



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO PARA LA CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LIGNINAS

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

JUAN JOSÉ JUÁREZ FRANCISCO



Ciudad Universitaria, CD.MX.

AÑO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos.

- ❖ Se agradece el apoyo en la realización de esta tesis a los proyectos PAPIIT:
 - **IG100815** Producción de materiales con alto valor agregado a partir de residuos y subproductos de procesos de producción de bioetanol de segunda generación
 - **IG100718/IG110718** Procesos de biorefinación a partir de un proceso de deconstrucción ácida en fase gas de materiales lignocelulósicos

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MARÍA DE LOS ÁNGELES VALDIVIA LÓPEZ

VOCAL: Profesor: BERTHA JULIETA SANDOVAL GUILLÉN

SECRETARIO: Profesor: INÉS MIRANDA MARTINEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: JORGE ABURTO ANELL

2° SUPLENTE: Profesor: BRENDA SÁNCHEZ SALAZAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

MARÍA DE LOS ÁNGELES VALDIVIA LÓPEZ

SUSTENTANTE:

JUAN JOSÉ JUÁREZ FRANCISCO

Índice.

Introducción.....	5
Antecedentes	7
Fuentes de compuestos de lignina. Estructura y características.....	7
Usos industriales de la lignina.....	11
Procesos para la obtención de compuestos de lignina	15
Lignina de Kraft.....	15
Lignosulfonato.....	17
Lignina de soda y Lignina Organosolv.....	18
Lignina de hidrólisis enzimática y Lignina de hidrólisis ácida.....	20
Lignina líquida iónica.....	21
Objetivo general.....	23
Metodología.....	23
Digestión por autoclave.....	24
Cuantificación por espectrofotometría UV mediante acetilación (ABL).....	25
Método combinado de Fibra-Klason.....	28
Balance de cenizas.....	32
Resultados y Discusión.....	34
Elección del método de trabajo.....	34
Método espectrofotométrico de Acetilación (ABL).....	34
Método para la obtención de la Lignina de Klason.....	35
Digestión por autoclave ácido.....	35
Tratamiento enzimático-ácido.....	36
Método combinado de Fibra-Klason.....	37

Cuantificación de los materiales lignocelulósicos.....	40
Balance de cenizas de los procesos.....	43
Conclusiones.....	45
Bibliografía.....	47
Anexo 1.....	50

Introducción.

Las ligninas son copolímeros que se derivan principalmente de tres unidades fenilpropano-monoméricas (monolignoles) básicas: alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (Gellerstedt y Henrinksson, 2008). Los monolignoles son dirigidos a diferentes tipos de regiones de la pared celular, en donde polimerizan formando biopolímeros con propiedades biofísicas específicas, las cuales en conjunto refuerzan la pared celular. Los porcentajes de distribución de los principales monolignoles dependen del tipo de planta. El monolignol más abundante en las maderas blandas es el alcohol coniferílico, que puede llegar a superar el 95% del total de monolignoles presentes; mientras que en las maderas duras coexisten fundamentalmente los alcoholes coniferílico y sinapílico. En el caso de plantas del tipo herbáceas, puede haber proporciones similares de los tres monolignoles principales. Estos compuestos del tipo monolignoles son interesantes reactivos de partida para la producción de compuestos aromáticos de alto valor añadido en la industria petroquímica, la cual utiliza comúnmente recursos fósiles como materias primas. Debido a la disminución de las reservas de petróleo, el aprovechamiento de las fuentes alternativas de energía y productos químicos es de gran interés, en este sentido, la biomasa se presenta como una de las soluciones asequibles para reducir en cierta medida la dependencia al petróleo. Del mismo modo, la lignina es de un gran interés para la industria ya que puede servir como precursor de distintos compuestos con alto valor agregado para diferentes industrias, algunos ejemplos son: los aditivos, pesticidas, pinturas, acrílicos, entre otros. El poder aprovechar este subproducto con alto valor agregado permitiría tener una fuente renovable utilizable como precursor de otras industrias, en vez de recurrir a precursores químicos no renovables.

Los monómeros de la lignina se enlazan de distinta forma lo que provoca que los tipos y número de enlaces que forman entre ellos, así como el arreglo espacial final no sea igual en todas las fuentes y tampoco dentro de la misma estructura o red polimérica.

Se pueden tener estructuras lineales más sencillas que permiten la degradación del polímero por métodos sencillos de hidrólisis del polímero, pero también dentro de la misma estructura se pueden encontrar partes con ramificaciones muy cerradas que impiden el ataque de los reactantes en su interior. Lo anterior representa, una barrera bastante importante para el aprovechamiento y degradación de esta región estructural, debido a esto, es necesario recurrir a métodos más agresivos de hidrólisis para lograr su fragmentación y alcanzar su posterior aprovechamiento.

Para su cuantificación la lignina puede ser aislada del material lignocelulósico mediante una variedad de métodos que implican diferentes procesos mecánicos y/o químicos. Estos métodos se pueden agrupar en dos vías principales. El primer grupo incluye métodos en los que se libera la celulosa y hemicelulosa mediante solubilización, dejando la lignina como residuo insoluble; mientras que el segundo grupo incluye métodos que implican la disolución de la lignina, dejando como residuos insolubles la celulosa y la hemicelulosa, seguido de la recuperación de lignina a partir de la fase líquida.

Debido a la naturaleza heterogénea de las materias primas (madera y pulpa), no hay ningún método disponible actualmente para el aislamiento cuantitativo de lignina natural o residual, sin el riesgo de modificarla estructuralmente durante el proceso. Del mismo modo la cuantificación directa de la lignina en los materiales lignocelulósicos se ve dificultada. Sin embargo, la información obtenida sobre la cantidad, reactividad química y la estructura de la lignina es valiosa (Bauer et al, 2012) para conocer las propiedades y funcionalidad de esta macromolécula

Asentado lo anterior, el interés de este trabajo fue la obtención de un método confiable que permita la cuantificación de la lignina presente en materiales lignocelulósicos.

1 Antecedentes

1.1 Fuentes de compuestos de lignina. Estructura y características

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas y junto con la celulosa y la hemicelulosa conforma la pared celular de las mismas en una disposición regulada a nivel nano-estructural, dando como resultado redes de lignina-carbohidratos. La composición o distribución de los tres componentes en esas redes varía dependiendo del tipo de planta. En el caso de la composición de la madera, los intervalos comúnmente encontrados son: Celulosa: 38-50%; Hemicelulosa: 23-32% y Lignina: 15-25%.

Estas estructuras forman paredes lignocelulósicas de mayor complejidad y difícil accesibilidad a algunos componentes, así mismo están constituidas por un entramado de micro fibrillas de celulosa formando capas recubiertas de hemicelulosas y sobre la que esta entrelazada la lignina (Figura 1).

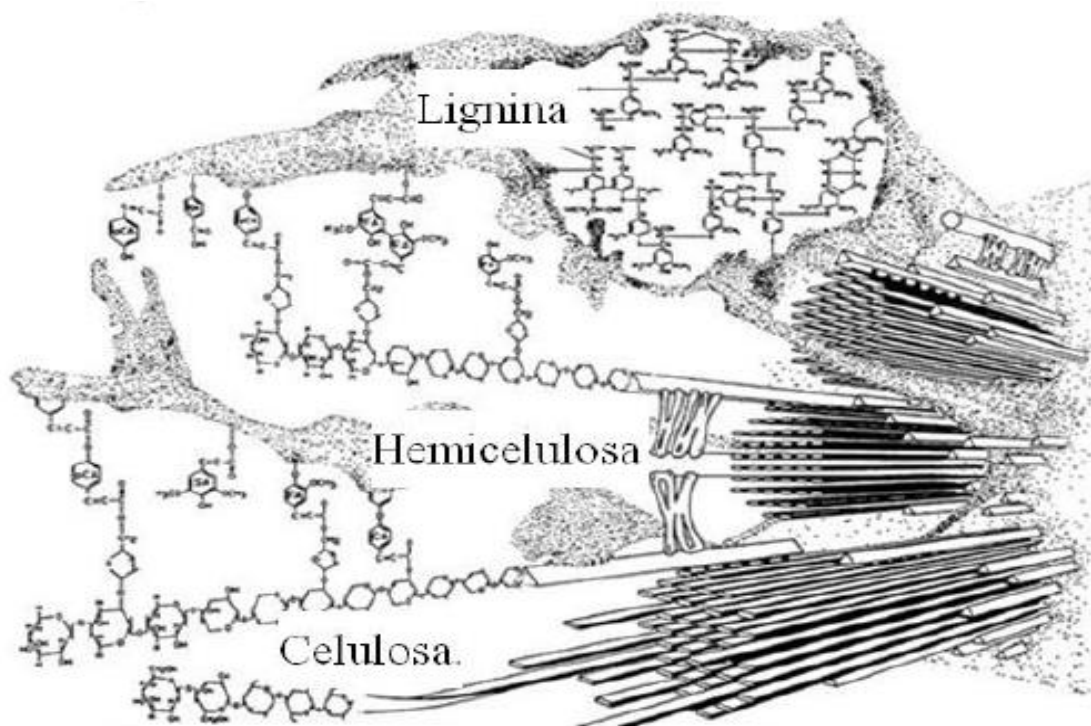
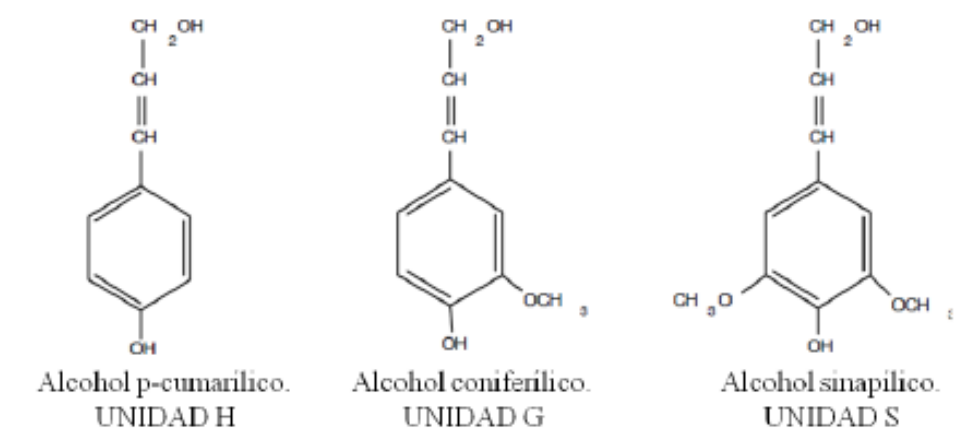


Figura1. Pared lignocelulósica con los tres principales componentes: celulosa, hemicelulosa y lignina. (Bidlack et al, 1992)

Las ligninas tienen como unidades monoméricas las siguientes moléculas fenilpropanoides (figura 2); las cuáles son resistentes a la hidrólisis ácida, fácilmente oxidables, solubles en bisulfito o álcalis caliente, y fácilmente condensables con fenoles o tioles; cuando se hacen reaccionar con nitrobenzeno en una solución alcalina caliente, las ligninas producen principalmente vainillina, siringaldehído y p-hidroxibenzaldehído en función del origen de las ligninas; cuando se colocan a ebullición en una solución etanólica de ácido clorhídrico, las ligninas forman monómeros del tipo "cetonas de Hibbert" (Chávez-Sifontes y Domine, 2013).



**Figura 2. Monolignanos más comunes en la formación de la lignina.
(Barroso, 2010)**

La síntesis de la lignina es un proceso de polimerización cuyos precursores son los alcoholes p-hidroxicinamílicos, cuya diferencia entre ellos radica en los sustituyentes del anillo aromático (Figura 2), ya que los alcoholes coniferílico (unidad G) y sinapílico (unidad S) tienen sustituyentes de metoxilo en las posiciones 3 y 3,5 respectivamente, mientras que el alcohol cumarílico (unidad H) no presenta sustituyentes. La polimerización ocurre mediante una etapa enzimática donde los alcoholes se oxidan por la acción de peroxidasas de la pared celular dando radicales fenoxido.

La variedad de enlaces que se pueden formar y la estructura espacial resultante del polímero de la lignina son debidas a la diversidad de reacciones de acoplamiento entre las distintas formas resonantes de los radicales fenoxido. Los tipos de enlace

que se forman son principalmente éter β -o-4 y en menor cantidad alfa o gama. (Figura 3)

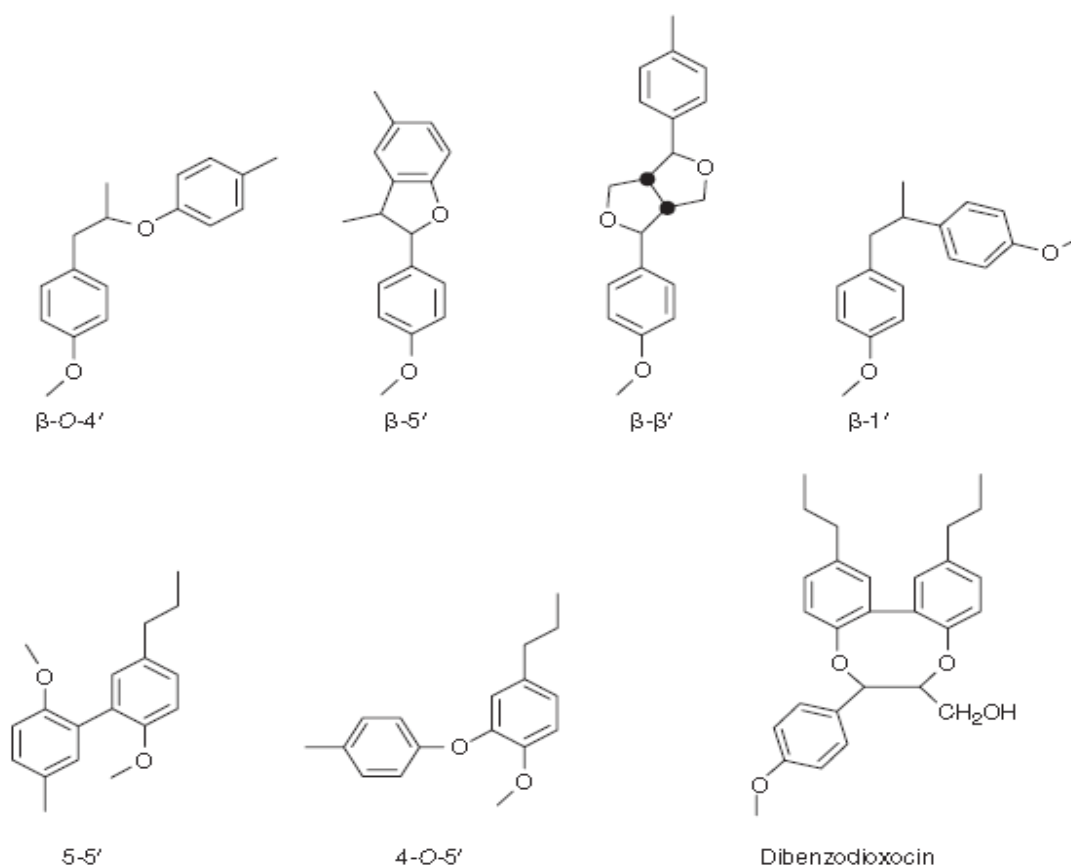


Figura 3. Tipos de enlaces que se forman debido a la resonancia de los radicales fenoxido. (Gellerstedt y Henrinksson, 2008)

Los monómeros de lignina se unen covalentemente a hemicelulosas y proveen de fuerza y rigidez a la pared celular de la planta, y al sistema vascular le confieren la hidrofobicidad necesaria para el transporte de agua y solutos; la lignina puede clasificarse en condensada y no condensada con base en el tipo de enlace que se establece entre los monolignoles y entre éstos y otros componentes de la pared celular (Tabla 1).

Tabla 1. Características de la lignina condensada y no condensada. (Lagunes y Zavaleta, 2016)

Características	Condensada	No condensada
Tipo de enlace entre monolignoles	Enlaces C-C (β -5, β -1, 5-5, y β - β)	Enlaces aril-alquil (β -O-4 y 4-O-5)
Unidad de monolignoles	H y G	S
Estructura de la lignina	Ramificada	Lineal
Polimerización	Mayor polimerización	Menor polimerización
Degradabilidad	Más resistentes a la degradación recalcitrante	Fácil degradación

Los porcentajes de distribución de los principales monolignoles dependen del tipo de planta, el más abundante en las maderas blandas es el alcohol coniferílico, que puede llegar a superar el 95% del total de monolignoles presentes; mientras que en las maderas duras coexisten fundamentalmente los alcoholes coniferílico y sinapílico. En el caso de plantas del tipo herbáceas, puede haber proporciones similares de los tres monolignoles principales (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de distribución de los principales monolignoles en función del tipo de planta. (Gellerstedt y Henrinksson, 2008)

Tipo de planta		Porcentajes de alcoholes		
		<i>p</i> -cumarílico	coniferílico	sinapilico
Gimnospermas	Coníferas (maderas suaves)	<5	>95	0
Angiospermas	Eucotiledoneas (maderas duras)	0-8	35-50	45-75
	Monocotiledoneas (hierbas)	5-35	35-80	20-55

Para el caso del agave en estudios realizados se ha observado que tiene de un 15-20% de lignina, esto se muestra en la Tabla 3, en la cual se muestra la composición química de la fracción de fibra de diferentes especies de agave.

Tabla 3. Composición química de las fibras obtenidas de agave. (Balam et al, 2006)

	Composición en porcentaje				
Fuente de fibras	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Extraíbles	Referencia
<i>Agave tequilana</i> (hojas)	64.8	5.1	15.9	14.0	Iñiguez et al, 2001
<i>Agave tequilana</i> (tronco)	64.9	5.5	16.8	12.5	
<i>Agave fourcroydes</i> (henequén)	77.6	5.7	13.1	3.6	Antonio et al, 2002
<i>Agave lechuguilla</i>	79.8	3-6	15.3	2-4	Bledzki y Gassan, 1999
<i>Agave sisilana</i>	73.1	13.3	11.0	2.6	

En la actualidad, las fuentes de obtención de materiales lignocelulósicos son en mayor parte de recursos principalmente maderas y plantas de distintos géneros, así como tallos y bagazos resultantes de las diversas empresas agroindustriales en forma de subproductos de desecho, tales como bagazos de caña de azúcar, agave, bambú, trigo, olote de maíz, entre otras.

1.2 Usos industriales de la lignina.

La producción de lignina en el mundo llega a unos 50 millones de toneladas de sólido por año procedente de los diferentes procesos de pulpeo, esta producción no tiene en cuenta ligninas derivadas de otros procesos de aprovechamiento de la biomasa (El Mansouri, 2009). Dentro de las ligninas, el lignosulfonato se encuentra en grandes cantidades a nivel comercial (hasta 1.000.000 de toneladas de sólido por año), y la Lignina de Kraft está disponible comercialmente en cantidades moderadas de hasta 100.000 toneladas de sólido al año (Chávez-Sifontes y Domine, 2013). Un método para reducir gastos energéticos es la quema de Lignina de Kraft en hornos para producir energía necesaria para el proceso, y recuperar parcialmente energía en forma calorífica que se reutilizará posteriormente en el

proceso. Hoy en día los lignosulfonatos se consideran como los más demandados a nivel mundial (Tabla 4).

Tabla 4. Principales productores mundiales de lignosulfatos en el mundo. (El Mansouri, 2009)

Productores	País de producción	Capacidad anual (toneladas/año)
Borregaard Ligno tech	Noruega	160.000
Ligno Tech Sweden	Suecia	60.000
Borregaard Germany	Alemania	50.000
Ligno Tech España	España	30.000
Ligno Tech Finlandia	Finlandia	20.000
Ligno Tech USA	Estados Unidos	60.000
Georgia Pasicific	Estados Unidos	200.000
Westvaco	Estados Unidos	35.000
Flambeau paper	Estados Unidos	60.000
Tembec	Canadá	20.000
Avebene	Francia	40.000
Tolmezzo	Italia	30.000
Sanyo Kokusaka	Japón	50.000
Otros		150.000
		975.000

La lignina sulfonada puede precipitarse en forma de sulfonatos de lignina y utilizarse como productos tánicos, adhesivos, aglutinantes, dispersantes, emulsificantes y secuestradores de metales pesados, entre otros. Los sacáridos contenidos en el licor de sulfito agotado se fermentan con levadura para producir alcohol etílico y suplementos de forrajes y piensos.

También la lignina sin tratamiento de modificación química puede ser utilizada para incorporarse en resinas tipo fenol-formaldehído, polímeros tipo poliolefinas-lignina, poliésteres-lignina, poliuretanos-lignina, entre otros. Así también, la lignina puede modificarse químicamente (por ejemplo, fenolización, metilación, etc.) y formar parte en formulaciones para mejorar las propiedades de desempeño de resinas o

adhesivo. La hidrólisis y la oxidación de la lignina a altas presiones y temperaturas producen compuestos de bajo peso molecular, estos compuestos representan una variedad de productos químicos de alto valor añadido; siendo los más importantes un grupo de compuestos fenólicos, entre los que destacan: vainillina, cresoles, catecoles, guayacol, etc. (Holladay et al, 2007).

La lignina de álcali obtenida del sulfato o del licor negro Kraft se precipita y utiliza como diluyente de resinas, para refuerzo en la fabricación del caucho y la estabilización de emulsiones (Barroso, 2010). Entre los productos volátiles obtenidos del licor negro Kraft figuran el dimetil sulfuro, dimetil sulfóxido y dimetil sulfona, que son útiles como disolventes y reactivos químicos (Gellerstedt y Henrinksson, 2008).

Otra posible aplicación de la lignina es como un precursor para la producción de carbón activado. De hecho, como la lignina tiene un alto contenido de carbono y una estructura molecular similar al carbón bituminoso podría ser un precursor ideal. Hay diferentes usos posibles para la lignina como precursora de diferentes compuestos de interés tanto comercial como interés industrial y de investigación (como se muestra en la Figura 4), sin embargo, los métodos desarrollados aun no son lo suficientemente rentables a nivel industrial debido a las limitaciones técnicas que presentan los mismos (Chávez-Sifontes y Domine, 2013).

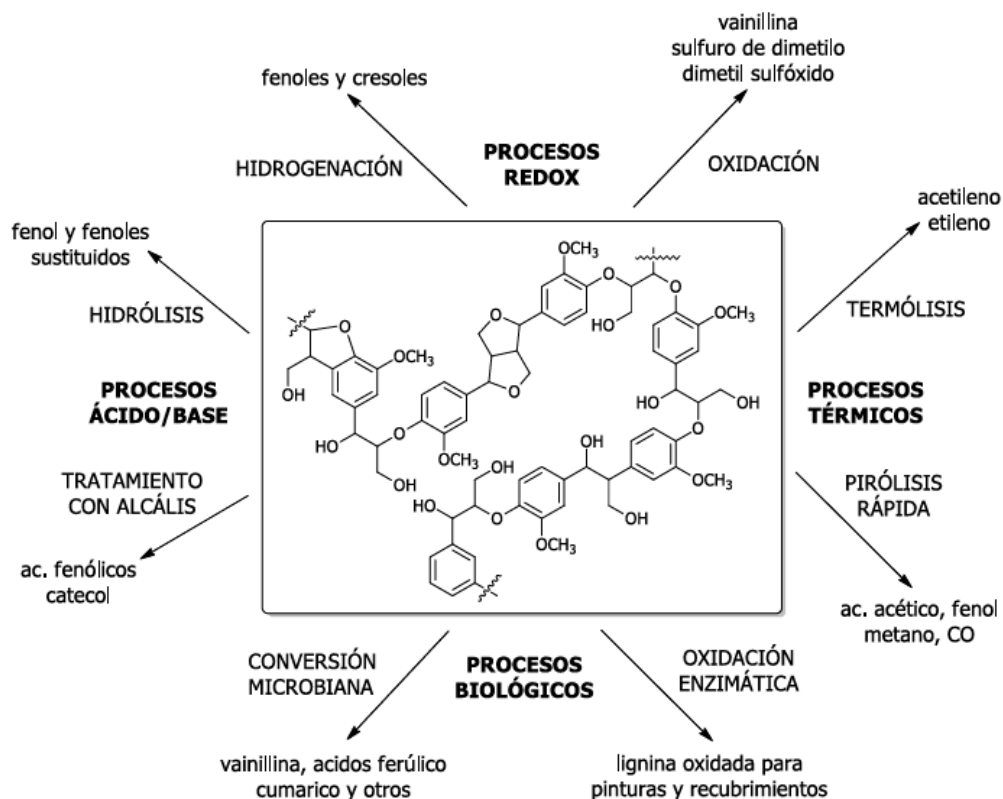


Figura 4. Algunos ejemplos de procesos que se aplican a la lignina y su producto. (Holladay et al, 2007)

La lignina también representa una fuente renovable y potencialmente valiosa para la obtención de compuestos químicos fundamentalmente de tipo aromáticos.

Los anillos aromáticos pueden ser oxidados a radicales fenoxido por enzimas que utilizan oxígeno (O_2) como cofactor, así mismo destacan también las reacciones de oxidación de alcoholes aromáticos para producir aldehídos, en las cuales se genera de manera simultánea peróxido de hidrógeno durante el proceso. Estas reacciones son catalizadas por enzimas aril-alcohol-oxidadas (AAO) en combinación con alcoholes aromáticos (por ej. alcohol anisílico o alcohol veratrílico) que actúan como cofactores (Hataka, 2004).

También se busca una forma de tener una degradación microbiana de la lignina para así poder usar materiales lignocelulósicos directamente para la obtención de biocombustibles y productos químicos renovables, sin embargo, aun esto está en desarrollo para poder ser llevado a una etapa de carácter industrial.

1.3 Procesos para la obtención de compuestos de lignina

Las propiedades de producción y químicas de las ligninas industriales están estrechamente relacionadas con la técnica de separación en cuestión.

1.3.1 Lignina de Kraft.

El proceso predominante empleado en fábricas de papel se llama reducción a pasta Kraft, el cual constituye aproximadamente el 85% de la producción mundial total de lignina. Las plantas de pulpa de celulosa Kraft se han convertido en instalaciones de alta ingeniería con un sistema integrado para la recuperación de los productos presentes en la pasta química y de la energía, basado en la combustión del licor de fabricación de pasta (licor negro) (Chávez-Sifontes y Domine, 2013).

En el proceso Kraft la biomasa de la planta se trata con una solución de sulfuro de sodio e hidróxido de sodio concentrado durante 1-2 horas a 170 ° C (Asina et al, 2017). Durante la digestión varias reacciones tienen lugar, incluyendo la ruptura de enlaces entre lignina y los carbohidratos, la despolimerización de la lignina, su reacción con iones hidrosulfuro y su re-condensación. La despolimerización de lignina mediante el proceso Kraft se produce principalmente a través de la ruptura de los enlaces α - y β -aril éter (C-O), principalmente, en las unidades fenólicas y en una fase posterior sobre las unidades no fenólicas. Estas reacciones generan fragmentos con grupos fenólicos solubles en el medio alcalino predominante durante la digestión (Chávez-Sifontes y Domine, 2013).

Con el fin de producir una pulpa adecuada para la fabricación de productos de papel, se requiere una separación eficiente de la lignina de la fibra celulósica, durante la cual se genera un volumen considerable de efluente, una solución acuosa coloidal de lignina, también conocida como licor negro. Se ha estimado que cerca de siete toneladas de licor negro se producen por tonelada de producción de pulpa. Aunque representa sólo el 15% de la cantidad de aguas residuales, el licor negro se convierte en un contaminante importante de los ecosistemas acuáticos si el efluente

se descarga sin ningún tipo de tratamiento. Durante la producción de pasta química, el 90-95% de lignina se disuelve en licor negro a través de la cocción Kraft convencional, junto con una cantidad significativa de otras sustancias orgánicas, como la hemicelulosa y azúcares ácidos (Asina et al, 2017).

Por lo tanto, el licor negro debe considerarse por separado de la lignina industrial sin carbohidratos a pesar de su origen similar. Además, alrededor de 70 kg de compuestos orgánicos (principalmente lignina) por tonelada de pulpa puede disolverse durante el blanqueo de la pulpa. Después de 90% de remoción de lignina durante la fabricación de pasta Kraft, la mayor parte de la lignina restante presente en la pulpa puede disolverse durante las etapas de extracción de cloro y álcali en el proceso de blanqueo. La clorolignina, producida durante esta etapa, presenta un peso molecular más bajo con un contenido más alto de hidroxilo fenólico, carboxilo y grupos carbonilo conjugados (Asina et al, 2017).

La lignina Kraft se aísla del licor negro de alta alcalinidad al llevar el pH a 2-5 (Asina et al, 2017), con un ácido, como el ácido sulfúrico, esto debido a que la solubilidad de la lignina Kraft en agua disminuye con el descenso del pH; al reducir el pH también se reduce el grado de ionización de las moléculas favoreciendo la auto-agregación. Dado que otros componentes del licor negro (Por ej. componentes inorgánicos, azúcares y sus productos de degradación) son solubles en agua en un amplio intervalo de pH, la reducción del pH permite la precipitación de la lignina y su recuperación con un contenido relativamente bajo en carbohidratos (Chávez-Sifontes y Domine, 2013).

Las ligninas Kraft industriales no modificadas se caracterizan por un grado relativamente alto de pureza a su vez también presentan temperaturas de transición vítrea alrededor de 140 °C, mientras que estudios a altas temperaturas muestran la presencia de múltiples picos a 452 °C con dos hombros a 432 °C y 482 °C. Esta es una gran diferencia con respecto a los lignosulfonatos que no presentan temperatura de transición vítrea y, además, poseen una baja temperatura de descomposición debido a su elevado contenido en carbohidratos (Chávez-Sifontes y Domine, 2013).

1.3.2 Lignosulfonato

La lignina sulfito es producida por el proceso sulfito para fabricación de pasta de celulosa y está, fue históricamente el tipo de lignina industrial más abundante disponible comercialmente. Se desarrolló inicialmente basado en el uso de bisulfito de calcio, un producto químico barato para la fabricación de pasta. La falta de una tecnología adecuada para la recuperación de este producto químico, del licor generado propició el desarrollo de otros usos para estos licores, como por ejemplo la producción de lignosulfonatos de calcio (Gellerstedt y Henrinksson, 2008).

La tecnología de fabricación de pasta tipo sulfito ha evolucionado hasta incorporar el uso de otros sulfitos y bisulfitos, tales como sulfitos de magnesio, de amonio y de sodio. Así, los lignosulfonatos resultantes han encontrado también aplicaciones, en algunos casos especialmente adaptados para un tipo de catión específico (Gellerstedt y Henrinksson, 2008).

En procesos alternos de fabricación de pasta de sulfito, un ácido sulfuroso parcialmente neutralizado (H_2SO_3) que contiene un ion bisulfito (HSO_3^-) se aplica para disolver la lignina. En este proceso, las virutas de madera se tratan a 120-150 °C de 500-700 kPa. La pulpa de sulfito ácido y de bisulfito usan altas y bajas relaciones de $\text{H}_2\text{SO}_3/(\text{HSO}_3^-)$, respectivamente. El otro tratamiento, la pulpa de sulfito alcalino, emplea cantidades iguales de NaOH y Na_2SO_3 en el licor de cocción. El polimerizado de sulfito neutro emplea una solución neutra de Na_2SO_3 y Na_2CO_3 para suavizar la lignina y es a menudo acoplado con pulpa mecánica para una remoción más completa de la lignina (Asina et al, 2017).

Este proceso no es selectivo para la remoción de lignina, el licor resultante contiene hemicelulosa y carbohidratos; por lo que para obtener lignina con mayor grado de pureza debe someterse a posteriores procesos de separación. El contenido de azufre reportado en la literatura oscila entre 4-8% por ciento, la mayor parte en forma de sulfonato, aunque se encuentra en otras formas (sulfito y sulfato). En general, el grado de sulfonación de la lignina industrial es de 0,17-0,65 grupos sulfonato por unidad de fenilpropano, o alrededor de 0,9-3,3 grupos sulfonato por 1 g de lignina (Chávez-Sifontes y Domine, 2013).

En comparación con la pulpa Kraft, la pulpa de sulfito puede tratar sólo ciertas especies de madera y es completamente incapaz de procesar la corteza de madera. Además, la eficiencia de tratamiento de la pasta de sulfito puede ser tan sólo el 70% de la de la pulpa Kraft, incluso para las especies a las que este método es aplicable. Así, sólo alrededor del 10% de la pulpa se produce actualmente en todo el mundo por pulpa de sulfito. Sin embargo, el lignosulfonato es una materia prima actualmente considerada para aplicación industrial en la producción de tenso activos y agentes dispersantes, debido a su mayor solubilidad en agua y polidispersidad más amplia comparada con la lignina Kraft. Con una masa molecular más alta, el lignosulfonato también puede aumentar la resistencia del material cuando se utiliza como un aditivo de cemento. Sus propiedades físicas y químicas varían significativamente dependiendo de condiciones de tratamiento específicas, por ejemplo, la adición de metanol y antraquinona o bisulfito de magnesio (Asina et al, 2017).

1.3.3 Lignina de soda y Lignina Organosolv

La lignina de soda y la lignina Organosolv representan una porción menor de la producción industrial de lignina. La pulpa de soda se utiliza principalmente para el procesamiento de materias primas no madereras como el bagazo, el kenaf y la paja de trigo (Asina et al, 2017); estas materias primas han desempeñado un papel dominante como fuente de pulpa hasta hace aproximadamente un siglo y aún lo siguen siendo para algunos países en desarrollo (notablemente China, India y países de América del Sur). Las pastas de celulosa fabricadas mediante el proceso tipo soda se emplean principalmente para hacer papel de diferentes clases; además, se obtienen pastas de celulosa especiales para fabricar embalajes (Gellerstedt y Henrinksson, 2008).

La pulpa se lleva a cabo a 140-170 °C en presencia de 13-16% en peso de hidróxido de sodio. Durante la pulpa de soda, la antraquinona se puede utilizar como un aditivo para evitar la degradación de carbohidratos (Asina et al, 2017). Hay muchas similitudes entre la fabricación de pasta tipo soda y la pasta tipo Kraft, especialmente

en reacciones tales como la ruptura de enlaces entre la lignina y los carbohidratos, la despolimerización de la lignina y su re-condensación. Sin embargo, a diferencia del proceso Kraft, en la fabricación de pasta tipo soda el licor negro no contiene nucleófilos fuertes (tales como sulfuro o hidrosulfuro) compuestos que podrían bloquear la condensación de los intermedios de fragmentación. Por lo tanto, la condensación de la lignina puede ser más frecuente en este proceso que en el proceso Kraft (Chávez-Sifontes y Domine, 2013).

La lignina también se puede extraer de la biomasa con disolventes orgánicos tales como etanol, metanol y ácidos orgánicos mediante solubilización.

En un proceso utilizado industrialmente para recuperar ligninas tipo soda de licores negros provenientes de residuos no maderables, el pH es reducido con un ácido mineral hasta formar una suspensión de lignina, la que posteriormente es filtrada, lavada y secada; hasta producir lignina en polvo con una elevada pureza y un porcentaje de humedad menor al 5%. Este tipo de ligninas presentan temperaturas de transición vítrea entre 158-185 °C. La ausencia de azufre les da ventaja sobre las ligninas tipo Kraft para aplicaciones en las que se necesitan flujos térmicos y las emisiones de compuestos sulfurados volátiles son indeseables (Chávez-Sifontes y Domine, 2013).

Después de la extracción de la pulpa de Organosolv, el disolvente orgánico puede recuperarse fácilmente por destilación. Aunque los tratamientos de soda y Organosolv son menos eficientes que los que implican azufre, su mayor idoneidad para el funcionamiento en fábricas de papel a pequeña escala hace que estos procesos sean viables. Una ventaja significativa de la lignina producida a partir de estos procesos es su estructura libre de azufre, que permite un procesamiento posterior como lo son acetilaciones, reducciones, alquilaciones, etc., para la producción de compuestos más complejos. (Asina et al, 2017).

Los tres métodos antes mencionados son los que conforman en mayor proporción la producción de lignina a nivel industrial y como sumario se presentan en la Tabla 5, los tipos de lignina que se obtienen como producto de cada uno de los métodos antes mencionados.

Tabla 5. Características de las principales ligninas comerciales. (Vishtal y Kraslawski, 2011).

Tipo de lignina	Lignina Sulfito	Lignina Kraft	Lignina Soda	Lignina Organosolv
Parámetros				
Cenizas (%)	4.0 - 8.0	0.5 - 3.0	0.7 – 2.3	1.7
Humedad (%)	5.8	3.0 - 6.0	2.5 – 5.0	7.5
Carbohidratos (%)	--	1.0 - 2.3	1.5 - 3.0	1.0 – 3.0
Soluble en ácido (%)	--	1.0 - 4.9	1.0 – 11	1.9
Nitrógeno (%)	0.02	0.05	0.2 – 1.0	0.0 - 0.3
Azufre (%)	3.5 - 8.0	1.0 – 11	0,0	0.0
Masa molecular kDa	1.000 - 50.000 (hasta 150.000)	1.500 – 5.000 (hasta 25.000)	1.000 – 3.000 (hasta 15.000)	500-5.000
Método de Separación	Ultrafiltración	Precipitación (cambio de pH) y ultrafiltración	Precipitación (cambio de pH)	Extracción con disolventes orgánicos

Así mismo hay otros métodos más recientes que se han ido implementando por la necesidad de tener alternativas prácticas a los métodos anteriores buscando mejores resultados de obtención y menos interferencias. Algunos ejemplos de estos métodos se describirán a continuación.

1.3.4 Lignina de hidrólisis enzimática y Lignina de hidrólisis ácida.

La otra lignina libre de azufre denominada lignina de hidrólisis enzimática, se obtiene por hidrólisis selectiva de biomasa utilizando enzimas celulíticas, que deja la lignina como residuo sólido. Sin embargo, a pesar del alto contenido de impurezas incluyendo carbohidratos y residuos de proteínas, la lignina de hidrólisis enzimática posee un valor más alto para sus aplicaciones potenciales, tales como el desarrollo de absorbentes, esto debido a la mayor conservación de la estructura original debido a condiciones de reacción menos severas que otros tratamientos. Además,

esta lignina puede usarse en el desarrollo de nuevos polímeros tales como compuestos de epoxi-lignina combinando lignina con un polímero sintético. Se encontró que tanto las propiedades mecánicas como la estabilidad térmica de los compuestos epoxi estaban fuertemente influenciadas por la adición de lignina de hidrólisis enzimática de paja de maíz.

El tratamiento previo con ácido diluido (2-5%) o concentrado (10-30%), principalmente con ácidos sulfúrico o clorhídrico, también puede descomponer la celulosa y la hemicelulosa mientras se separa la llamada lignina de hidrólisis ácida como residuo (Asina et al, 2017).

1.3.5 Lignina líquida iónica

Un tipo adicional de lignina se obtiene mediante la aplicación de líquidos iónicos. Los líquidos iónicos son sales que tienen lugar en el estado líquido a o por debajo de 100 °C. Los cationes más comunes que comprenden estas sales son trialquilpiridinio o imidazolio así como derivados de tetraalquifosfonio o amonio mientras que los haluros y los ácidos orgánicos fluorados se usan como contra-aniones. Una vez que se disuelve toda la biomasa, típicamente a 80-130 °C, la celulosa y la lignina pueden separarse adicionalmente utilizando los denominados "anti-disolventes", es decir, agentes de precipitación selectiva de lignina, tales como agua, mezcla de acetona y agua, etc. (Asina et al, 2017).

En la Figura 5, se muestra una tabla resumiendo los tipos de extracción de lignina usados industrialmente.

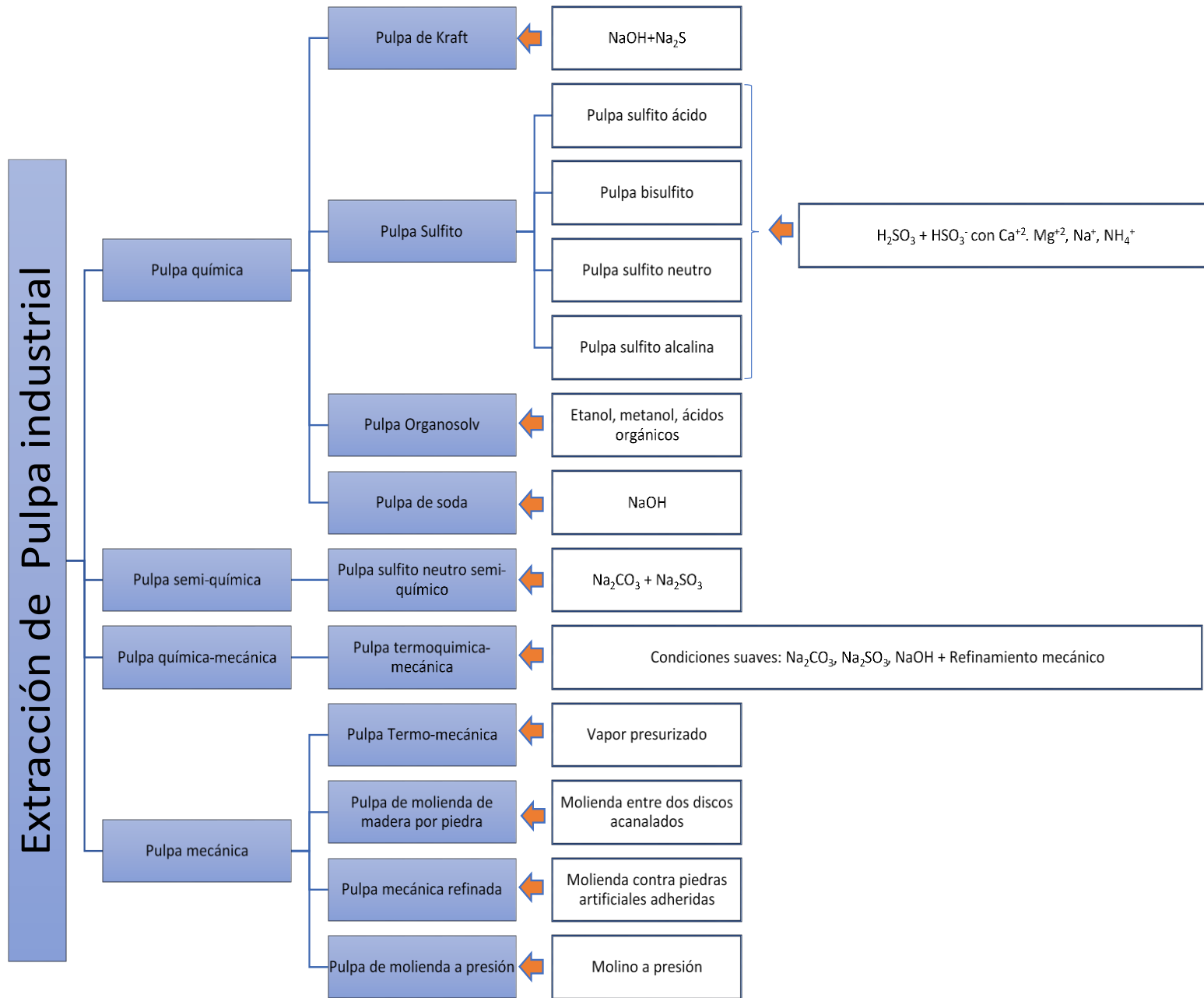


Figura 5. Tipos de Lignina producidas industrialmente. (Asina et al, 2017)

Hasta ahora, la producción de ligninas libres de azufre ha sido menor que la del lignosulfonato y la lignina Kraft. Sin embargo, el rápido desarrollo de las biorrefinerías puede conducir a un aumento significativo de la fracción de las ligninas que se producen junto con el procesamiento de carbohidratos de biomasa.

Objetivo General

Diseñar un procedimiento que sea reproducible y que permita obtener un rendimiento alto para la cuantificación de lignina en diferente tipo de material lignocelulósico.

2 Metodología.

Se probaron diferentes métodos para la cuantificación de lignina en los materiales lignocelulósicos, los cuales tienen como variables, diferentes formas de calentamiento, tiempo y adición de reactivos y enzimas.

Los métodos usados fueron:

- a) Digestión por autoclave.
- b) Cuantificación por espectrofotometría UV mediante acetilación.
- c) Método combinado de Fibra-Klason.

2.1 Digestión por autoclave.

Para este método la digestión se realizó en un sistema de autoclave por calor húmedo. En la Figura 6 se muestra el diagrama general para este método.

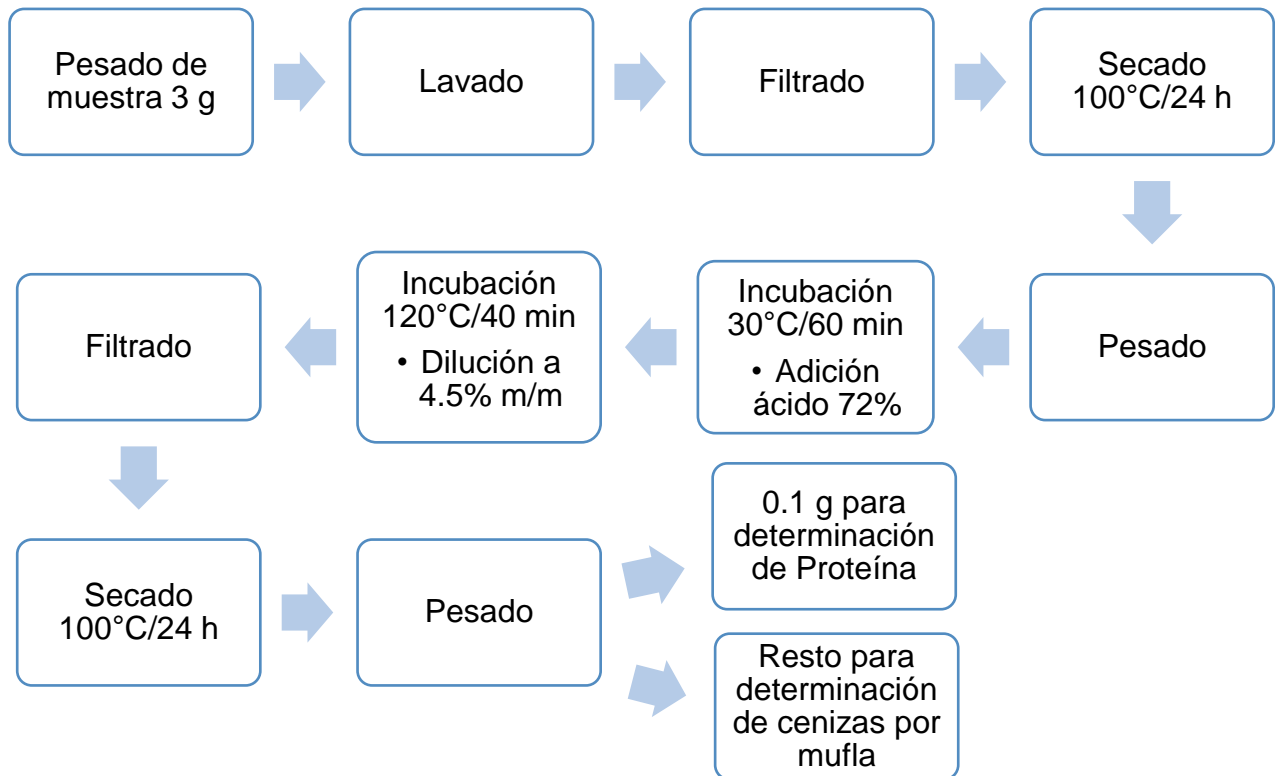


Figura 6. Diagrama del método de cuantificación por autoclave.

Se pesó aproximadamente 3 gramos del residuo después de hidrólisis y se lavó con aproximadamente 300 mL de agua caliente, hasta la pérdida de color en el agua de lavado para quitar impurezas y materiales hidrosolubles en la matriz. La muestra se filtró, secó y peso para cuantificar la pérdida de peso en el lavado (~45% m/m).

La muestra se colocó en tubos de ensayo de 20x150 mm adicionándoles ácido sulfúrico al 72% en una relación de 1mL/100mg de muestra, los tubos de ensaye se llevaron a incubación en baño de agua a 30°C/60 min, realizando así una primera

digestión llevada a cabo con una alta concentración de ácido y una baja temperatura. Terminada esta primera digestión de manera subsecuente se realizó una segunda digestión diluyendo el ácido y aumentando la temperatura, esto se llevó a cabo trasvasando el contenido a un matraz Erlenmeyer de 500 mL, y diluyendo el contenido hasta un 4.5% m/m con agua destilada para posteriormente incubar el matraz en autoclave a 120°C/40 min.

Pasado el tiempo de incubación la muestra se filtró, a través de papel filtro a peso constante, esto mediante vacío para después ser llevada a estufa para su secado a 100°C durante 4h; posteriormente se realizó el pesado de la misma. Una vez pesado el residuo resultante de la muestra tras las hidrólisis, se homogeneizó para llevar a cabo la determinación de proteína (método de Kjeldahl) y la determinación de cenizas.

2.2 Cuantificación por espectrofotometría UV mediante acetilación (ABL).

Este método consistió en evaluar el contenido de lignina en una muestra mediante la acetilación de la misma, haciendo reaccionar el producto de acetilación con Clorhidrato de Hidroxilamina para así formar un compuesto fluorescente capaz de absorber energía en la región UV del espectro a una longitud de onda de 280 nm. En la figura 7 se muestra el diagrama de extracción

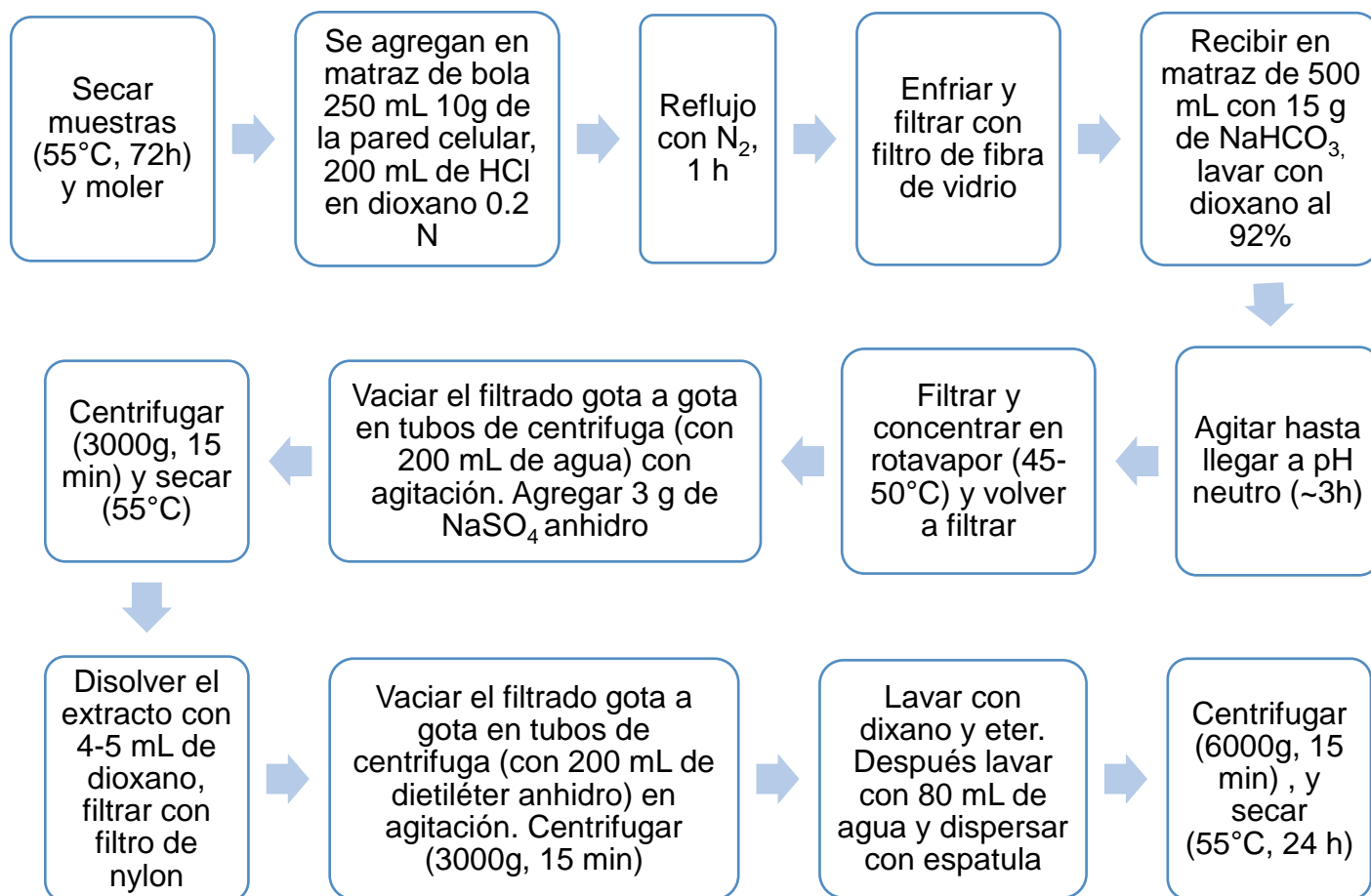


Figura 7. Diagrama de la extracción de la pared celular en las fibras iniciales tratadas.

Para poder llevar a cabo la reacción de acetilación, primeramente, se llevó a cabo una extracción de la lignina directamente desde la matriz de las muestras con dioxano, el cual es un disolvente de muy baja polaridad que según estudios es capaz de solubilizar una gran variedad de lignina hidrofóbica (Chávez-Sifontes y Domine, 2013).

Para esto lo primero que se realizó fue un secado y molienda de las diferentes muestras para así poder tener una mayor área de contacto entre las fibras y el disolvente, el disolvente fue añadido en una mezcla ácida con HCl, esto para facilitar

la separación de las fibras de lignina de la matriz; la mezcla se sometió a reflujo moderado en una atmosfera inerte de N_2 durante una hora.

Una vez terminado el reflujo se dejó enfriar y se filtró mediante fibra de vidrio, posteriormente el sobrenadante se recibió en un matraz Erlenmeyer de capacidad de 500 mL con 10 g de bicarbonato de sodio con lo que se llevaba a la neutralidad el sobrenadante. Así mismo consecutivamente se realizaron lavados de dioxano para atrapar la lignina suspendida; el exceso de dioxano se removía mediante concentración en un equipo Rotavapor. Para separar la lignina de componentes hidrofílicos que pudieran haber quedado en los extractos, estos mismos extractos fueron puestos en tubos de centrifuga con agua destilada y 3g de sulfato de sodio anhidro. El extracto resultante se secó en estufa convencional y posteriormente se disolvió una vez más con dioxano repitiendo el paso del centrifugado solo que en esa ocasión con dietiléter en vez de agua, por último, se realizaron lavados con disolventes (dioxano y dietiléter) y un último con agua para dispersar la lignina obtenida, la mezcla resultante se centrifugó para separar la fase solida de interés.

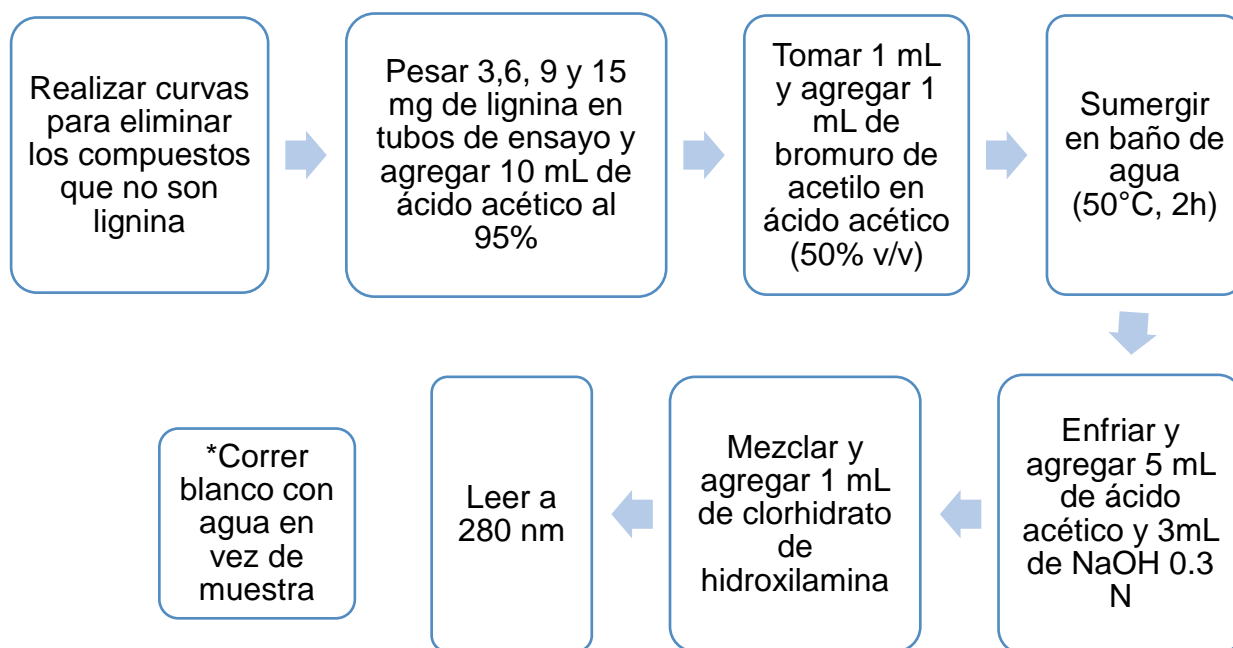


Figura 8. Diagrama de cuantificación y preparación de la curva de calibración para el método de ABL.

Para la cuantificación de la lignina en el extracto anterior se realizó una curva de calibración Figura 8 usando de referencia una lignina comercial (SIGMA-ALDRICH 471003), de la cual se tomó una pequeña cantidad que se hizo reaccionar en medio ácido con bromuro de acetilo, la reacción se llevó a cabo en un baño María (50°C, 2h). Una vez concluido el tiempo se añadió ácido acético e hidróxido de sodio para mantener un pH lo más cercano a la neutralidad, por último, se formó el compuesto luminiscente con clorhidrato de hidroxilamina y se procedía a leer en espectrofotómetro de UV a una longitud de onda de 280 nm; durante las adiciones de reactivos, así como antes de la lectura los tubos se agitaron mediante vortex para homogeneizar la solución.

Las muestras se trataron de la misma forma realizando un triplicado de cada una de las mismas y se procedía a interpolar los resultados obtenidos de las muestras en la curva de calibración realizada.

2.3 Método combinado de Fibra-Klason.

El tercer método que se utilizó fue una variación del método de cuantificación de fibra dietética, el cual presenta correcciones por cenizas y proteína; así mismo incluye pasos de la determinación clásica de lignina de Klason llevada a cabo por hidrólisis con ácidos fuertes.

2.3.1 Pretratamiento de la materia prima inicial.

2.3.1.1 Extracción de la pared celular.

Se realizó una extracción de la pared celular proveniente de la materia prima para quitar contaminantes contenidos en ella; para ello se realizó una extracción con disolventes en un sistema Soxhlet. Para la extracción, el material inicial fue secado en estufa convencional a 100°C durante 4h, posteriormente la fibra se sometió a molienda en un molino de aspas y se puso en un sistema de extracción Soxhlet con

un peso aproximado de 20-30 g por cartucho. La extracción se realizó de forma subsecuente con distintos disolventes; las secuencias de disolventes usados fueron: Agua desionizada, etanol 98%, diclorometano y acetona; la extracción con cada disolvente duró aproximadamente 8 horas con un goteo de 1 por segundo, dejando el tiempo suficiente para que la sección del colector ya no mostrase coloración.

2.3.1.2 Tratamiento térmico y enzimático

Para la materia prima de material lignocelulósico, en que los componentes están altamente unidos a la estructura de la pared se utilizó un tratamiento térmico para adecuar y ablandar la fibra, esto para poder facilitar la reacción y cuantificación posterior de la lignina. El procedimiento consistió en pesar 10 g de la fibra en un matraz con 50 mL de agua destilada y someterlo a condiciones de autoclave (121°C durante 1.5 h). De esa forma la fibra se hidrataba y sensibilizaba para permitir el acceso de los reactivos y enzimas posteriormente usados.

Posteriormente se procedió a realizar tres etapas de hidrólisis con una mezcla enzimática compuesta de proteasa bacteriana, glucanasa bacteriana y xilanasas fúngicas. Para la primera enzima las condiciones de incubación fueron 60°C, 30 min, pH 5.0-5.5 en un baño con agitación a 60°C. Para las posteriores dos enzimas las condiciones de incubación fueron las mismas: 50°C, 96 h, pH=4.5-5.5 en un baño térmico con agitación. La adición de enzimas fue continua una tras otra.

Las enzimas, una vez debilitada la estructura de la fibra con el tratamiento térmico previo, procedían a romper las cadenas de proteínas, celulosa y hemicelulosa respectivamente dentro de la estructura liberando parte de la lignina atrapada en las redes.

Después de pasar el tiempo de hidrólisis las muestras se centrifugaron a 4500 g durante 15 min para separar el sobrenadante y obtener el sólido de interés.

2.3.2 Preparación de muestras previamente deconstruidas en un reactor de 5 L, en un sistema ácido fase gas/líquido

Las muestras de material lignocelulósico tratadas para su deconstrucción a través de un proceso ácido fase gas /líquido, se sometieron a una separación del residuo sólido y el sobrenadante mediante centrifugación de la muestra la cual se realizó a 4500 g durante 15 min en una centrifuga de ángulo fijo.

Después del centrifugado la muestra se separó inmediatamente por decantación del sobrenadante para obtener el residuo sólido solamente; el residuo sólido se procedió a secar en estufa convencional bajo condiciones de 100°C/24h.

Debido a los tratamientos anteriores el residuo sólido en principio además de lignina contiene una cierta cantidad de impurezas debido a las trazas de proteína, ácidos, carbohidratos y demás estructuras producidas y añadidas durante el proceso hidrolítico, por lo cual fue necesario realizar una serie de lavados de este residuo sólido para quitar impurezas no deseadas y que pudieran llegar a interferir con la cuantificación.

Para el lavado se pesaron 3g del residuo seco y fue colocado en un sistema de filtración al vacío con papel filtro previamente puesto a peso constante y como disolvente de lavado se utilizó agua destilada hirviendo, se realizaron varias repeticiones de lavados hasta asegurar que el agua de lavado obtenida fuera translúcida, quitando así la mayor parte de los contaminantes impregnados en la matriz.

Una vez pasada la etapa de lavado, el residuo sólido fue puesto a secar en estufa convencional a 100°C/24 h.

2.3.3 Cuantificación de lignina en muestras

En la Figura 9 se muestra el esquema general para la cuantificación de lignina en los materiales y muestras tratadas como se describió anteriormente.

Una vez secado el residuo lavado proveniente del proceso hidrolítico se procedió a pesar en tubos de ensaye de 15x150 mm lo que se obtuvo de masa total. Así mismo se transfirió el residuo de la fibra inicial después del centrifugado en igualmente tubos de ensaye de 15x150 mm.

Ya en los tubos, a la muestra, se les añadió 10 mL de ácido sulfúrico concentrado con agitación y se puso a incubación a 45°C durante 2 h. Una vez terminada esta hidrólisis, la mezcla se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL y le fue añadido 110 mL de agua destilada, esto para diluir la concentración del ácido sulfúrico de 12 M a 1 M. La nueva mezcla de hidrólisis se puso en incubación en baño María durante 1.5 h.

Una vez pasado el tiempo de hidrólisis las muestras se filtraron a través de papel filtro a peso constante y fueron puestas a secar en estufa convencional 100°C/24h, posteriormente se pesó el sólido obtenido para determinar el peso final del tratamiento de hidrólisis y hacer los cálculos correspondientes.

Para corregir el resultado debido al peso que también aportan las cenizas provenientes de la propia muestra, buffer, sales formadas por la adición de los ácidos entre otras, así como el valor de proteína que hay en la muestra debido a la adición de enzima y a los fragmentos remanentes de proteína que pudieran haber quedado en la matriz.

Para corregir estos valores de peso se realizaron corrección de peso por cenizas y proteína.

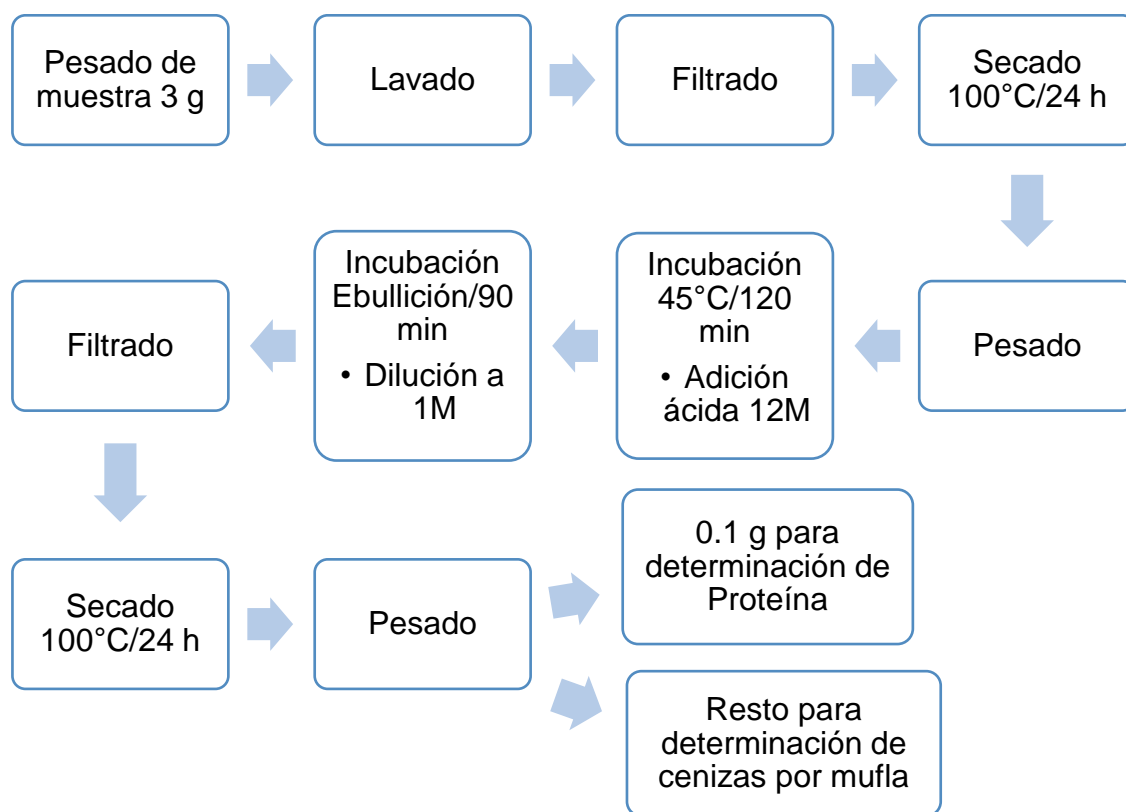


Figura 9. Diagrama para la cuantificación de la lignina en las muestras por medio del método combinado de Fibra-Klason.

2.4 Balance de cenizas

También para observar cómo era la variación del porcentaje de cenizas debido al tratamiento con ácidos, buffer y materiales fibrosos, se realizó un balance de cenizas (Figura 10) para las fibras analizadas, esto fue necesario para la corrección por peso de la lignina en el punto específico de corrección por cenizas.

La metodología general para el balance de cenizas fue el análisis tradicional, pesando aproximadamente 5 g de muestra en crisoles de porcelana a peso constante, estas muestras fueron tomadas de cada una de las fases del análisis, y

sometieron a calcinación en mechero; en forma consecutiva se sometió a calcinación en mufla a 450 °C.

Una vez que se cerciora que las muestras ya no presenten coloración que indique compuestos orgánicos, fueron retiradas de la mufla y puestas en un desecador para su enfriamiento. Al alcanzar el equilibrio térmico con el ambiente se somete a pesaje para el cálculo de concentración de cenizas.



Figura 10. Diagrama de las etapas en las que se realizó el balance de cenizas realizado a las muestras.

3 Resultados y Discusión

3.1 Elección del método de trabajo.

Para la elección del método con el cual llevar a cabo la cuantificación de la lignina se probaron diferentes métodos; el material fibroso seleccionado, en el cual se realizaron las pruebas, fue el bagazo de agave tequilero. Este material presenta un aproximado de 18% de lignina en su constitución. Con base en este dato, se comparó el método que diera el valor más confiable y exacto (Tabla 6). Los diferentes métodos fueron en su mayoría gravimétricos a excepción de uno espectrofotométrico de acetilación (ABL).

3.1.1 Método espectrofotométrico de Acetilación (ABL).

Este método consistió en llevar a cabo la acetilación de la lignina con bromuro de acetilo en condiciones ácidas, para después hacer la reacción con clorhidrato de hidroxilamina provocando una respuesta que puede ser leída a una longitud de onda de 280 nm.

El resultado del método espectrofotométrico de acetilación presentó diferentes tipos de dificultades, así como errores al momento de la lectura, esto debido a la poca selectividad de la reacción, causa también de no saber la caracterización de la estructura misma.

Con este método (ABL), se pretendía por medio de una curva de calibración realizada con un extracto de lignina y posteriormente con un estándar de lignina el poder tener una forma cuantitativa de interpolación, que llevará a una evaluación confiable. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 6 este método presentó varios problemas debido a su alta dispersión no seguía un patrón repetible de respuesta y poca exactitud, para algunas pruebas la acetilación era mayor que en otras. Se observó también, que en algunos ensayos era demasiada la cantidad de producto que a los pocos segundos tendía a la heterogeneidad en la solución, esto debido probablemente a la poca solubilización de la lignina en la solución de acético, provocando un gradiente de concentración hacia el fondo de la solución.

Al evaluar los resultados obtenidos estos presentaron una alta dispersión, y los índices de correlación resultaban bajos (~ 0.93 de correlación), dado esto, se tomó la decisión de no continuar con este método debido a su pobre reproducibilidad, así como poca especificidad al momento de la reacción de acetilación con la fibra. Esto seguramente se debió a que dependiendo del tipo de monolignoles existentes en la fibra, así como su arreglo espacial era el tipo de acetilación que podría recibir y con ella formar el producto colorido con el clorhidrato de hidroxilamina. Esto es una limitante ya que en muchas ocasiones se desconoce el tipo de arreglo y la caracterización de los monolignoles en las fibras por lo que es difícil conocer el grado de acetilación, así como su especificidad en la forma que reacciona.

3.1.2 Método para la obtención de la Lignina de Klason.

3.1.2.1 Digestión por autoclave ácido.

Se realizaron distintos métodos gravimétricos utilizando como base el principio de la lignina de Klason, en el cual el residuo resultante después de un tratamiento ácido a temperaturas elevadas de digestión destruiría todas las estructuras orgánicas en la matriz a excepción de la lignina que junto con la celulosa cristalina es la estructura más resistente de la pared celular de las plantas.

Con base en este principio, se probaron diferentes parámetros para aumentar el grado de hidrólisis que pudiera tener la fibra, sin comprometer la integridad de la lignina. La lignina si era fragmentada provocaría solubilización y una subestimación al llevar a cabo la cuantificación ya que está consistía en evaluar el residuo sólido.

3.1.2.2 Tratamiento enzimático-ácido.

Con base en los resultados del tratamiento por autoclave se decidió adecuar las fibras antes del tratamiento ácido, a través de la adición de enzimas para que actuaran a nivel de las estructuras de los carbohidratos. Las enzimas hidrolizan los enlaces de celulosa y hemicelulosas formadas por glucosa y pentosas respectivamente, para lo cual se usaron las mezclas de enzimas de tipo celulasas, xilanasas, así como una proteasa para romper las pequeñas proporciones de péptidos y oligopéptidos que pudieran interferir en la ruptura de las estructuras y la liberación de la lignina de interés.

Las enzimas fueron agregadas en exceso para obtener el mayor grado de hidrólisis posible para así en conjunto con una un tratamiento previo en autoclave la fibrilla del material y sus estructuras fueran debilitadas tanto por la acción térmica, así como, por la hidratación de la mismas. Lo anterior permitiría un aumento en la hidratación haciendo que las estructuras se hicieran menos rígidas logrando así un mayor ataque enzimático y ácido al tener más sitios donde penetrar. Sin embargo, los resultados obtenidos (Tabla 6) fueron similares a los del método ácido-autoclave (0.016% y 0.024% de DE respectivamente) que, aunque presentaban un valor de desviación estándar bajo y se podría considerar adecuado, los resultados obtenidos era algo menor al esperado. Por lo anterior, se optó por seguir probando otro método para observar tanto su reproducibilidad como exactitud y que los resultados obtenidos fueran más cercanos a los esperados; para esto se probó un último método que fue una modificación del método de fibra dietética.

Tabla 6. Influencia del método de cuantificación sobre la concentración de lignina en bagazo de agave (Resultados en g/100g).

Método Espectrofotométrico (Acetilación con bromuro)	Métodos Gravimétricos			
	Klason estándar en condiciones de autoclave	Klason estándar con adición de enzimas	Método combinado de Fibra-Klason	Método combinado de Fibra-Klason (optimizado)
30.08 ± 5.2 %	16.85 ± 0.024%	15.17 ± 0.016%	27.67 ± 0.03%	17.98 ± 4.01%

(Resultados promedio n=7)

3.1.3 Método combinado de Fibra-Klason.

El siguiente método que se realizó fue una combinación de las determinaciones clásicas de Fibra y de Lignina de Klason. Sin embargo, en la implementación del método original se observó que el sólido final resultante de la hidrólisis aún conservaba varias fibras intactas lo cual era un indicativo visual que no se había realizado una hidrólisis adecuada, esto podía inferir que el valor que se obtuvo de ello se estaba sobreestimado, debido a que el peso excedente de las fibras que no se hidrolizaban, aumentaba el valor que era asociado con lo que debería ser lignina solamente

Al observar lo anterior se tomó la decisión de continuar con el método aplicando una serie de modificaciones (Tabla 7), esto con el objetivo de producir una mayor ruptura de las fibras en un menor tiempo posible para así poder tener una mayor recuperación de la concentración de lignina en el sólido resultante. Los parámetros que sufrieron modificación fueron:

- a) Cantidades de enzima: esto para sobresaturar las áreas de contacto con las fibras aumentando así la capacidad de hidrólisis de las enzimas.

- b) Condiciones de incubación en la fase de hidrólisis enzimática: Esto para alargar el tiempo en el que se dejaba actuar a las enzimas y poder obtener una mayor hidrólisis.
- c) Condiciones de incubación en la fase de hidrólisis ácida: estas condiciones se variaron para tratar de lograr una mayor hidrólisis de las zonas cristalinas y zonas muy ramificadas que no se lograron desestabilizar con el tratamiento enzimático, para así poder contar con una representación total de la lignina en las muestras.

Esto aunado a los pretratamientos explicados anteriormente para lograr así bajar la rigidez de la matriz y adecuarla para un mayor ataque por parte de los reactivos y de las enzimas.

Sin embargo varias de las posibles causas de error que podrían presentarse para los resultados en este método fueron cuidadas, esto por ejemplo en el caso del peso del residuo final, en el cual se realizaron los diferentes lavados antes explicados en la metodología para así eliminar todo el residuo que pudiera ser soluble en el agua, ya que como en el proceso hidrolítico lo que se producen son carbohidratos en forma de hexosas, oligohexosas, pentosas y oligopentosas, y al ser estas moléculas solubles en aguas es fácil eliminarlas con adición de agua hirviendo, así como el mayor número de sales formadas por la neutralización del residuo hidrolítico ya que en un inicio debido al proceso al que es sometido, este lodo viene con un pH cercano a 1-2 por lo cual al subir el pH con NaOH, la formación de sales es irremediable, por lo tanto estas sales provocarían peso adicional y es necesario a quitarlas.

Otro de los cuidados que se tuvo en la prueba de este método fue el uso de cada material a peso constante para evitar errores de peso por la humedad del material.

Tabla 7. Variaciones en los parámetros durante la optimización del método seleccionado.

Parámetro	Volumen de enzima (mL)		Condiciones de incubación		Condiciones en hidrólisis ácida con ácido 12 M	Condiciones en hidrólisis ácida con ácido 1 M
	Glucanasa	Xilanasa	Glucanasa	Xilanasa		
Inicial	1	1	50°C/18 h	50°C/18 h	30°C/ 1 h	100°C/1.5 h
Modificación 1	1	1	50°C/72 h	50°C/48 h	30°C/ 8 h	121°C/1.5 h
Modificación 2	Mezcla (1:1) 2 mL		50°C/ 96 h		30°C/ 2 h	100°C/1.5 h
Modificación 3	2	2	50°C/96 h	50°C/96 h	30°C/ 2 h	100°C/1.5 h

Pasado estas pruebas y consideraciones se eligió que el método que conllevaba una modificación del método de fibra y de Klason, era el método más eficaz y con resultados constantes de entre los que se trabajaron en la cuantificación de la lignina, esto debido a que involucraba el pretratamiento de las fibras, la hidrólisis enzimática por periodos de incubación extendidos y el uso de condiciones ácidas fuertes, esta mezcla propició en las pruebas, que el grado de hidrólisis fuera el mayor posible así como que la morfología del residuo final era prácticamente un semisólido sin fibrillas, y lo más importante con un valor cercano al esperado para el bagazo de Agave

3.2 Cuantificación de los materiales lignocelulósicos.

3.2.1 Cuantificación de cada componente para eliminación de factores por corrección de masa.

Una vez seleccionado el método de trabajo: Método combinado de Fibra-Klason, se procedió a la aplicación de este para la cuantificación de los demás materiales, tanto en su forma de materia prima como en su forma de residuo sólido proveniente de las muestras deconstruidas en el reactor de 5 L, en un sistema ácido fase gas/líquido.

Para la obtención de los resultados se procedió a realizar los cálculos correspondientes como se muestra en el Anexo 1.

En la Tabla 8 se muestran los resultados promedio de las determinaciones del análisis composicional de las fibras de materiales iniciales. Se puede observar como en un inicio el contenido de lignina en las fibras representa una proporción importante en las muestras. Lo anterior demuestra que es un recurso interesante para su recuperación y aprovechamiento.

En el caso de las cenizas es posible ver como los porcentajes de cenizas aumentan considerablemente debido a los tratamientos que sufren las fibras para la ruptura de su estructura y la obtención de las estructuras de interés. Esto se puede observar comparando las tablas 8 y 10.

Tabla 8. Composición de las fibras lignocelulósicas sin tratamiento hidrolítico.

Fibra	%Humedad	% Proteína	% Cenizas	% Lignina
Bagazo de agave	6.2 ± 0.54	3.6 ± 0.06	6.87 ± 0.43	20.13 ± 0.69
Bagazo de caña	10.2 ± 0.72	4.2 ± 0.04	2.21 ± 0.10	17.22 ± 1.03
Olote	6.6 ± 0.63	4.6 ± 0.16	0.85 ± 0.09	16.54 ± 2.78
Aserrín	7.4 ± 0.10	1.2 ± 0.07	0.28 ± 0.09	31.94 ± 0.14
TK	38.4 ± 0.15	1.4 ± 0.03	1.02 ± 0.10	35.76 ± 2.82

(Resultados promedio n=3).

En la caracterización composicional de las fibras sin tratamiento algo que pudo ser observado es como, en el caso de las maderas (TK y aserrín) el valor de lignina de inicio es alto, esto debido a que en este caso la materia orgánica es directamente madera la cual tiene una mayor proporción de lignina respecto a celulosa-hemicelulosa. En contraste para los casos del olote de maíz, bagazo de agave y bagazo de caña, sus estructuras son menos rígidas que una madera con una mayor proporción de celulosa-hemicelulosa que de lignina. Esto se constata al observar los resultados obtenidos, aunque cabe resaltar que el valor de humedad de TK es alto en comparación a la otra madera del aserrín esto es debido al grado de molienda que se tiene y al tipo de madera que es, ya que guarda una cantidad importante de resinas naturales que permiten la absorción de agua en su superficie y al ser molida finamente permite la absorción de humedad en la superficie de cada granillo lo cual provoca que en su conjunto la humedad total sea alta.

Otro punto por tratar es la cantidad de proteína contenida en los materiales provenientes de plantas y en los proveniente de maderas, donde básicamente son estructuras de soporte y tienen pocas estructuras complejas, siendo más abundantes las matrices de fibras y resinas, en comparación con las plantas como el maíz, agave y caña que en su estructura las células llevan a cabo más funciones biológicas que en el tronco de un árbol por lo cual el contenido de proteínas, enzimas

y oligopéptidos en su interior será mayor. Lo anterior explica los resultados, en los cuales se observa que es casi 3 veces mayor el contenido de proteína en los bagazos y olote que en las maderas, esto debido a la presencia de un sistema biológico mayor con funcionalidades específicas.

3.2.2 Concentración de la lignina obtenida con el método seleccionado

Para el caso de principal interés en la realización de esta tesis, el cual es la cuantificación de lignina en las distintas fibras lignocelulósicas que son usadas para la obtención de otros productos de valor agregado. Con el método elegido (Punto 2.1.3), el cual fue, una modificación del método tradicional de cuantificación de lignina de Klason, una vez aplicado este método a todos los materiales lignocelulósicos trabajados se observó que la recuperación de lignina en los residuos finales es cercana al 90% (Tabla 9).

Al ser un método gravimétrico este porcentaje se ve influenciado esencialmente como se ha mencionado antes, a la adición de sales, enzimas en exceso para asegurar el mayor porcentaje de hidrólisis posible, así como cenizas, proteínas ligadas, y hasta llegado el caso, celulosa cristalina remanente que no haya sido posible eliminar en los diferentes tratamientos, ya que estas pueden quedar adheridas a la matriz en el residuo final, lo cual representa el otro porcentaje de masa que no es lignina.

Tabla 9. Pureza del contenido de lignina en el residuo sólido seco de las muestras después de la hidrólisis enzimática. (Resultados promedio $\pm \sigma$).

Material lignocelulósico	g lignina/100 g.
Bagazo de agave	80.84 \pm 4.8
Bagazo de caña	82.13 \pm 1.9%
Olote	81.90 \pm 3.2 %
Aserrín	92.21 \pm 2.7%
TK	87.71 \pm 3.5 %

(Promedio n=5)

Un punto determinante que se debe de tomar en cuenta en la cuantificación de la lignina, son las características biológicas de cada material, en el caso de las maderas su mayor cualidad es la rigidez necesaria para el soporte de la especie a la que corresponden y esto es debido a una alta cantidad de lignina en relación lignina-celulosa-hemicelulosa es de esperarse que se obtenga una mayor cantidad de lignina de las maderas y también un mayor grado de hidrólisis debido al tipo de arreglo espacial que forman estas redes estructurales (El Mansouri, 2009).

Estas redes en las maderas presentan un mayor entramado que además presenta un tipo de monolignoles con mayor enlaces éter entre ellos como lo son el alcohol sinapílico que está presente en las maderas duras y no está presente en las plantas como el agave, caña o maíz (El Mansouri, 2009). Y que también puede que debido a esta mayor resistencia en las maderas y menor en los demás materiales una pequeña fracción de la lignina a lo largo del proceso haya sido dañada lo cual bajaría el contenido final de lignina al perderse parte de esta debido a los fuertes tratamientos a los que fueron sometidas las fibrillas, por lo cual es de suma importancia el tener presentes estas características para dar el tratamiento adecuado de molienda y sensibilización de la matriz para obtener mejores resultados.

3.3 Balance de cenizas de los procesos

En la Tabla 10, se muestran los porcentajes de cenizas promedio en las diferentes etapas del tratamiento realizado. Los resultados muestran como a medida que las etapas del análisis avanzan hay general un aumento en la cantidad de cenizas dentro de la matriz analizada, este aumento es en gran parte debido a la adición de los diferentes buffers usados para el acondicionamiento de la matriz.

Esta adición además de proveer condiciones óptimas para las enzimas adicionadas como lo son las condiciones estables de pH para el accionar enzimático, también permite una mayor fluidez de los reactantes en la mezcla para tener así una mayor

área de contacto y de reacción, que repercute en teóricamente una mayor cinética de hidrólisis.

Tabla 10. Contenido de cenizas en diferentes etapas del proceso.

Tipo de fibra	Cenizas (g de cenizas/100g)				
	Bagazo de caña	Olote	Bagazo de Agave	Aserrín	TK
Etapa del tratamiento					
Fibra inicial	2.21 ± 0.10	0.85 ± 0.09	6.87 ± 0.43	0.28 ± 0.09	1.02 ± 0.10
Lodo Biomasa (18% sólidos)	0.70 ± 0.01	2.93 ± 0.20	5.37 ± 0.48	3.96 ± 0.03	4.16 ± 0.25
Lodo de Hidrólisis	1.71 ± 0.03	2.74 ± 0.04	4.39 ± 0.26	4.54 ± 0.71	4.72 ± 0.29
Sobrenadante	1.46 ± 0.05	1.98 ± 0.07	4.12 ± 0.10	1.89 ± 0.18	1.64 ± 0.24
Residuo sólido sin lavar	2.95 ± 0.05	10.29 ± 0.66	23.85 ± 0.04	1.14 ± 0.21	2.42 ± .07
Residuo sólido lavado	4.86 ± 0.05	7.07 ± 0.07	23.94 ± 0.68	2.54 ± 0.25	4.64 ± 0.11

(Resultados promedio n=3)

Un propósito de evaluar la concentración de cenizas en el análisis fue el poder observar y optimizar los métodos usados, tanto del proceso hidrolítico como del análisis de cuantificación, esto para poder disminuir en lo posible el error de peso que sin duda incrementaban las sales generadas, por lo cual con base en los resultados se determinó en qué punto se añadían más sales, y así poder optimizar la generación de sales manteniendo la concentración más baja posible.

El punto donde se agregan más sales es en la etapa de hidrólisis enzimática, ya que, debido al buffer necesario para la hidrólisis, así como a la neutralización del lodo ácido, y a las propias sales que lleva consigo la solución enzimática se incrementa notablemente la cantidad de minerales.

Afortunadamente gran parte de las sales queda en el sobrenadante debido a la solubilización de estas en la fase líquida de la solución; otra proporción que no es

despreciable queda retenida en la matriz. En este punto, es poco factible hacer un nuevo lavado ya que parte de la fibrilla que ya está desecha puede perderse en el trasvase y al ser un método gravimétrico el perder masa es crítico.

Considerando esto, bajar lo más posible el valor de sales que se adiciona, así como usar menores cantidades de hidróxido de sodio necesario para modificar el pH del lodo de hidrólisis, hace más sencillo el análisis debido a que la corrección por peso de cenizas no es tan drástica, teniendo así menos repercusión en el resultado final y con esto se puede estar seguro de que el valor alto que se espera si es lignina pura y no otra clase de compuestos.

Conclusiones.

Con base en los resultados y los objetivos planteados para el desarrollo de este tema de tesis, se puede concluir que el método seleccionado y utilizado, el cual es el método combinado de Fibra-Klason, que fue optimizado para la cuantificación de lignina en las muestras estudiadas, fue el que permitió una cuantificación fiable de las de las diversas matrices usadas; Con este método se obtuvieron resultados mayores al 80% de recuperación de lignina con una desviación estándar menor al 5%. Así mismo permite detectar, modificar y resolver diversas variables que pueden ser controladas, esto con la finalidad de tener un estudio más controlado y que responda a una mayor confiabilidad del resultado.

Además algo que es posible observar, es como la variación en las estructuras y composiciones de las matrices lignocelulósicas que fueron estudiadas afecta directamente el desarrollo de la experimentación, ya que a pesar de que son materiales con componentes macromoleculares similares, la diferencia entre las matrices propicia que la cuantificación así como las posibles interferencias que puedan presentar las mismas sea muy diversa repercutiendo en una diferente complejidad de análisis para cada matriz.

Otra parte que se puede relacionar teóricamente con lo observado en esta tesis es el hecho de que dependiendo del tipo de monolignoles que componen la estructura de la lignina en la matriz, esta presentará una diversa presencia de ramificaciones a la vez que un mayor contenido de entrelazamiento entre los monómeros, rigidez de las estructuras y conformación espacial. Esto repercute directamente a que, durante el análisis al momento de llevar a cabo la hidrólisis para provocar la ruptura de las estructuras circundantes, se presentó una dificultad mayor debido al entramado que forma con estas mismas estructuras, una razón que se puede asociar a ello, son las interacciones formadas en consecuencia a los enlaces covalentes, que en su mayoría al ser de tipo éter presentan una resistencia bastante mayor a la ruptura en comparación a los enlaces de la celulosa que son enlaces tipo éster; para esto se recomendaría realizar una caracterización con métodos instrumentales para asegurar el tipo de interferencia química debido a los enlaces que presenta cada estructura.

Debido a lo mencionado se necesita una variación de condiciones más drásticas de hidrólisis para poder realizar una adecuada separación de la estructura, esto en la práctica se traduce a temperaturas más altas, concentraciones de ácidos mayores que propicien condiciones más oxidantes, mezcla de distintos ácidos, variación de tipo de enzimas, así como sus condiciones de incubación. Sin embargo, esta modificación hay que realizarla con cautela para no afectar a la matriz modificándola de forma negativa, ya que se puede degradar, o modificar químicamente a una forma que no sea capaz de identificarse o que pueda contraponerse con las condiciones necesarias de las enzimas, cuyas condiciones óptimas son muy específicas.

Bibliografía.

- Antonio, R., Mendoza, M., y Heinze, T. (2002). Synthesis and characterization of graft copolymers from natural fibers. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 51, 661-674.
- Asina, F., Brzonova, I., Kozliak, E., Kubátová, A., y Ji, Y. (2017). Microbial treatment of industrial lignin: Successes, problems and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 77, 1179-1205.
- Balam, R.J., Duarte, S., y Canché, G. (2006). Obtención y caracterización de materiales compuestos de fibras de la “Piña” de henequén y polipropileno. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 5(1), 39-44.
- Barroso M. (2010). *Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería* (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica de Madrid. Madrid.
- Bauer, S., Sorek, H., Mitchell, V.D., Ibáñez, A.B., y Wemmer, D.E. (2012). Characterization of Miscanthus giganteus lignin isolated by ethanol Organosolv process under reflux condition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(33), 8203-8212.
- Bidlack, J., Malonge, M., y Benson, R. (1992). Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Oklahoma Academy of Science* 72, 51-56.

- Bledzki, A.K., y Gastan, J. (1999). Composites reinforced with cellulose based fibres. *Progress in Polymer Science*. 24(2), 221-274.

- Chávez-Sifontes, M., y Domine, M. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingenierías* 4(4), 15-46.

- El Mansouri N., (Septiembre de 2009). Uso de la lignina para el desarrollo de adhesivos usados en tableros de madera. En Sociedad Española de Ciencias Forestales. *5° Congreso Forestal Español*. Congreso llevado a cabo en Cataluña, España.

- Gellerstedt, G., y Henriksson, G. (2008). Lignins: Major sources, structure and properties. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. 1, 201-224.

- Hatakka, A. (2004). Biodegradation of lignin. *Biopolymers-Lignin, Humic Substances and Coal*. 1, 129-145.

- Holladay, J.E., Bozell, J.J., White, J.F. y Johnson, D.J. (Octubre de 2007). Volumen II: Results of screening for potential candidates from biorefinery lignin. En Department of Energy. *Top Value-Added Chemicals from Biomass*. EUA.

- Iñiguez-Covarrubias G., Lange, S., y Rowell, R. (2001). Utilization of byproducts from the tequila industry: part 1: agave bagasse as a raw material for animal feeding and fiberboard production. *Bioresource Technology*. 77, 25-32.

- Lagunes E., y Zavaleta E. (2016). Función de la Lignina en la Interacción Planta-Nematodos Endoparásitos Sedentarios. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 34(1), 43-63.
- Vishtal, A., y Kraslawski, A. (2011). Challenges in industrial applications of technical lignins. *BioResources*, 6(3), 3547-3568.

Anexo 1

El ejemplo del cálculo realizado para la obtención de resultados es:

- Proteína

$$\begin{aligned} \%Proteína &= \frac{mL \text{ gastados } HCl \text{ } 0.1N}{masa \text{ g mtra}} \times \frac{meq \text{ } HCl}{mL \text{ } HCl} \times \frac{meq \text{ } N}{meq \text{ } HCl} \times \frac{0.014 \text{ g } N}{1 \text{ meq } N} \times \frac{100 \text{ g } P}{16 \text{ g } N} \times 100 \\ &= \% \text{ de Proteína} \end{aligned}$$

- Cenizas

$$\%Cenizas = \frac{masa \text{ g cenizas}}{masa \text{ g muestra}} \times 100 = \% \text{ de cenizas}$$

- Lignina para las fibras iniciales

$$\begin{aligned} \% \text{ lignina} &= g \text{ lignina} \times \frac{100}{masa \text{ g de pared celular}} \times \frac{masa \text{ g de pared celular}}{100 \text{ g de fibra inicial}} \\ &= \% \text{ Lignina} \end{aligned}$$

- Lignina para el residuo después del proceso hidrolítico

$$\%Ligina = \frac{masa \text{ g lignina}}{masa \text{ g muestra}} \times 100 = \% \text{ de Lignina}$$