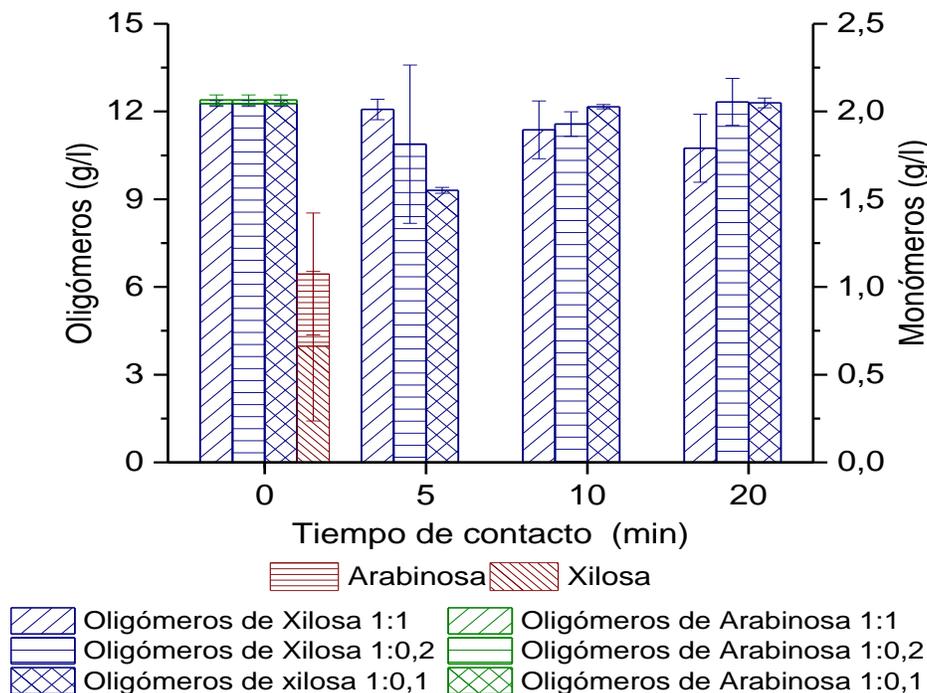
En cuanto a la presencia de compuestos fenólicos en el precipitado re-diluido, la Figura G2 presente en el Apéndice G, evidencia concentraciones por debajo de los 0,1 g/l atribuido a compuestos fenólicos. La absorbancia detectada se atribuye a compuestos fenólicos derivados de la lignina que están anclados químicamente a los XOs precipitados.

Del análisis anterior, se pudo evidenciar que el mejor no solvente fue el 2-propanol, en el que se recuperó el del 61,1 % p/p de los XOs con una concentración final de los mismos de 7,6 g/l, una eliminación de furfural del 100 p/p y una eliminación de los polifenoles totales de 94,7 % p/p (ver tabla F2 presente en el Apéndice F).



#### 4.4 Resinas de Intercambio Iónico

**4.4.1. Tratamiento con resinas catiónicas fuertes en operación batch.** Para el proceso de intercambio iónico usando resinas catiónicas fuertes, la Figura 7 permitió observar una recuperación máxima de XOs (oligómeros de xilosa+oligómeros de arabinosa) cercana al 100 %p/p y una recuperación mínima de XOs del 75,1 % p/p. Las relaciones 1:1, 1:0,2 y 1:0,1 mencionadas en la leyenda de la Figura 7 y Figura 8, corresponden a las relaciones hidrolizado-resina catiónica estudiadas.

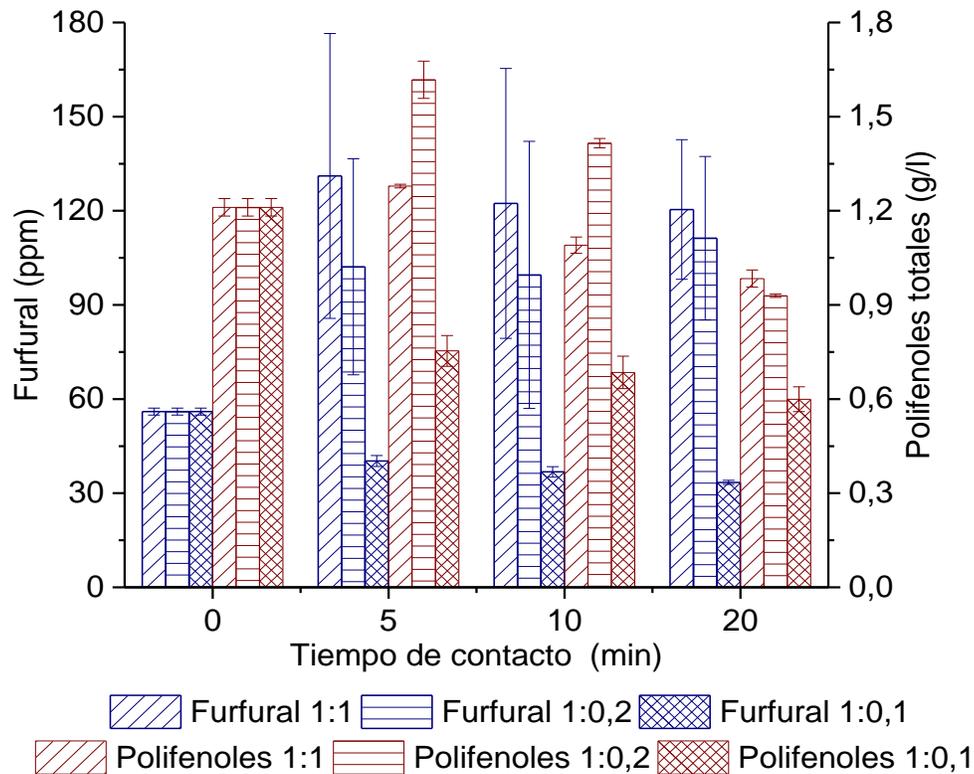


*Figura 7:* Efecto de la relación hidrolizado-resina catiónica a relaciones 1:1, 1:0,2 y 1:0,1 v/v y el tiempo de contacto, sobre la concentración de carbohidratos presentes en el hidrolizado sobrenadante posterior a la operación batch con resina catiónica fuerte bajo agitación constante a temperatura ambiente.



La variación en la concentración de furfural se representa en la Figura 8 en donde se muestra una disminución en la concentración para la relación 1:0,1 hidrolizado-resina al aumentar el tiempo de contacto, obteniendo una reducción del 40,3 %p/p a los 20 min de contacto. En cuanto a la remoción de compuestos fenólicos, la Figura 8 evidencia una disminución de los mismos, logrando una eliminación hasta del 50,5 % p/p para un tiempo de contacto de 20 min a una relación v/v 1:0,1 hidrolizado-resina, siendo ésta última la menor de las utilizadas. Por otra parte, para las relaciones 1:1 y 1:0,2 hidrolizado-resina la concentración de furfural y compuestos fenólicos aumentan, esto se puede atribuir a que a altas cantidades de resina, ésta opera como catalizador en la reacción de conversión de xilosa a furfural debido a la alta presencia de iones  $H^+$  en la superficie de la resina (Agirrezabal-Telleria et al., 2011).

La Figura G3, presente en el Apéndice G, muestra que el tiempo de contacto no es una variable significativa en la modificación de la distribución por peso molecular para la señal UV 280 nm, atribuida a compuestos de degradación de carbohidratos. Para las relaciones 1:1 y 1:0,2 los compuestos con peso molecular de 0,096 kDa (entre ellos el furfural) aumentan, como era de esperarse según los resultados obtenidos por HPLC (Figura 8); por otra parte, para la relación 1:0,1 se evidencia una disminución en las áreas de todos los compuestos detectados, con una mayor disminución en el pico atribuido al furfural.



*Figura 8:* Efecto de la relación hidrolizado-resina catiónica a relaciones a relaciones 1:1, 1:0,2 y 1:0,1 v/v y el tiempo de contacto, sobre la concentración de furfural y compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado sobrenadante posterior a la operación batch con resina catiónica fuerte bajo agitación constante a temperatura ambiente.

Del análisis anterior, se pudo evidenciar que el mejor relación v/v hidrolizado-resina catiónica y tiempo de contacto fue la 1:0,1 y 20 min de contacto, en la que se recuperó el 99,2 % p/p de los XO's con una concentración final de los mismos de 12,3 g/l presente en el hidrolizado sobrenadante, una eliminación de furfural del 40,3 % p/p y una eliminación de los polifenoles totales de 50,5 % p/p retenidos en la superficie de la resina (ver tabla F3 presente en el Apéndice F).



**4.4.1 Tratamiento con resinas aniónicas fuertes en modo batch.** El hidrolizado de pergamino de café fue pre-tratado con resina catiónica a relación 1:0,1 durante 20 min bajo agitación constante a temperatura ambiente, antes de ser sometido al tratamiento con diferentes relaciones de resina aniónica. El mismo tiene una concentración de 11,8 g/l de XOs, 39,7 ppm de furfural y 0,76 g/l de equivalentes de ácido gálico atribuidos a los polifenoles totales. Las relaciones 1:1, 1:0,2 y 1:0,1 mencionadas en la leyenda de la Figura 9 y Figura 10, corresponden a las relaciones hidrolizado-resina aniónica estudiadas.

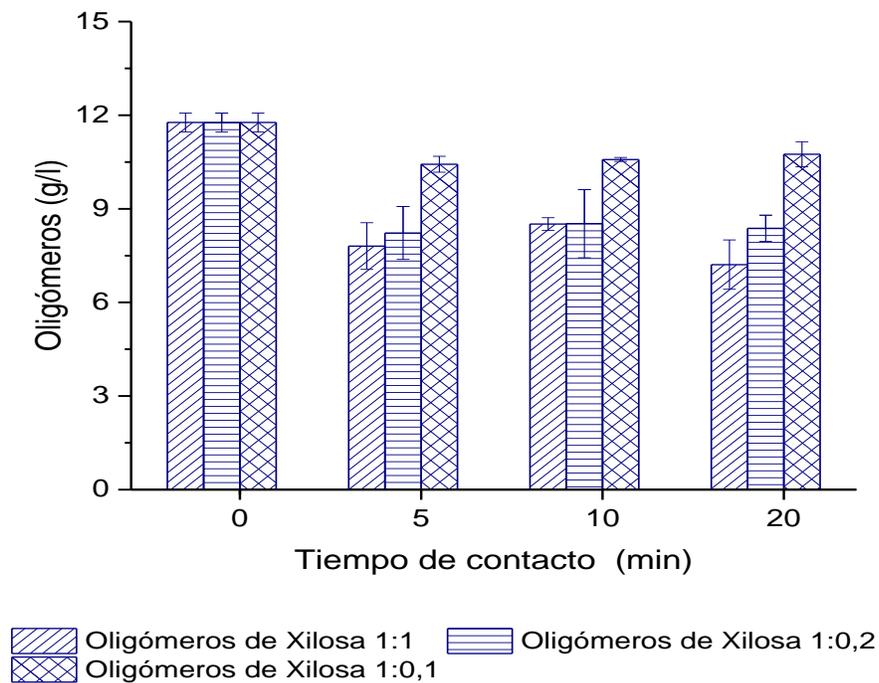


Figura 9: Efecto de la relación hidrolizado-resina aniónica a relaciones 1:1, 1:0,2 y 1:0,1 v/v y el tiempo de contacto, sobre la concentración de carbohidratos presentes en el hidrolizado sobrenadante posterior a la operación batch con resina aniónica fuerte bajo agitación constante a temperatura ambiente.



La Figura 9, cuyo tiempo cero hace referencia al hidrolizado tratado con resina catiónica, muestra que la recuperación de XOs (oligómeros de xilosa+oligómeros de arabinosa) disminuye con el aumento de la relación hidrolizado-resina, sin ser el tiempo de contacto una variable fuertemente significativa; el mayor porcentaje de recuperación de XOs se logró a una relación 1:0,1 hidrolizado-resina a 20 min de contacto con un valor de 86,7 %p/p respecto al tiempo cero.

En cuanto a la eliminación de furfural, la Figura 10 permite apreciar un aumento en el porcentaje de eliminación del compuesto al aumentar la relación hidrolizado-resina y el tiempo de contacto, logrando una completa eliminación del mismo para la relación 1:1 hidrolizado-resina a un tiempo de contacto mayor o igual a 10 min. Así mismo, para la eliminación de compuestos derivados de la lignina, la Figura 10 evidencia que la eliminación de fenólicos aumentó con el incremento de la relación hidrolizado-resina y el tiempo de contacto, logrando la mayor remoción de estos compuestos a la relación 1:1 hidrolizado resina y 20 min de contacto con un porcentaje de remoción del 81,7 % p/p

La distribución de peso molecular obtenida por GPC utilizando el detector UV a 280 nm muestra la eliminación de compuestos no sacáridos para todas las relaciones hidrolizado-resina y tiempos de contacto estudiados, para la relación 1:1 se logra una eliminación casi total de los compuestos presentes, cuyo efecto disminuye al reducir la cantidad de resina añadida (Figura G4, presente en el Apéndice G). Se puede confirmar la tendencia de eliminación de furfural y otros compuestos de degradación en la Figura 10 evidenciada con la disminución del pico de 0,096 kDa atribuido a este compuesto.

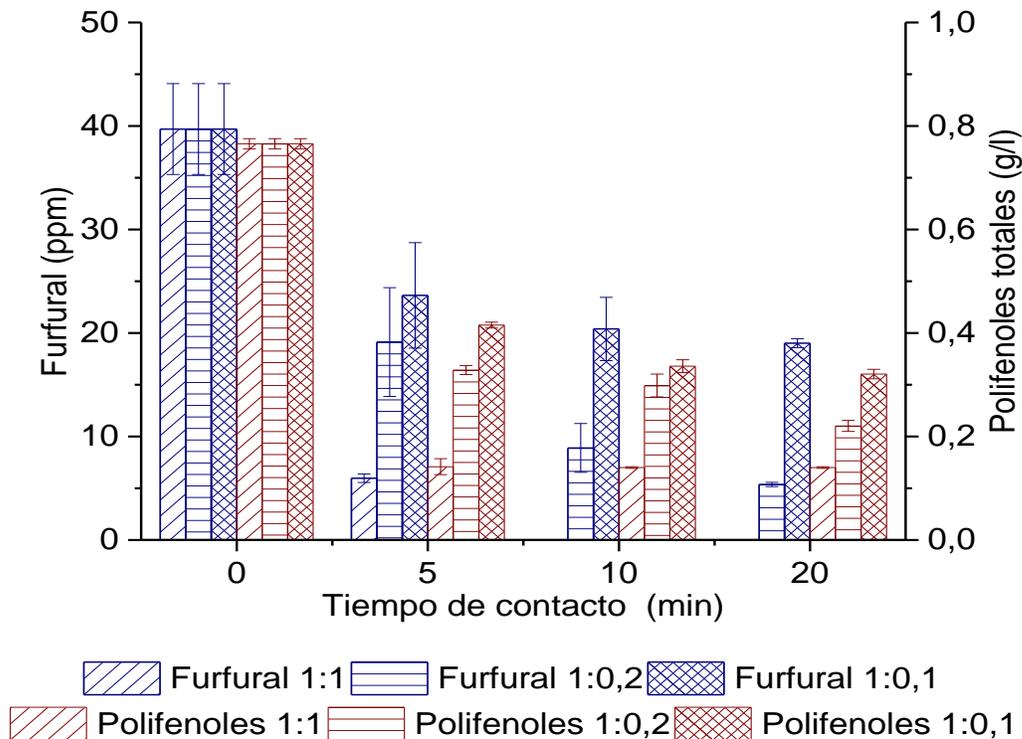


Figura 10: Efecto de la relación hidrolizado-resina aniónica a relaciones a relaciones 1:1, 1:0,2 y 1:0,1 v/v y el tiempo de contacto, sobre la concentración de furfural y compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado sobrenadante posterior a la operación batch con resina aniónica fuerte bajo agitación constante a temperatura ambiente.

Del análisis anterior, se pudo evidenciar que el mejor relación v/v hidrolizado-resina aniónica y tiempo de contacto fue la 1:0,1 y 20 min de contacto, en la que se recuperó el 86,7 % p/p de los XOs con una concentración final de los mismos de 10,7 g/l presente en el hidrolizado sobrenadante, una eliminación de furfural del 66 % p/p y una eliminación de los polifenoles totales de 58,1 % p/p retenidos en la superficie de la resina (ver tabla F4 presente en el Apéndice F).

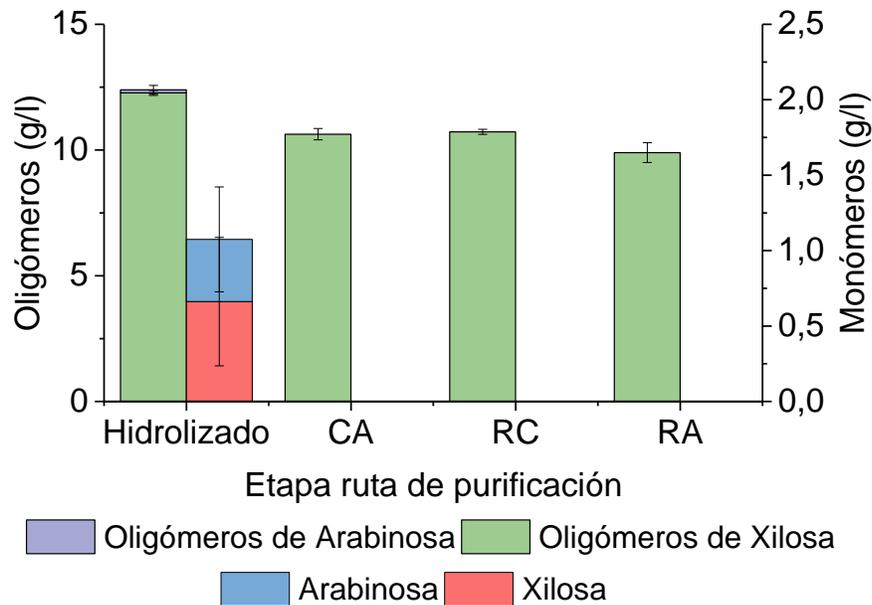


#### 4.5 Ruta de Purificación

La Figura 11 representa la cuantificación de oligosacáridos presentes en los hidrolizados pasados por cada etapa. En la recuperación de XOs (oligómeros de xilosa+oligómeros de arabinosa) se puede apreciar que el tratamiento con carbón activado permitió recuperar el 85% de los XOs contenidos en el hidrolizado inicial. Posteriormente, la resina catiónica no generó pérdida de oligosacáridos, mientras que el tratamiento con la resina aniónica generó una recuperación de XOs del 87,9 % p/p respecto al hidrolizado tratado con resina catiónica.

En cuanto a la eliminación de furfural, la Figura 12A evidencia que todas las etapas disminuyen la concentración de furfural en el hidrolizado después de su operación. El tratamiento con carbón activado remueve el 90,7% del furfural contenido en el hidrolizado inicial, la resina catiónica el 15,8 % del furfural presente en el licor posterior a la etapa de carbón activado y la resina aniónica el 4,7 % p/p del compuesto presente luego de la operación con resina catiónica. Esto significa que, en cuanto a la eliminación de este compuesto, la etapa usando resina aniónica no es favorable ya que genera una alta pérdida de XOs en comparación con la cantidad de furfural eliminado.

La eliminación de compuestos fenólicos es presentada en la Figura 12A la cual evidencia una eliminación casi total de dichos compuestos luego de los tres tratamientos: la adsorción con carbón activado permite eliminar el 84,8 % de los compuestos presentes, la operación con resina catiónica elimina el 51,6 % de los compuestos presentes luego de que el licor fue tratado con carbón, y finalmente la resina aniónica eliminó el 84,2 % p/p de los compuestos remanentes luego de haber sido tratados con la resina catiónica. Esto demuestra que las resinas de intercambio iónico usadas a relación 1:0,1 son efectivas en la eliminación de compuestos fenólicos una vez ha disminuido la carga inicial.



*Figura 11:* Efecto de cada etapa de la ruta de purificación seleccionada (CA: carbón activado, RC: resina catiónica y RA: resina aniónica), sobre la concentración de carbohidratos.

La distribución de peso molecular para los compuestos no sacáridos (Figura 12B) muestra la casi completa eliminación de los mismos con sólo tratar el licor con carbón activado, pero manteniendo la presencia de compuestos de alto peso molecular, a los cuales se asume el color del hidrolizado. Así mismo, se puede observar que no se presenta señal en este detector luego de que el licor fuera tratado con resina aniónica bajo la secuencia de purificación descrita.

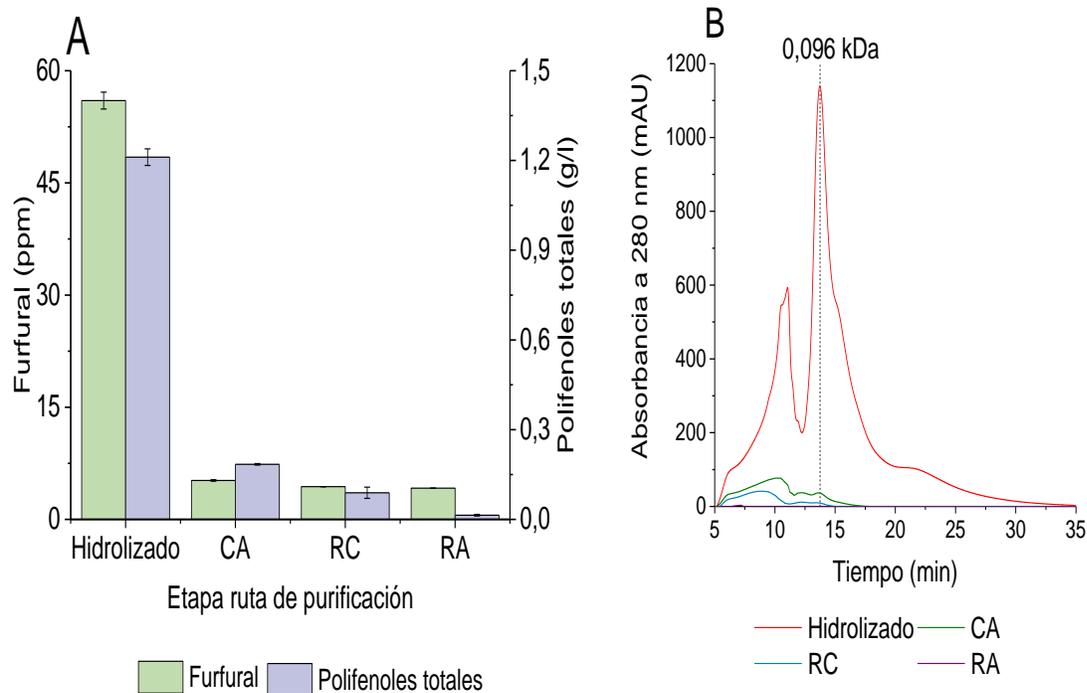


Figura 12: A: Efecto de cada etapa de la ruta de purificación seleccionada (CA: carbón activado, RC: resina catiónica y RA: resina aniónica), sobre la concentración de compuestos fenólicos y B: Cromatogramas GPC. Efecto de cada etapa de la ruta de purificación seleccionada, sobre la distribución de peso molecular, detector UV 280 nm.

De los resultados obtenidos es posible evidenciar la necesidad de la ruta de purificación para obtener un hidrolizado con una remoción del 98,8 % p/p de los polifenoles totales, lo cual permite obtener un hidrolizado transparente (ver Tabla F5 presente en el Apéndice F)



## 5. Conclusiones

- La adsorción con carbón activado utilizando una relación de 20 g carbón/l hidrolizado permitió recuperar el 91,2 % p/p de los XOs, remover el 91,4 % p/p del furfural y eliminar el 88,3% p/p de los compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado inicial, siendo una metodología de purificación altamente eficiente. La selectividad por peso molecular mediante diálisis disminuyó compuestos de bajo peso molecular y concentró compuestos de alto peso molecular gracias al MWCO de las membranas; en la eliminación de compuestos no sacáridos se logró una disminución de su concentración menor al 60% p/p. Por otra parte, la precipitación con no solvente determinó que el 2-propanol es el más adecuado, permitiendo un porcentaje de recuperación de XOs del 61,1% p/p, la no presencia de furfural en el precipitado re-diluido y una remoción del 94,7 %p/p de los compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado inicial.
- La relación hidrolizado-resina catiónica 1:0,1 v/v y un tiempo de contacto de 20 min permitió recuperar el 100 % de los XOs contenidos en el hidrolizado inicial, remover el 40,3% p/p del furfural y eliminar el 50,5% p/p de compuestos fenólicos. Así mismo, la relación hidrolizado-resina aniónica 1:0,1 v/v y un tiempo de contacto de 20 min permitió recuperar el 86,7 % p/p de los XOs, remover el 66 %p/p del furfural y eliminar el 58,1 %p/p de los compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado, luego de haber sido tratado con resina catiónica a relación 1:0,1 durante 20 min.



- La evaluación de la ruta de purificación realizada permitió obtener un producto final con una recuperación del 79,9 %p/p de los XO's con una concentración de los mismos de 9,9 g/l, remover el 92,6 % p/p del furfural y eliminar el 98,8 %p/p de los compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado inicial, obteniendo un hidrolizado transparente.



## 6. Recomendaciones

- Se recomienda probar otras columnas en la cuantificación de monosacáridos y furfural por HPLC con el fin de determinar de manera adecuada estos compuestos cuando se encuentran presentes a concentraciones menores a 1 g/l.
- Se recomienda cuantificar otros compuestos de degradación como el HMF, ácido acético, y otros compuestos derivados de carbohidratos y lignina con el fin de evaluar la eficiencia de las metodologías estudiadas en la remoción de estos compuestos.



### Bibliografía

- Aachary, A. A., & 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. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00135.x>
- Agirrezabal-Telleria, I., Larreategui, A., Requies, J., Güemez, M. B., & Arias, P. L. (2011). Furfural production from xylose using sulfonic ion-exchange resins (Amberlyst) and simultaneous stripping with nitrogen. *Bioresource Technology*, 102(16), 7478-7485. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.015>
- Ardila, A., & Yulieth, P. (2018). Análisis de las variables del proceso de ultrafiltración en la separación de xilo-oligosacáridos (XOs) presentes en hidrolizados de pergamino de café.
- Beltrán, Y., Morris, H. J., de la Cruz, E. R., Quevedo, Y., & Bermúdez, R. C. (2013). Content of total phenols in *Pleurotus* sp. extracts obtained with solvents of different polarity. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 32(2), 121-129. Recuperado a partir de <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84884148370&partnerID=40&md5=4e27ceb4cc02d23c6a43f6449e63138a>
- Bian, J., Peng, F., Peng, X. P., Peng, P., Xu, F., & Sun, R. C. (2013). Structural features and antioxidant activity of xylooligosaccharides enzymatically produced from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 127, 236-241. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.112>
- Carvalho, F., Esteves, M. P., Parajó, J. C., Pereira, H., & Gírio, F. M. (2004). Production of



- oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technology*, *91*(1), 93-100. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00148-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00148-2)
- Chen, M. (2014). Autohydrolysis of Miscanthus X Giganteus for the production of xylooligosaccharides, (1), 1-146. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Chen, M. H., Bowman, M. J., Cotta, M. A., Dien, B. S., Iten, L. B., Whitehead, T. R., ... Singh, V. (2016). Miscanthus X giganteus xylooligosaccharides: Purification and fermentation. *Carbohydrate Polymers*, *140*, 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.052>
- Chen, M. H., Bowman, M. J., Dien, B. S., Rausch, K. D., Tumbleson, M. E., & Singh, V. (2014). Autohydrolysis of Miscanthus x giganteus for the production of xylooligosaccharides (XOS): Kinetics, characterization and recovery. *Bioresource Technology*, *155*, 359-365. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.050>
- Chen, X., Wang, Z., Fu, Y., Li, Z., & Qin, M. (2014). Bioresource Technology Specific lignin precipitation for oligosaccharides recovery from hot water wood extract. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, *152*, 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.113>
- Chen, X., Yang, Q., Si, C. L., Wang, Z., Huo, D., Hong, Y., & Li, Z. (2016). Recovery of Oligosaccharides from Prehydrolysis Liquors of Poplar by Microfiltration/Ultrafiltration Membranes and Anion Exchange Resin. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, *4*(3), 937-943. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01029>
- De Mancilha, I. M., & Karim, M. N. (2003). Evaluation of Ion Exchange Resins for Removal of Inhibitory Compounds from Corn Stover Hydrolyzate for Xylitol Fermentation. *Biotechnology Progress*, *19*(6), 1837-1841. <https://doi.org/10.1021/bp034069x>
- Fernandes, D. L. A., Silva, C. M., Xavier, A. M. R. B., & Evtuguin, D. V. (2012). Fractionation



- of sulphite spent liquor for biochemical processing using ion exchange resins. *Journal of Biotechnology*, 162(4), 415-421. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.03.013>
- García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu. *Universitat politècnica de Valencia*, 1, 2-8.
- Garrote, G., Cruz, J. M., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2008). Non-isothermal autohydrolysis of barley husks: Product distribution and antioxidant activity of ethyl acetate soluble fractions. *Journal of Food Engineering*, 84(4), 544-552. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.06.021>
- Garrote, G., Falqué, E., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2007). Autohydrolysis of agricultural residues: Study of reaction byproducts. *Bioresource Technology*, 98(10), 1951-1957. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.07.049>
- Gómez, B., Míguez, B., Veiga, A., Parajó, J. C., & Alonso, J. L. (2015). Production, Purification, and in Vitro Evaluation of the Prebiotic Potential of Arabinoxyloligosaccharides from Brewer's Spent Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(38), 8429-8438. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03132>
- Gullón, B., Alonso, J. L., & Parajó, J. C. (2010). Ion-exchange processing of fermentation media containing lactic acid and oligomeric saccharides. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49(8), 3741-3750. <https://doi.org/10.1021/ie901397k>
- Gullón, P., González-Muñoz, M. J., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2008). Membrane processing of liquors from *Eucalyptus globulus* autohydrolysis. *Journal of Food Engineering*, 87(2), 257-265. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.11.032>
- Gullón, P., González-Muñoz, M. J., van Gool, M. P., Schols, H. A., Hirsch, J., Ebringerová, A., &



- Parajó, J. C. (2010). Production, refining, structural characterization and fermentability of rice husk xylooligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3632-3641. <https://doi.org/10.1021/jf904508g>
- Gütsch, J. S., & Sixta, H. (2012). Regeneration of spent activated charcoals used for lignin removal from prehydrolysis-kraft prehydrolyzates. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 51(25), 8624-8630. <https://doi.org/10.1021/ie3006116>
- Imman, S., Arnthong, J., Burapatana, V., Laosiripojana, N., & Champreda, V. (2013). Autohydrolysis of tropical agricultural residues by compressed liquid hot water pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(8), 1982-1995. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0320-1>
- Jayapal, N., Samanta, A. K., Kolte, A. P., Senani, S., Sridhar, M., Suresh, K. P., & Sampath, K. T. (2013). Value addition to sugarcane bagasse: Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. *Industrial Crops and Products*, 42(1), 14-24. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.019>
- Kabel, M. A., Carvalheiro, F., Garrote, G., Avgerinos, E., Koukios, E., Parajó, J. C., ... Voragen, A. G. J. (2002). Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylooligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 50(1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00045-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00045-0)
- Kabel, M. A., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2002). Complex xylo-oligosaccharides identified from hydrothermally treated Eucalyptus wood and brewery's spent grain. *Carbohydrate Polymers*, 50(2), 191-200. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00022-X)
- Leal, M. (2017). Producción de oligosacáridos mediante autohidrólisis de residuos provenientes



de la cadena agroindustrial del café.

- Li, J. E., Wang, W. J., Zheng, G. D., & Li, L. Y. (2017). Physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from *Gynura procumbens* leaves by fractional precipitation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 719-724. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.113>
- Liu, L., Ren, J., Zhang, Y., Liu, X., & Ouyang, J. (2018). Simultaneously separation of xylo-oligosaccharide and lignosulfonate from wheat straw magnesium bisulfite pretreatment spent liquor using ion exchange resin. *Bioresource Technology*, 249(September 2017), 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.207>
- Moure, A., Gullón, P., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry*, 41(9), 1913-1923. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.011>
- Nabarlatz, D. A. (2007). *Departament d' Enginyeria Química BY-PRODUCTS FOR THE PRODUCTION OF XYLO-OLIGOSACCHARIDES Dissertation presented by in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor by the Universitat Rovira i Virgili European PhD.*
- Otieno, D. O., & Ahring, B. K. (2012). The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: Xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS). *Carbohydrate Research*, 360, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.07.017>
- Parajó, J. C., Garrote, G., Cruz, J. M., & Dominguez, H. (2004). Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. *Trends in Food Science*



*and Technology*, 15(3-4), 115-120. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.009>

Sandoval, M., & Viviescas, P. (2017). Autohidrólisis de residuos lignocelulósicos de la agroindustria colombiana: Análisis del proceso para la producción de xilo-oligosacáridos (XOs).

Shi, Y., Liu, T., Han, Y., Zhu, X., Zhao, X., Ma, X., ... Zhang, Q. (2017). An efficient method for decoloration of polysaccharides from the sprouts of *Toona sinensis* (A. Juss.) Roem by anion exchange macroporous resins. *Food Chemistry*, 217, 461-468. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.079>

Susanto, H., Roihatin, A., & Widiassa, I. N. (2016). Production of colorless liquid sugar by ultrafiltration coupled with ion exchange. *Food and Bioproducts Processing*, 98, 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.12.002>

Swennen, K., Courtin, C. M., Van Der Bruggen, B., Vandecasteele, C., & Delcour, J. A. (2005). Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxylooligosaccharides with different structures. *Carbohydrate Polymers*, 62(3), 283-292. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.001>

Vázquez, M. J., Alonso, J. L., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2001). Xylooligosaccharides: Manufacture and applications. *Trends in Food Science and Technology*, 11(11), 387-393. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00031-0)

Vázquez, M. J., Garrote, G., Alonso, J. L., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2005). Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: Evaluation of operational strategies. *Bioresource Technology*, 96(8), 889-896. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.08.013>



- Vegas, R., Alonso, J. L., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2004). Processing of rice husk autohydrolysis liquors for obtaining food ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), 7311-7317. <https://doi.org/10.1021/jf049142t>
- Wang, X., Zhuang, J., Jiang, J., Fu, Y., Qin, M., & Wang, Z. (2015). Separation and purification of hemicellulose-derived saccharides from wood hydrolysate by combined process. *Bioresource Technology*, 196, 426-430. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.064>
- Wang, Y., Zhang, J., Qu, Y., & Li, H. (2017). Removal of chromophore in enzymatic hydrolysis by acid precipitation to improve the quality of xylo-oligosaccharides from corn stalk. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.068>
- Wang, Z., Jiang, J., Wang, X., Fu, Y., Li, Z., Zhang, F., & Qin, M. (2014). Selective removal of phenolic lignin derivatives enables sugars recovery from wood prehydrolysis liquor with remarkable yield. *Bioresource Technology*, 174, 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.025>
- Zeitoun, R., Pontalier, P. Y., Marechal, P., & Rigal, L. (2010). Twin-screw extrusion for hemicellulose recovery: Influence on extract purity and purification performance. *Bioresource Technology*, 101(23), 9348-9354. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.022>



**Apéndices**

**Apéndice A: Estado del Arte de los Compuestos Indeseados Presentes en los Hidrolizados**

*Tabla A1:* Compuestos indeseados presentes en el hidrolizado producido mediante autohidrólisis

Biomasa	Condiciones de reacción	Compuestos derivados de azúcares (CDA)	Valor	Unidades	Referencia
Mazorcas de maíz	8:1 kg líquido/kg sólido Rampa de calentamiento hasta 202°C	Furfural	887,1	mg/kg biomasa seca	(Gil Garrote et al., 2007)
		5-Metil furfural	111,1		
		4,5-dimetilfurfural	20,6		
		Acetilfurano	12,8		
Cáscaras de arroz	8:1 kg líquido/kg sólido Rampa de calentamiento hasta 205°C	Furfural	456,3	mg/kg biomasa seca	(Gil Garrote et al., 2007)
		5-Metil furfural	96,3		
		4,5-dimetilfurfural	12		
		2-Acetilfurano	10,8		
Grano gastado de la cervecería	150° 60 min 8:1 kg líquido/kg sólido	Ácido fórmico	0,6	g/l	(Kabel et al., 2002)
		Ácido levulínico	0,05		
		Furfural	0,2		
		HMF	0,02		
Grano gastado de la cervecería	8:1 kg líquido/kg sólido Temperaturas de 150, 170 o 190 °C Tiempo de calentamiento de 32 a 44 min	Ácido acético	0,36-2,19	g/l	(Carvalho et al., 2004)
		Ácido fórmico	0,15-0,39		
		Ácido levulínico	0-0,37		
		Furfural	0,01-1,16		
		HMF	0,01-0,39		



Cáscaras de cebada	8:1 kg líquido/kg sólido Rampa de calentamiento hasta 216°C	Furfural HMF Ácido acético	4,9 0,65 3	g/l	(G. Garrote et al., 2008).
Miscanthus x giganteus	9:1 kg líquido/kg sólido Rampa de calentamiento hasta 140, 160, 180, 200 o 220°C	Ácido acético Furfural HMF Ácido fórmico Ácido levulínico	0,2-3,5 0,2-5,6 0-0,6 0-0,6 0-0,1	% de biomasa seca	(Chen et al., 2014)

Tabla A2: Compuestos indeseados presentes en el hidrolizado producido mediante autohidrólisis

Biomasa	Condiciones de reacción	Compuestos derivados de lignina (CDL)	Valor	Unidades	Referencia
Mazorcas de maíz	8:1 kg líquido/kg sólido Rampa de calentamiento hasta 202°C	Vanilina	653	mg/kg biomasa seca	(Gil Garrote et al., 2007)
		4-Vinylguaiacol	289,8		
		4-Vinilfenol	248		
		Siringaldehído	144,7		
		Acetovanillona	80,8		
Cáscaras de arroz	8:1 kg líquido/kg sólido Rampa de calentamiento hasta 205°C	4 - Hidroxi - 2 - metoxicinamaldehído	79,2		
		Vanilina	216,7		
		4-Vinylguaiacol	89,6		
		4-Vinilfenol	153,4		
		Siringaldehído	96,6		
	Acetovanillona	73,6			
	4 - Hidroxi - 2 - metoxicinamaldehído	136,1			



Cáscaras de cebada	8:1 kg líquido/kg sólido Rampa de calentamiento hasta 216°C	Ácido benzoico: 3,428 Ácido gálico: 0,564 Vanilina: 0,056	3,428 0,564 0,056	g/l	(G. Garrote et al., 2008).
--------------------	---	---	-------------------------	-----	-------------------------------

Tabla A3: Compuestos indeseados presentes en el hidrolizado producido mediante autohidrólisis.

Biomasa	Condiciones de reacción	Compuestos que contienen nitrógeno (CCN)	Valor	Unidades	Referencia
Mazorcas de maíz	8:1 kg líquido/kg sólido Rampa de calentamiento hasta 202°C	1 – pirrol-2- carboxaldehído Metilpirrolacarboxaldehído	17,4 12,2	mg/kg biomasa seca	(Gil Garrote et al., 2007)

Tabla A4: Compuestos indeseados presentes en el hidrolizado producido mediante autohidrólisis.

Biomasa	Condiciones de reacción	Ácidos grasos (AG)	Valor	Unidades	Referencia
Mazorcas de maíz	8:1 kg líquido/kg sólido Rampa de calentamiento hasta 202°C	Ácido hexadecanoico Ácido octadecanoico Ácido tetradecanoico	40,3 30 28,4	mg/kg biomasa seca	(Gil Garrote et al., 2007)
Cáscaras de arroz	8:1 kg líquido/kg sólido Rampa de calentamiento hasta 205°C	Ácido hexadecanoico Ácido octadecanoico	27,9 23,8	mg/kg biomasa seca	(Gil Garrote et al., 2007)



**Apéndice B: Estado del Arte de las Metodologías de Purificación de Hidrolizados de BLR**

*Tabla B1: Revisión bibliográfica: Purificación usando carbón activado.*

Biomasa	Metodología	Resultados	Referencia
Miscanthus x giganteus	-Relaciones: 1%, 5%, 10% y 20% (g/ml). -Agitación a 100 rpm por 60 min. -Centrifugación a 2600 g por 10 min.	La adsorción de XOS en el carbón fue del 5,8%, 46,8%, 98,3% y 100% respectivamente.	(M. H. Chen et al., 2014)
Tallo de maíz	-Lavado del AC con HCl al 1%, lavado con agua desionizada, secado a 105°C por 8h y enfriamiento a Tamb.	-pHi Sln 2, 0,04 g AC/ml, 50°C durante 40 min. -Añadido de 2%(p/v) de tierras diatomeas en la solución de adsorción.	(Y. Wang et al., 2017)
Mazorcas de maíz, conchas de almendras, piedras de oliva, paja de trigo, paja de cebada y cáscaras de arroz	-Operación batch a relaciones 1.5 a 50 mg/ml a 30°C bajo agitación durante 24 h. -Operación en columna con un flujo ascendente de 6 ml/min empacada con 22 g de carbón y un tiempo de residencia de 0.15 h	-Obtención de la relación de 16.7 como la mejor para la purificación de los hidrolizados. -Retención del 64% de los compuestos derivados de lignina y 21% de los carbohidratos en la operación en columna	(Nabarlatz, 2007)



Tabla B2: Revisión bibliográfica: Purificación usando membranas dialíticas.

Biomasa	Metodología	Resultados	Referencia
Mazorcas de maíz, conchas de almendras, piedras de oliva, paja de trigo, paja de cebada y cáscaras de arroz	Ensayo de diálisis usando una bolsa de 12.4 kDa usando como solvente de diálisis agua destilada y la conductividad como variable de control	Eliminación de compuestos de bajo peso molecular y quedando con los de alto peso molecular.	(Nabarlatz, 2007)
Madera	-Alimentación de 10 ml en un tubo de diálisis de MWCO 1 y 3 kDa. -La diálisis se realizó en 200 ml de agua desionizada controlando el pH y la conductividad	-Disminución de la lignina hasta una concentración de 0.72 y 0.42 mg/ml respectivamente para cada MWCO. -Pérdida del 57.5 y del 60% de los OS respectivamente. -Pureza del producto final del 94.1% y del 95.6% de OS.	(X. Chen et al., 2014)
Caña de azúcar	-Uso para dializar el precipitado del contacto con etanol con el fin de recuperar carbohidratos. -Tubo de diálisis de MWCO 3500 Da en agua destilada durante 96h a Tamb.	Liofilización del permeado obteniendo una composición de 11.2% arabinosa, 83.1% xilosa, 0.5% galactosa, 3.0% glucosa, and 2.1% ácidos urónicos.	(Bian et al., 2013)



Tabla B3: Revisión bibliográfica: Purificación usando precipitación química.

Biomasa	Metodología	Resultados	Referencia
Miscanthus x giganteus	Elución secuencial de la torta de carbón con soluciones etanol-agua al 5%, 30%, 50%, 70% y 95 % (v/v). -Eliminación del etanol	2,7% de XOS eluidó en una fracción al 5%; 19,1% en una fracción al 30%; 16,2% en una fracción al 50%; 6.4% en una fracción al 70% y 1.0% en una fracción al 95%.	(M. H. Chen et al., 2016)
Tallo de maíz	La elución de XOS se investigó en cuatro regímenes: -Solo 50% -20% y 50% -10%, 30% y 50% -15%, 30%, 50% y 70%	Se encontró el mejor XOS en cuatro gradientes de concentración. La mayor pureza de XOS fue 97.87% obtenida a partir de etanol al 30%, con el valor de color más bajo, 780.	(Y. Wang et al., 2017)
Harina de trigo	-Se agregó etanol hasta una concentración de 60% (v / v) y se mantuvieron durante la noche para recuperarlos por centrifugación y re disolver en agua. La concentración de etanol del sobrenadante se aumentó adicionalmente hasta el 90% (v / v) y la fracción precipitada, se recuperó como se describe anteriormente.	-A bajas concentraciones de etanol se precipitan altos DP y medias y altas DS. -Al aumentar la concentración de etanol precipitan DS Y DP más bajos	(Swennen et al., 2005)
Mazorcas de maíz, conchas de almendras, piedras de oliva, paja de trigo, paja de cebada y cáscaras de arroz	Ensayo de precipitación con etanol a relación 7:1 usando 7 ml de etanol y 1 ml de licor permitiendo el contacto por 24 h y separando por centrifugación.	Recuperación de los XOS de alto peso molecular, pero pérdida de los mismos de bajo peso molecular debido a su baja selectividad.	(Nabarlatz, 2007)



Cáscara de arroz	<p>Ensayo 1: Precipitación con etanol, acetona y 2-propanol.                      Contacto a relación 4.5 kg solvente/kg licor durante 12 h a Tamb.                      Ensayo 2: -Contacto a relación 5 kg solvente/kg licor liofilizado durante 12 h a Tamb.                      Separación del precipitado por filtración y disolución en agua.</p>	<p>Ensayo 1: El etanol condujo al contenido mínimo de ONVC, pero con un rendimiento limitado en la recuperación de NVC y XOS. El 2-propanol tuvo una peor remoción de ONVC, pero aumento el rendimiento de recuperación de NVC y XOS. La acetona presento un comportamiento similar al del 2-propanol con rendimientos de recuperación ligeramente menores.                      Ensayo 2: Las recuperaciones de NVC y XOS mejoran significativamente con respecto al ensayo 1 pero, aun así, fueron deficientes.</p>	(Vegas et al., 2004)
Madera de eucalipto	<p>Ensayo 1: -Precipitación con etanol, acetona y 2-propanol. -                      Contacto a relaciones volumétricas en el intervalo de 0,5:1 a 10:1 durante 24 h                      Ensayo 2: -Contacto a relación solvente/masa de licor liofilizado 7:1 Tamb.</p>	<p>Ensayo 1: El tipo y la cantidad de solvente tuvo poco efecto sobre la cantidad de NVDS precipitada.                      Ensayo 2: Etanol mostró los mejores resultados con el más alto porcentaje de HDNVS, la menor cantidad de monosacáridos y la mayor cantidad de XOS.</p>	(Vázquez et al., 2005)



Tabla B4: Revisión bibliográfica: Purificación usando resinas catiónicas fuertes.

Biomasa	Metodología	Resultados	Referencia
Miscanthus x giganteus	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Se puso en contacto con una resina catiónica fuerte a una relación 1:10 (g resina/ml) durante 24 h.</li> <li>-Separación mediante filtración.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Porcentajes de XOS y TSOS en solución de XOS seca aumentaron a 68.3 y 81.9% (p / p), respectivamente</li> <li>-Esta resina eliminó los metales pesados.</li> </ul>	(M. H. Chen et al., 2016)
Madera	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Después del tratamiento con cal se pasa a una columna de lecho mixto (10 mm de diámetro interior x 200 mm de longitud) empacada con resina aniónica y catiónica fuerte.</li> <li>-Alimentación en flujo ascendente con una bomba a 20 ml/h durante 3h.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Captura de los iones de calcio derivados de la cal.</li> <li>-Protección de la resina aniónica.</li> </ul>	(X. Wang et al., 2015)
Maíz	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Se eluyen primero con una solución de xilosa a una concentración de 50 g/l a una velocidad de 3 ml/min con un volumen equivalente a 2,1 BV (volumen del lecho).</li> <li>-Lavado con agua desionizada y elución con hidrolizados a 3 ml/min con un volumen de 3 BV.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Las resinas catiónicas no pueden remover el ácido acético.</li> <li>-La resina CS 14GC recuperó el 100% de la xilosa.</li> </ul>	(De Mancilha & Karim, 2003)
Grano gastado de la cervecía	<ul style="list-style-type: none"> <li>Operación batch con Amberlite 200, resina catiónica fuerte, a relación 1:15 g resina/g licor bajo agitación a Tamb durante 24 h.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>El producto final contenía 84% Os sustituidos y 8% de otros compuestos no volátiles.</li> </ul>	(Gómez et al., 2015)



Tabla B5: Revisión bibliográfica: Purificación usando resinas aniónicas.

Biomasa	Metodología	Resultados	Referencia
Miscanthus x giganteus	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Finalizado el contacto con la resina catiónica se pone en contacto con una resina aniónica débil a relación 1:10 (g resina/ml).</li> <li>-Siguiendo a la aniónica débil se pone en contacto con una aniónica fuerte 1:10 (g resina/ml).</li> <li>-Separación mediante filtración por gravedad con filtros de fibra de vidrio.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Mediante el uso de la resina de anión débil, la proporción de XOS y TSOS aumentó a 74.9 y 89.4% (p / p), respectivamente. -El tratamiento adicional con resina de pulido dio como resultado XOS al 74.9% (p / p) y TSOS al 89.1% (p / p).</li> <li>-La resina aniónica débil eliminó los ácidos orgánicos y la resina aniónica fuerte eliminó los compuestos de color que se presume son compuestos fenólicos que se derivan de la lignina.</li> </ul>	(M. H. Chen et al., 2016)
Madera	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Después del tratamiento con cal se pasa a una columna de lecho mixto (10 mm de diámetro interior x 200 mm de longitud) empacada con resina aniónica y catiónica fuerte.</li> <li>-Alimentación en flujo ascendente con una bomba a 20 ml/h durante 3h.</li> </ul>	Captura de compuestos fenólicos.	(X. Wang et al., 2015)
Maíz	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Resinas en contacto con agua desionizada durante 24 h a Tamb.</li> <li>-Columnas de 1,5 cm de diámetro se eluyen primero con una solución de xilosa a una concentración de 50 g/l a una velocidad de 3 ml/min a un volumen equivalente a 2,1 BV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-La resina aniónica débil A 103S eliminó el 100% del HMF, el 99% del furfural y 95% del color y el 100% del ácido acético siendo la mejor resina.</li> <li>- Entre las resinas aniónicas fuertes la A 500P mostró un mejor rendimiento de remoción que la A 860S.</li> </ul>	(De Mancilha & Karim, 2003)



Cáscara de arroz	<p>(volumen del lecho).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Lavado con agua desionizada y elución con hidrolizados a 3 ml/min con un volumen de 3 BV.</li> <li>-Amberlite IRA 96 (resina aniónica débil).</li> <li>-Contacto durante la noche bajo agitación suave a temperatura ambiente, relación resina-licor 1:15.</li> <li>-Liofilización de los licores resultantes.</li> </ul>	<p>-Los porcentajes de recuperación respecto al hidrolizado inicial fueron: 14,1% monosacáridos, 38% GOS, 37,2% XOSM 29% Ara, 31,3% grupos acetilo, 26,7% UA y 2,28% ONVC.</p>	(Patricia Gullón et al., 2010)
Cáscara de arroz	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Amberlite IRA 400 y Amberlite IRA 96.</li> <li>-Contacto de 12 h bajo agitación suave a Tamb a relación 1:20 (kg de resina/kg de licor)</li> </ul>	<p>IRA 96 retuvo una mayor cantidad de NVC, XOS y una cantidad similar de ONVC que IRA 400 por lo cual la mejor resina para el proceso fue IRA 400 que presento una mejor purificación que los ensayos con precipitación.</p>	(Vegas et al., 2004)
Grano gastado de la cervecería y madera de eucalipto	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Resina aniónica fuerte Source 15Q en columna.</li> <li>-Activación con solución acetato de sodio 1 M con 5 BV.</li> <li>-Lavado del exceso de iones con agua 10BV.</li> <li>-La muestra se aplicó a la columna y</li> </ul>	<p>Madera de eucalipto: Los oligosacáridos neutros (71%) se recuperaron por elución con agua y los cargados por los gradientes de elución descritos obteniendo un rendimiento de 13, 7, 4 y 3% respectivamente.</p> <p>Grano gastado de la cervecería: Solo se realizaron dos agrupaciones ya que la mayoría de los oligosacáridos</p>	(Kabel, Schols, & Voragen, 2002)



Paja de trigo	<p>los oligómeros ácidos se separaron de los neutros con el siguiente gradiente: (25 ml / min): 0-1250 ml → solo agua; 1250-1750 ml → tampón de acetato de sodio 0-17 mM; 1750-2250 ml → 17-30 mM de tampón; 2250-3000 ml → tampón isocrático 30 mM y 3000-6000 ml → 100 mM de tampón.</p> <p>-Columna de lecho fijo con un volumen de lecho de 24 ml.</p> <p>-Alimentación por el tope de 24 ml a 0,4 ml/min</p> <p>Proceso de regeneración: Lavado con 2,3 BV de agua desionizada (bed volumen) a 0,8 ml/min, lavado con 6 BV de soluciones 10% NaCl y 2% NaOH a 1 ml/min.</p>	<p>eran neutros (elución con agua) y el resto la mezcla de las eluciones con tampón de acetato.</p> <p>-Recuperación del 93,09% XO<sub>s</sub> con una pureza del 60,09%. -Recuperación del 98,03% de lignosulfonato mediante el proceso de regeneración con una pureza del 91,92%.</p>	(Liu, Ren, Zhang, Liu, & Ouyang, 2018)
Mazorcas de maíz, conchas de almendras, piedras de oliva, paja de trigo, paja de cebada y cáscaras de arroz	<p>-Ensayos en batch con Amberlite XAD-2 resina aniónica débil.</p> <p>-Formación de 50 ml de lecho húmedo en un vaso de precipitado y añadiendo 20 ml de licor.</p>	<p>Eliminación de compuestos derivados de la lignina de bajo peso molecular.</p>	(Nabarlatz, 2007)



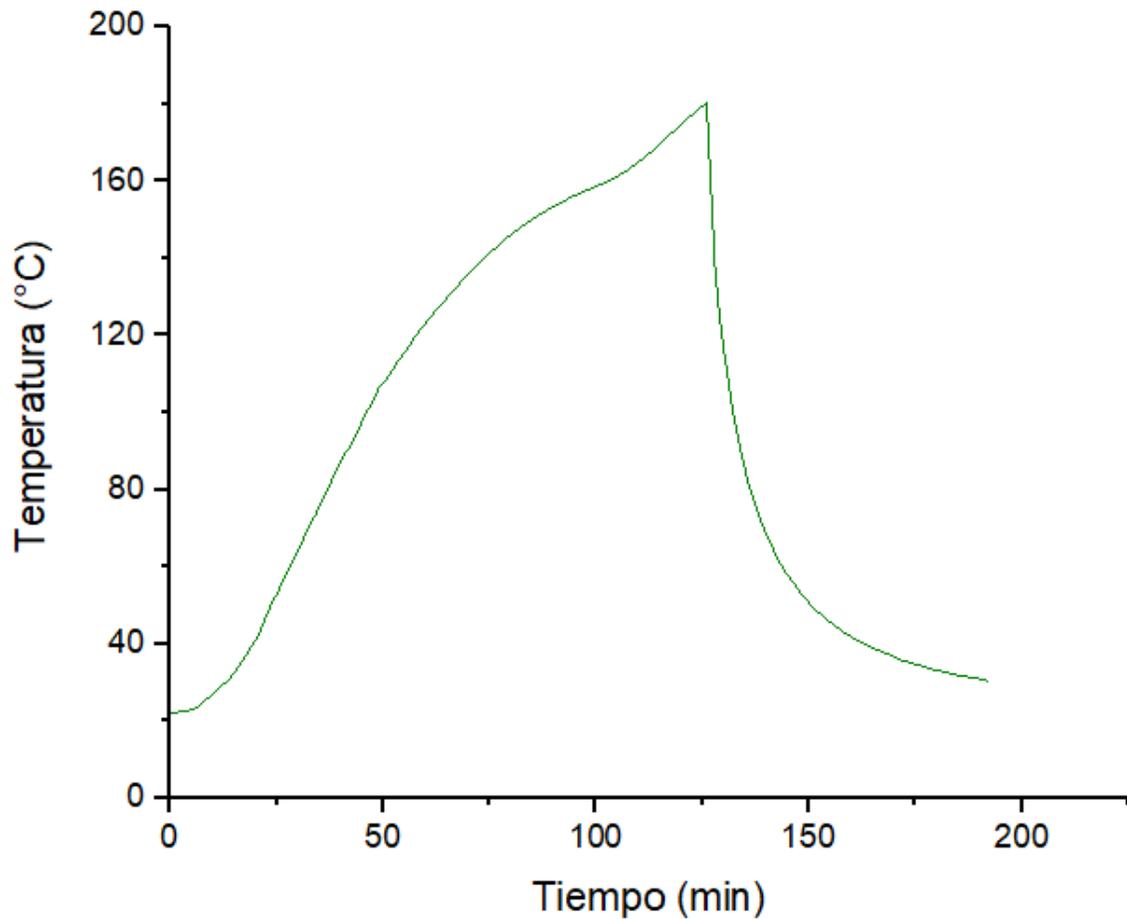

---

Madera	Operación batch usando relaciones a 1%, 2% y 3% permitiendo el contacto bajo agitación durante 2 h a Tamb	Remoción de lignina del 40%, 63% y del 71% para cada relación de resina estudiada.	(Z. Wang et al., 2014)
Grano gastado de la cervecería	Operación batch con Amberlite IRA 400, resina aniónica fuerte, a relación 1:10 g resina/g licor bajo agitación a Tamb durante 24 h.	Disminución > al 50% de otros compuestos no volátiles y pérdida por debajo del 10% de oligosacáridos.	(Gómez et al., 2015)
Álamo	Operación en columna con resina aniónica débil D311 y aniónica fuerte D201 a un flujo de 3 ml/min.	-Eliminación completa de furfural y HMF. -Eliminación del 93,13% de la lignina respecto al hidrolizado inicial. Recuperación de 41.7% de los OS con una pureza del 96.4%.	(X. Chen et al., 2016)
Pulpa de manzana suplementado con extracto de levadura o licor macerado de maíz	- Adecuación de las resinas Amberlite IRA400 y Amberlite IRA96 a forma Cl. Operación en columna de lecho fijo con alimentación por el tope a 5ml/min.	Los medios suplementados con extractor de levadura permitieron mayores recuperaciones de OS y Amberlite IRA 96 fue la más eficiente para separar oligosacáridos y ácido láctico.	(B. Gullón, Alonso, & Parajó, 2010)

---



Salvado de trigo	<p>-Resinas aniónicas fuertes IRA 958Cl IRA 900OH y Xad 16.</p> <p>-Operación en columna para cada resina con un caudal de 10 BV/h pasando 15 BV por cada columna.</p> <p>-Lavado con agua desionizada y regeneración con 2 BV de solución NaOH 1M a una velocidad de 4 BV/H</p>	La mejor decoloración se logró con IRA 958 Cl	(Zeitoun, Pontalier, Marechal, & Rigal, 2010)
Caña de azúcar	<p>Estudio de resinas Lewatit S6368 y OC1074 y mezcla de las mismas en operación batch.</p>	<p>-Deficiente purificación con resina directa debido a la alta carga de compuestos coloreados.</p> <p>-Eficiente purificación para la mezcla de las resinas a relación 1:1 como proceso siguiente a una ultrafiltración</p>	(Susanto, Roihatin, & Widiassa, 2016)
Toona Sinesis	<p>Evaluación de diferentes resinas en batch añadiendo 5 g de resina en un matraz de 250 ml con el fin de determinar la mejor resina y sus óptimos parámetros de operación en la decoloración de los licores.</p>	<p>-La mejor resina fue D941 con parámetros de 45°C, pH 8.5 y 90 min de contacto.</p> <p>-Escalado a columna con 5.5 BV con un flujo de 2 BV/h.</p> <p>-Eliminación del 91.94 % de los compuestos coloreados y recuperación del 90.05% de los azúcares.</p>	(Shi et al., 2017)

**Apéndice C: Rampa de Calentamiento y Enfriamiento del Reactor**

*Figura C1:* Perfil de temperatura de la reacción de autohidrólisis en el reactor Parr



### Apéndice D: Curvas de Calibración para la Cuantificación de XOs, Fenoles y Furfural

**Curvas de calibración HPLC.** Cada experimento de calibración se llevó por duplicado en tubos de ensayo usando agua desionizada y el respectivo compuesto de grado analítico. Una vez obtenida la muestra se filtró mediante filtro de jeringa de 0,23  $\mu\text{m}$  y se envasó en viales para su análisis por medio de la metodología descrita en la sección 3.6 del presente trabajo.

*Tabla D1:* Datos calibración de xilosa.

Tiempo de retención: 5,077 min

Área	Concentración (g/l)
0	0
1,8142	1
3,2412	2
4,2189	3
6,8926	5
10,213	7

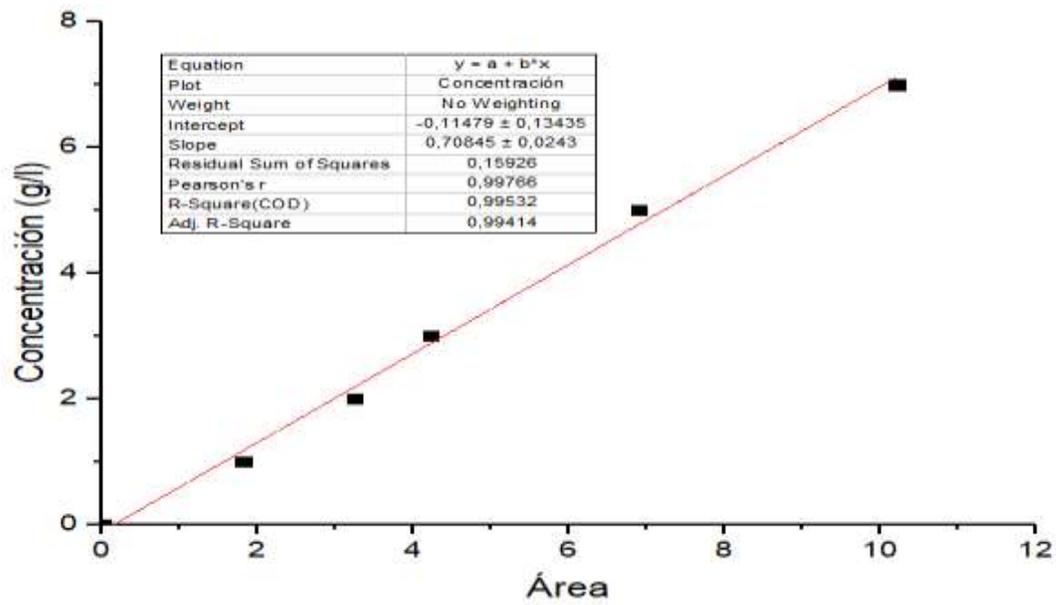


Figura D1: Curva calibración de xilosa

Tabla D2: Datos calibración de arabinosa.

Tiempo de retención: 5,58 min

Área	Concentración (g/l)
0	0
3,946	2
7,0969	3
11,0361	5
16,4296	7
21,5676	10

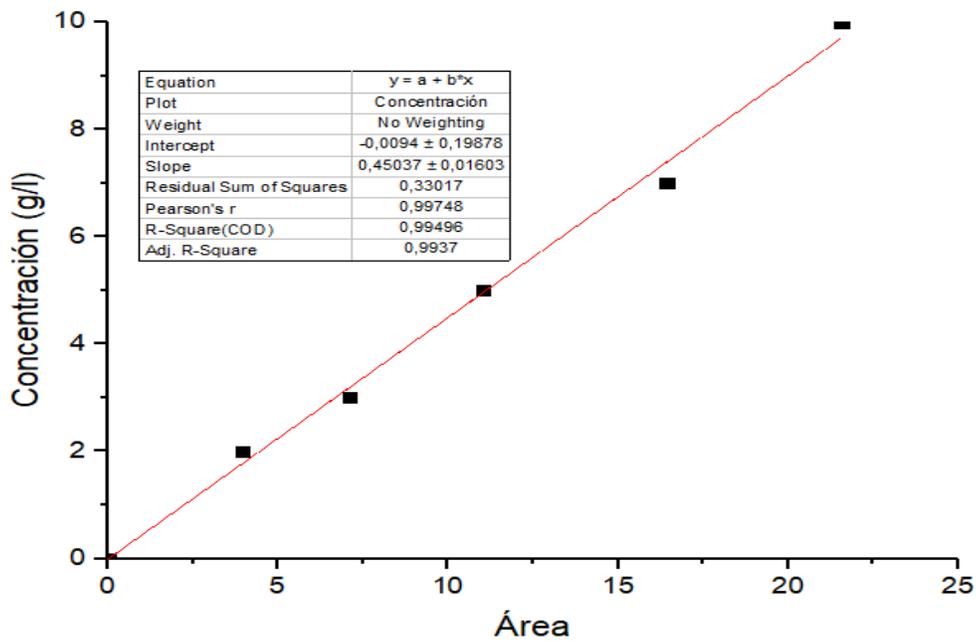


Figura D2: Curva calibración de arabinosa

Tabla D3: Datos calibración de furfural.

Tiempo de retención: 2,378 min

Área	Concentración (ppm)
2,155	5
4,8872	10
10,0799	15
17,4071	20
26,1323	30
46,1758	50

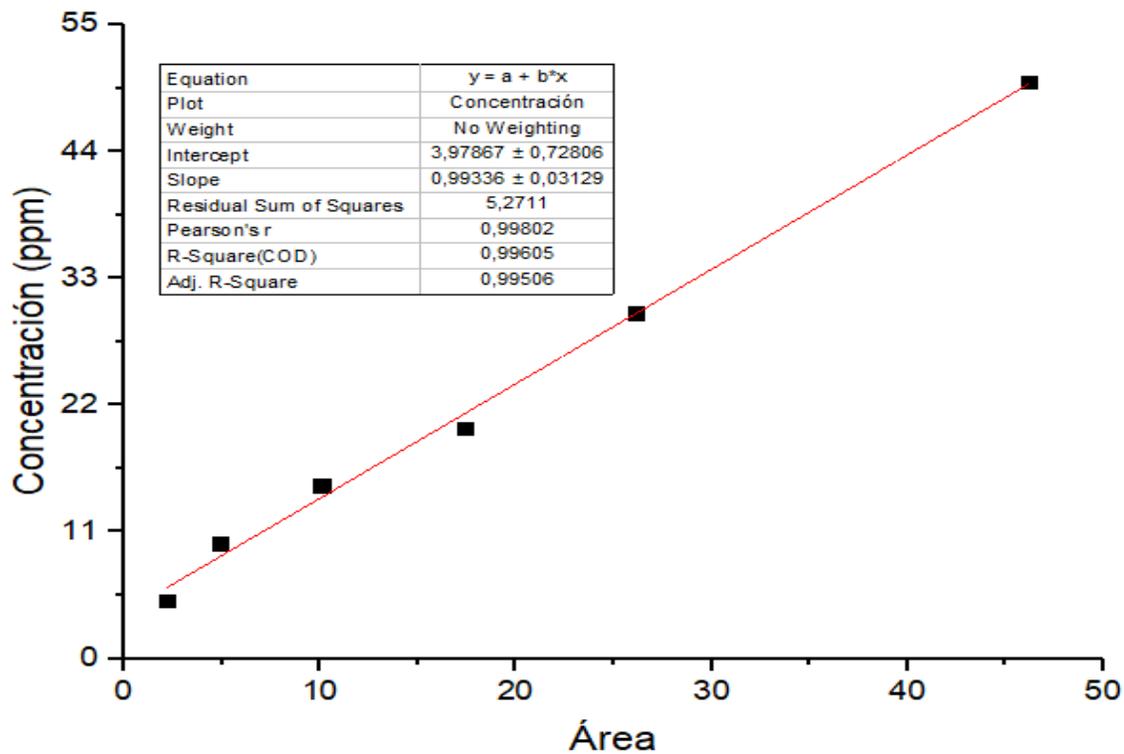


Figura D3: Curva calibración de furfural

**Línea de calibración GPC IR.** Cada experimento de calibración se llevó por duplicado en tubos de ensayo usando agua desionizada y el respectivo compuesto de grado analítico. Una vez obtenida la muestra se filtró mediante filtro de jeringa de  $0,23 \mu\text{m}$  y se envasó en viales para su análisis por medio de la metodología descrita en la sección 3.6 del presente trabajo.



Tabla D4: Datos calibración GPC detector IR.

Compuesto	Peso [g/mol]	Tiempo de Retención
Xilosa	150.13	13.211667
Glucosa	180.1559	13.128333
Celobiosa	342.29650	12.855000
Dextrano 6	6,000.00	10.600000
Dextrano 20	20,000.00	9.685000
Dextrano 40	40,000.00	8.678333
Xilano	329.201562	12.708333

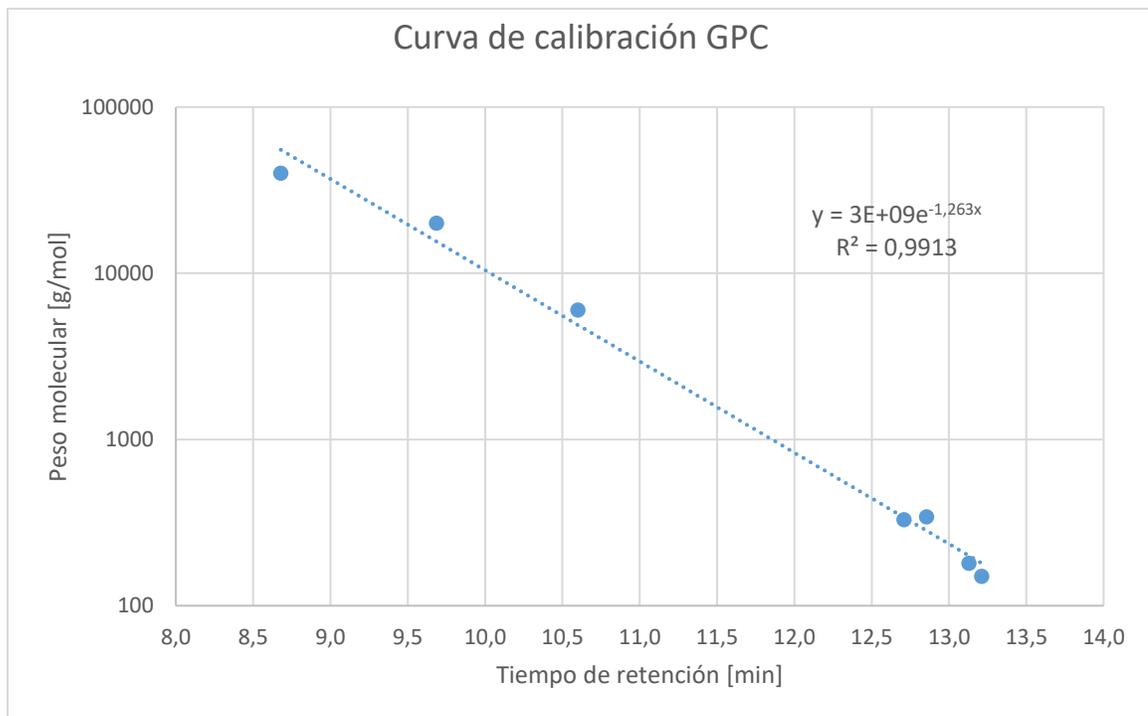


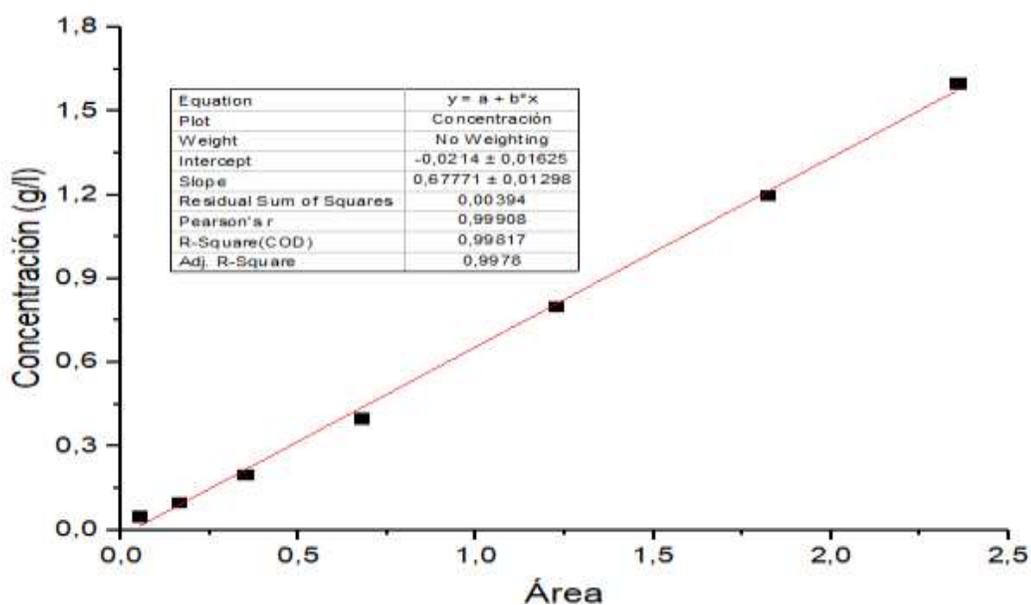
Figura D4: Curva calibración GPC detector IR.



**Curva de calibración para la cuantificación de compuestos fenólicos totales.** El proceso de realización de la siguiente curva de calibrado será descrito en el Apéndice E

*Tabla D5:* Datos calibración polifenoles totales usando un patrón de ácido gálico

Área	Concentración (g/l)
0,0515	0,05
0,1625	0,1
0,349	0,2
0,6765	0,4
1,2245	0,8
1,82075	1,2



*Figura D5:* Curva calibración polifenoles totales usando un patrón de ácido gálico



### Apéndice E: Cuantificación de Polifenoles Totales Usando el Reactivo de Folin-Ciocalteu

Este método cuantitativo se utiliza para medir la cantidad de compuestos fenólicos presentes en los hidrolizados de biomasa. Su fundamento se basa en que los mismos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu a pH básico, permitiendo una coloración azul detectable por espectrofotometría a 765 nm. El reactivo se compone principalmente de una mezcla de wolframato de sodio y molibdato de sodio en ácido fosfórico. El ácido fosfomolibdotúngstico, formado por las sales presentes en medio ácido; el cual es de color amarillo se reduce por los grupos fenoles dando lugar a un complejo azul intenso. El mecanismo de reacción redox que genera el complejo azulado también puede ser considerado como una medida de la actividad antioxidante total (García, Fernández, & Fuentes, 2015).

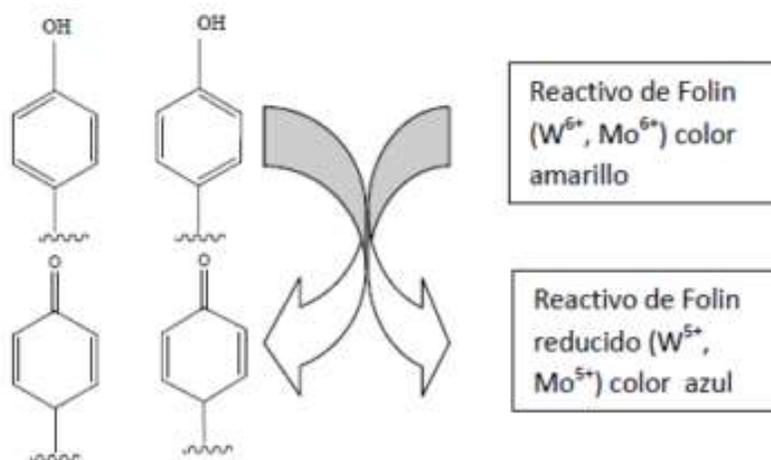


Figura E1: Mecanismo de reacción del reactivo Folin-Ciocalteu. Tomado de (García et al., 2015)



Procedimiento (Facilitado por el Grupo de investigación CICTA)

1. Preparar una solución patrón de ácido gálico [2 mg/ml] en un balón de 50 ml.
2. A partir de la solución patrón, preparar disoluciones entre 0,2 y 1,8 mg/ml en tubos de ensayo de 5 ml. Cada punto de la curva se debe realizar por duplicado.
3. En tubos de ensayo de 5 ml, protegidos de la luz, adicionar 50  $\mu$ l de la solución patrón o del extracto fenólico. El blanco consiste en reemplazar el patrón y/o la muestra por 50  $\mu$ l de agua destilada.
4. Adicionar 1,5 ml de la solución de Folin-Ciocalteu a los tubos de ensayo que contienen las sustancias a analizar (blanco, estándar y muestras). Tapar y agitar 10 s en agitador vortex.
5. Dejar transcurrir 5 min, y adicionar después de ese tiempo añadir a todos los tubos 1,5 ml de solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5% p/v, tapar y agitar en vortex por 10 s. Se deben registrar los tiempos de adición del reactivo de Folin-Ciocalteu y del carbonato para cada muestra.
6. Almacenar durante 1 hora los tubos en condiciones de oscuridad.
7. Leer la absorbancia de cada sustancia bajo estudio (muestras, patrón y blanco) en un espectrofotómetro a 765 nm. Ajustar el cero de absorbancia con el blanco.
8. Con la ecuación de calibración presente en el Apéndice C, se reemplaza el valor de la absorbancia y se termina la concentración de polifenoles totales, equivalente a la concentración de ácido gálico.

#### **Apéndice F: Resumen de los Resultados Obtenidos en el Presente Trabajo**



El presente Apéndice muestra los resultados obtenidos para la evaluación de cada metodología de purificación llevada a cabo en el presente trabajo, donde C: concentración, RP: recuperación, RM: remoción y R: relación hidrolizado-resina v/v. Los porcentajes de recuperación y eliminación tabulados corresponden a los tiempos cero de cada experimento según lo definido en la metodología. Por otra parte, los porcentajes de remoción menores a cero para las relaciones 1:1 y 1:0,2 v/v hidrolizado-resina, en el tratamiento con resinas catiónicas fuertes se han tomado como una remoción del 0 % p/p.

*Tabla F1:* Resultados adsorción sólido-líquido usando carbón activado

Relación carbón activado- licor (g CA/l)	C XO <sub>s</sub> (g/l)	% RP de XO <sub>s</sub> (% p/p)	C de furfural (ppm)	% RM de furfural (% p/p)	C de polifenoles totales (g/l)	% RM de polifenoles totales (% p/p)
5	13,4±1,9	100,7±4,3	24,4±0,8	56,4±2,3	0,66±0,08	46,3±6,5
10	12,4±1,0	96,1±9,3	9,9±0,4	82,2±0,5	0,39±0,02	68,4±1,9
15	12,4±0,7	94,3±0,3	6,2±0,1	89,0±0,03	0,26±0,01	78,9±1,1
20	11,3±0,8	91,2±1,1	4,8±0,03	91,4±0,2	0,14±0,01	88,3±0,4
25	11,0±0,2	89,1±3,8	4,4±0,06	92,1±0,3	0,12±0,02	90,0±1,4

*Tabla F2:* Resultados precipitación química utilizando diferentes no solventes

No solvente utilizado	C XO <sub>s</sub> (g/l)	% RP de XO <sub>s</sub> (% p/p)	C de furfural (ppm)	% RM de furfural (% p/p)	C de polifenoles totales (g/l)	% RM de polifenoles totales (% p/p)
Etanol	5,0±0,1	40,3±1,8	0,0±0,0	100,0±0,0	0,06±0,00	95,6±0,00
Acetona	6,9±0,0 1	55,5±1,1	0,0±0,0	100,0±0,0	0,04±0,00	97,0±0,00
2-propanol	7,6±0,1	61,1±2,4	0,0±0,0	100,0±0,0	0,06±0,00	94,7±0,00

*Tabla F3:* Resultados tratamiento con resinas catiónicas fuertes en operación batch



Condiciones	C XO <sub>s</sub> (g/l)	% RP de XO <sub>s</sub> (% p/p)	C de furfural (ppm)	% RM de furfural (% p/p)	C de polifenoles totales (g/l)	% RM de polifenoles totales (% p/p)
R 1:1 5 min	12,1±0,3	97,4±2,8	131,1±45,4	0,0±0,0	1,3±0,01	0,0±0,0
R 1:1 10 min	11,4±1,0	91,8±8,0	122,3±43,0	0,0±0,0	1,1±0,02	10,0±2,2
R 1:1 20 min	10,7±1,2	86,7±9,4	120,4±22,2	0,0±0,0	1,0±0,01	18,7±2,3
R 1:0,2 5 min	10,9±2,7	87,8±21, 8	102,1±34,4	0,0±0,0	1,6±0,06	0,0±0,0
R 1:0,2 10 min	11,6±0,4	93,4±3,4	99,6±42,5	0,0±0,0	1,4±0,01	0,0±0,0
R 1:0,2 20 min	12,4±0,8	99,5±6,5	111,3±26,0	0,0±0,0	0,93±0,01	23,3±0,45
R 1:0,1 5 min	9,3±0,1	75,1±0,8	40,3±1,7	28,1±3,1	0,75±0,05	37,8±4,0
R 1:0,1 10 min	12,2±0,1	98,1±0,6	36,8±1,7	34,3±3,0	0,68±0,05	43,4±4,3
R 1:0,1 20 min	12,3±0,2	99,2±1,3	33,4±0,7	40,3±1,2	0,60±0,04	50,5±3,3

Tabla F4: Resultados tratamiento con resinas aniónicas fuertes en operación batch

Condiciones	C XO <sub>s</sub> (g/l)	% RP de XO <sub>s</sub> (% p/p)	C de furfural (ppm)	% RM de furfural (% p/p)	C de polifenoles totales (g/l)	% RM de polifenoles totales (% p/p)
R 1:1 5 min	7,8±0,8	63,0±6,0	6,0±0,4	89,3±0,7	0,14±0,01	81,5±2,0
R 1:1 10 min	8,5±0,2	68,7±1,7	0,0±0,0	100±0,0	0,14±0,00	81,5±0,2
R 1:1 20 min	7,2±0,8	58,2±6,4	0,0±0,0	100±0,0	0,14±0,00	81,7±0,2
R 1:0,2 5 min	8,2±0,8	66,4±6,8	19,1±5,3	65,8±9,4	0,3±0,01	57,1±1,1
R 1:0,2 10 min	8,5±1,1	68,8±8,8	8,9±2,4	68,2±4,2	0,3±0,02	61,0±2,9
R 1:0,2 20 min	8,4±0,4	67,6±7,8	5,4±0,2	71,3±0,36	0,22±0,01	71,2±1,4
R 1:0,1 5 min	10,4±0,3	84,1±2,1	23,6±5,1	57,8±9,1	0,42±0,01	37,8±4,0



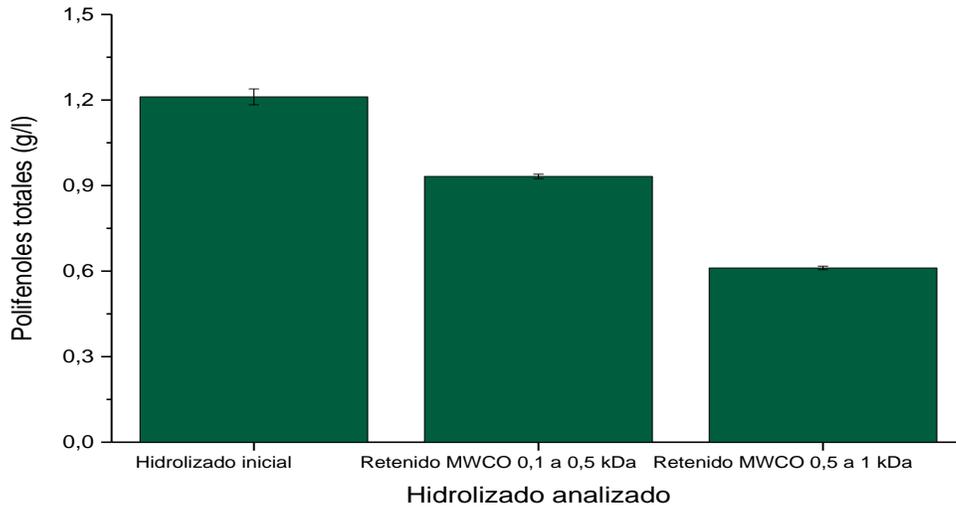
R 1:0,1 10 min	10,6±0,1	85,4±0,5	20,4±3,1	63,6±5,5	0,34±0,1	43,4±4,3
R 1:0,1 20 min	10,7±0,4	86,7±3,2	19±0,43	66,0±0,8	0,32±0,1	50,5±3,3

Tabla F5: Resultados ruta de purificación

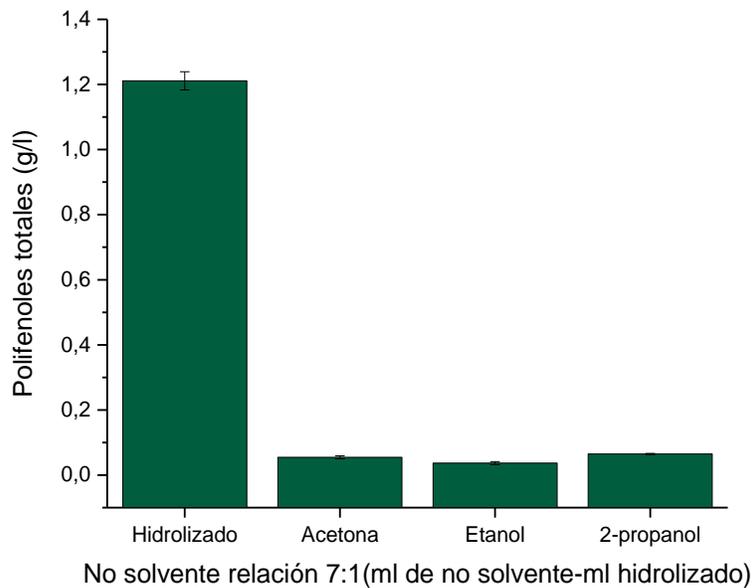
Etapa de purificación	C XO <sub>s</sub> (g/l)	% RP de XO <sub>s</sub> (% p/p)	C de furfural (ppm)	% RM de furfural (% p/p)	C de polifenoles totales (g/l)	% RM de polifenoles totales (% p/p)
CA	10,6±0,1	85,8±1,8	5,2±0,1	90,7±0,2	0,18±0,00	84,8±0,2
RC	10,7±0,2	86,5±0,8	4,4±0,0	92,2±0,0	0,08±0,02	92,6±1,5
RA	9,9±0,4	79,9±3,2	4,2±0,1	92,6±0,01	0,01±0,00	98,8±0,2



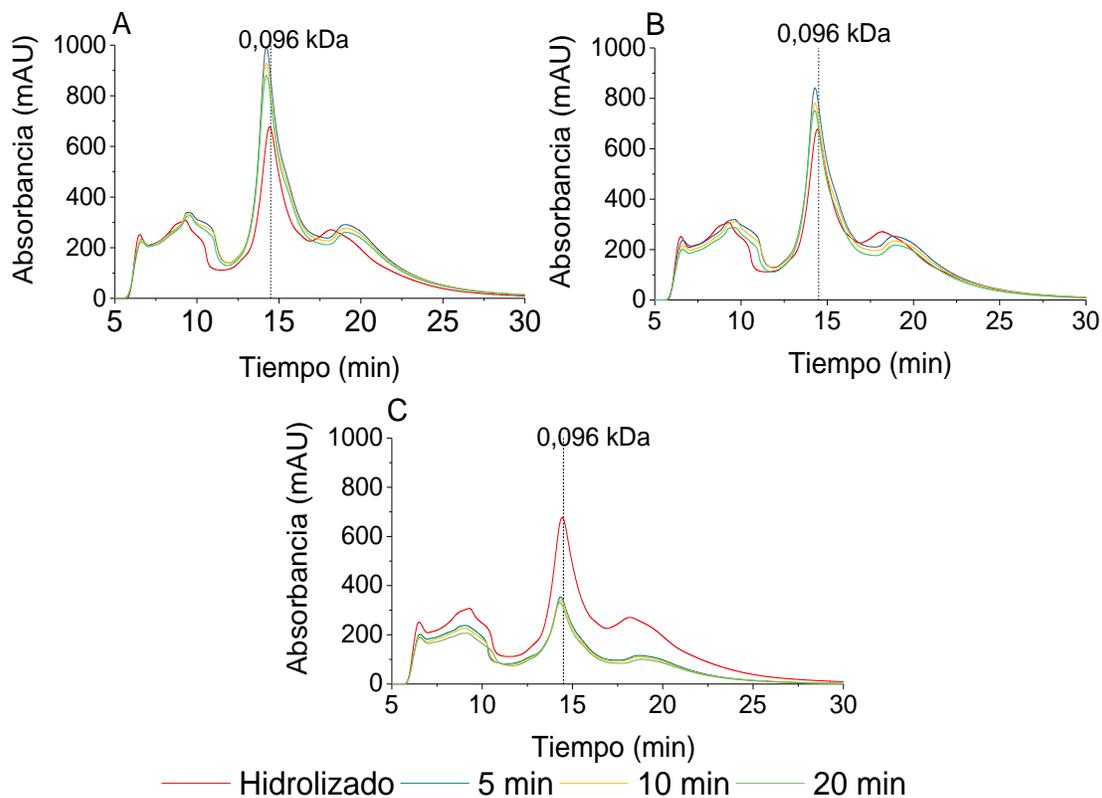
**Apéndice G: Resultados Complementarios en la Evaluación de Metodologías de Purificación**



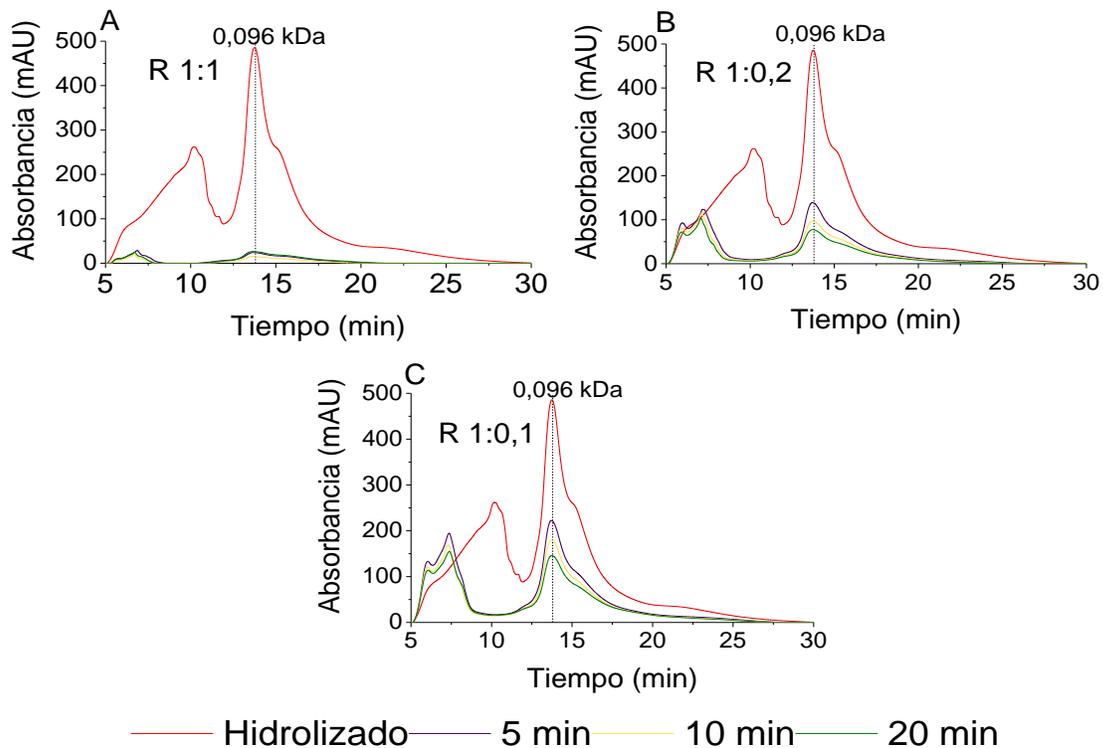
*Figura G1:* Efecto del uso de membranas dialíticas con diferente MWCO 0,1 a 0,5 kDa y 0,5 a 1 kDa sobre la concentración de compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado retenido una vez estabilizada la conductividad del medio dializante.



*Figura G2:* Efecto de la precipitación química con distintos no solventes a relación 7:1 v/v no solvente-hidrolizado, sobre la concentración de compuestos fenólicos totales presentes en el precipitado re-diluido obtenido en operación batch durante 24 h bajo agitación a temperatura ambiente.



*Figura G3:* Cromatogramas GPC. Efecto de la relación hidrolizado-resina catiónica (A: 1:1, B: 1:0,2 y C: 1:0,1 v/v) y el tiempo de contacto, sobre distribución de peso molecular (Detector UV 280 nm), posterior a la operación batch con resina catiónica fuerte bajo agitación constante a temperatura ambiente.



*Figura G4:* Cromatogramas GPC. Efecto de la relación hidrolizado-resina aniónica (A: 1:1, B: 1:0,2 y C: 1:0,1 v/v) y el tiempo de contacto, sobre distribución de peso molecular (Detector UV 280 nm), posterior a la operación batch con resina aniónica fuerte bajo agitación constante a temperatura ambiente.

Apéndice H: Registro Fotográfico



Figura H1: Montaje experimental adsorción sólido-líquido usando carbón activado.



Figura H2: Montaje experimental selectividad por peso molecular mediante el uso de membranas de diálisis.



Figura H3: Montaje experimental precipitación química usando diferentes no solventes



Figura H4: Montaje experimental tratamiento con resina catiónica fuerte en operación batch



*Figura H5:* Montaje experimental tratamiento con resina aniónica fuerte en operación batch