

Condiciones óptimas de deslignificación del aserrín de *Pinus patula* como etapa crucial en la obtención de bioetanol

Optimal conditions sawdust delignification of *Pinus patula* as crucial step in obtaining bioethanol

Rodrigo Andrés Sarria-Villa^{1*}
José Antonio Gallo-Corredor²
Ricardo Benítez-Benítez³

¹Colombiano. Ph.D. Universidad del Cauca. Popayán, Colombia. Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación. Grupo de Investigación en Química Analítica Ambiental (GIQA). *Autor de correspondencia: rodrigov@unicauca.edu.co.

²Colombiano. M.Sc. Universidad del Cauca. Popayán, Colombia. Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación. Grupo de Investigación en Química Analítica Ambiental (GIQA). E-mail: jagallo@unicauca.edu.co.

³Colombiano. Ph.D. Universidad del Cauca. Popayán, Colombia. Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación. E-mail: rbenitez@unicauca.edu.co.

Recibido: 17-03-2018 Aceptado: 27-08-2018

Resumen

El peso creciente del sector del transporte en la demanda de energía pone de manifiesto la necesidad de emprender acciones para mejorar la eficiencia y desarrollar alternativas energéticas. Una gran parte de los materiales con alto contenido en celulosa son susceptibles de ser utilizados como materia prima para la producción de biocarburantes, se generan como residuos en los procesos productivos de los sectores agrícola, forestal e industrial. El residuo utilizado en este caso proviene de la especie de *Pinus patula*. La deslignificación es una etapa crucial previa a la obtención de bioetanol, al permitir acceder a la celulosa y lograr su transformación. En este trabajo se estudiaron las mejores condiciones para lograr la deslignificación del aserrín de *Pinus patula* cultivado en el departamento del Cauca, alcanzando las mejores condiciones de deslignificación al emplear hidróxido de sodio al 12 %, un tiempo de reacción de 60 min y uso de malla 30 (600 µm), lo cual permitió obtener porcentajes de celulosa entre 63 y 72 % y porcentajes de muestra hidrolizada entre 10 y el 15 %.

Palabras clave: Aserrín; lignina; *pinus patula*; bioetanol; deslignificación; pretratamiento.

Abstract

The growing of the transport sector in demand for energy highlights the need to take action to improve efficiency and develop energy alternatives. Much of the materials with high cellulose content are likely to be used as raw material for the production of biofuels. They are generated as waste in productive processes of crops, forestry and industrial sectors. The residue used in this case comes from the species of *Pinus patula*. It is a prior delignification stage crucial to obtain bioethanol, by allowing access to the cellulose and achieve transformation. In this work we studied the best conditions to achieve the delignification of *Pinus patula* sawdust cultivated in the department of Cauca reaching the best conditions of delignification using 12 % sodium hydroxide, a reaction time of 60 min using 30 mesh (600 µm), which yielded percentages of cellulose between 63 and 72 % and rates of samples hydrolyzed between 10 and 15 %.

Keywords: Sawdust; lignin; *pinus patula*; bioethanol; delignification; pretreatment.

Cómo citar: Sarria-Villa, R. A., Gallo-Corredor, J. A., Benítez-Benítez, R. (2018). Condiciones óptimas de deslignificación del aserrín de *Pinus patula* como etapa crucial en la obtención de bioetanol. *Informador Técnico*, 82(2), 160-171. doi: <https://doi.org/10.23850/22565035.1401>

Introducción

La estrategia para la diversificación energética en el transporte contempla diferentes posibilidades al utilizar distintos tipos de producción de energía. Los biocarburantes son combustibles de origen vegetal que presentan características similares y pueden ser mezclados en baja proporción con los combustibles fósiles para ser empleados en motores de combustión convencionales. Además, no contienen azufre, uno de los principales causantes de la lluvia ácida (Negro *et al.*, 2000). Para la obtención de alcohol a partir de residuos lignocelulósicos se deben realizar tres procesos consecutivos tales como hidrólisis básica, hidrólisis enzimática y fermentación de los carbohidratos obtenidos.

La composición química de biomasa varía entre las especies, esta consta principalmente de celulosa, lignina y hemicelulosa. La mayoría de las especies contiene también aproximadamente 5 % de una tercera porción de fragmentos moleculares más pequeños llamados extractivos (Fengel y Wegener, 1989). La celulosa cristalina es la fracción mayoritaria de la biomasa lignocelulósica. Está compuesta de cadenas largas de moléculas de D- glucosa unidas por enlaces $\beta(1-4)$ que a su vez se agrupan en estructuras superiores de gran cristalinidad, lo que dificulta su hidrólisis y conversión a azúcares fermentables. La lignina es el segundo biopolímero más abundante de la naturaleza después de la celulosa y es un complejo formado por un polímero tridimensional de residuos de fenilpropano ligadas por enlaces éter y enlaces carbono-carbono, se encuentra alrededor de las microfibrillas de celulosa en un estado amorfo (Negro *et al.*, 2000). La hemicelulosa está formada por polímeros de azúcares de cinco átomos de carbono (principalmente xilosa). Esta fracción es fácilmente hidrolizable ya que no presenta estructura cristalina; sin embargo, la xilosa es un azúcar difícil de fermentar a etanol (Negro *et al.*, 2000).

El objetivo del pretratamiento de sustratos lignocelulósicos es lograr la descomposición de los componentes poliméricos y formar azúcares monoméricos y así incrementar la conversión enzimática de la fracción celulósica para aumentar la digestibilidad del material para bioconversión microbiana y enzimática y obtener un alto rendimiento de producción de etanol (Zilliox and Debeire, 1998). Por lo tanto, el pretratamiento es esencial para la remoción de la lignina, la reducción de la cristalinidad de la celulosa y el incremento de la porosidad del material.

Diferentes tipos de métodos de pretratamientos han sido investigados por varios investigadores tales como explosión a vapor, tratamiento con ácido sulfúrico diluido, tratamiento con álcali, dióxido de azufre, extracción con solvente orgánico, agua subcrítica y supercrítica, tratamiento biológico mediante el empleo de hongos, entre otros (Liu y Wyman, 2005). Estudios de pretratamientos ácidos se han realizado empleando ácido sulfúrico (Hsu, Guo, Chen, Hwang, 2010), ácido clorhídrico (Marcotullio y Krisanti, 2011), ácido fosfórico (Geddes *et al.*, 2010) y ácido nítrico (Zhang, Lu, Liu, Wang, y Zhang, 2011). En varios trabajos científicos se ha reportado que el pretratamiento ácido incrementa la hidrólisis de hemicelulosas y porciones de la celulosa amorfa y también incrementa la recuperación de monómeros de hemicelulosas en la fracción líquida y celulosa digestibles en la fracción sólida (Linde, Jakobsson, Galbe, y Zachhi, 2008; Sassner, Martensson, Galbe, y Zacchi, 2008; Yang y Wyman, 2008). El pretratamiento con ácido diluido (0,5 – 1,5 %, temperatura por encima de los 160 °C) ha demostrado ser un método más favorable para aplicaciones industriales al proporcionar porcentajes de rendimiento de azúcares como xylosa entre 75-90 % obtenidos a partir de hemicelulosas. Para el pretratamiento con álcalis normalmente se emplea el hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y el hidróxido de calcio. La hidrólisis alcalina normalmente involucra la saponificación de enlaces éster intermoleculares cruzados con el grupo xilano de las hemicelulosas y otros componentes y la porosidad de la biomasa lignocelulósica se incrementa con la remoción de los enlaces cruzados (Tarkov y Feist, 1969). La eficiencia de la hidrólisis alcalina depende del sustrato y de las condiciones del tratamiento, siendo este más efectivo en biomazas con bajo contenido de lignina como los residuos agrícolas. El hidróxido de sodio incrementa la superficie interna de la celulosa, decreciendo el grado de polimerización y cristalinidad y rompiendo la estructura de la lignina (Taherzadeh y Karimi, 2008). Autores han reportado que la realización de un pretratamiento oxidativo con cal al material vegetal de álamo a condiciones de 150 °C por 6 horas, remueve eficientemente el 77,5 % de la lignina presente en trozos de madera y también incrementa el rendimiento de obtención de glucosa (Chang, Nagwani, Kim, y Holtzaple, 2001).

En el departamento del Cauca existen más de 14.000 ha de bosques cultivados con coníferas y mirtáceas, ubicadas en los municipios de Popayán, Cajibío, Sotará y Timbío. La especie *Pinus patula* presenta un gran potencial de aprovechamiento forestal (Gallo, Sarria-Villa, y Palta, 2012; Gallo y Sarria, 2013). El pretratamiento de los materiales lignocelulósicos tiene

por objeto remover la barrera de lignina y modificar la estructura cristalina de la celulosa. Dentro de los pretratamientos, el más utilizado es el que se efectúa con hidróxido de sodio en diferentes condiciones (Sánchez y Clavijo, 1982; Camacho, Gonzales, Jiménez, y Moya, 1987). El pretratamiento busca facilitar el contacto entre el material celulósico y la enzima, para aumentar el área de contacto entre el sólido y la solución; romper el sello de lignina que rodea las moléculas de celulosa en la mayoría de los residuos celulósicos y disminuir el efecto de la orientación de las moléculas de celulosa (Mojica, Peñaloza, y Retamoso, 1984). La efectividad del álcali es atribuida a la disolución de las hemicelulosas y parte de la lignina, acompañado de un hinchamiento de la celulosa, saponificación de los enlaces éter intermoleculares y de una reducción del grado de polimerización de la celulosa. Con este método no se observan cambios en el grado de cristalinidad de la molécula de celulosa (Cunningham y López 1994).

Entre los compuestos de degradación de la lignina se encuentran el ácido *r*-cúmarico, el 4 – hidroxil – benzaldehído y el ácido ferúlico. Además de los compuestos mencionados anteriormente, durante la hidrólisis básica de la lignina también se forman catecol, vainillina, siringaldehído, ácido vanílinico y polímeros de bajo peso molecular, los cuales reaccionan produciendo entrecruzamiento y condensaciones, reduciendo la reactividad y valor de la lignina. Una vez que se produce la hidrólisis de la lignina, se realiza el proceso de hidrólisis, el cual puede ser enzimático o químico, con el fin de obtener oligosacáridos de cadenas cortas y glucosa (Sucklin, 1990). Una vez realizada la hidrólisis, se lleva a cabo el proceso de fermentación donde la glucosa es transformada en etanol y dióxido de carbono, obteniéndose una fermentación ideal con una conversión del 95 %, pero debido a la formación de algunos productos secundarios menores como propanol, butanol, metanol, glicerol y ácido láctico, entre otros, se obtiene una conversión del 94,5 % (Lima, 2000). Para una alta producción de bioetanol, es necesario llevar a cabo una hidrólisis de la lignina para obtener altos rendimientos de celulosa. La lignina influye en la accesibilidad a la celulosa. Algunos materiales vegetales que se emplean para la obtención de etanol, como los tallos de algodón, pueden llegar a tener hasta un 30,52 % de lignina (Shi, Sharma-Shivappa, Chinn, y Howell, 2009), la paja de arroz (10-15 %) (Zhang y Cai, 2008). El pretratamiento del material vegetal para eliminar la lignina puede aumentar la cantidad de celulosa en el proceso. El uso de licor de amonio para el tratamiento de pajas de soya ha permitido cantidades de celulosa de un 42,55 %, 6,97 % de hemicelulosa y 12,32 % de lignina. Por lo tanto, comparado con el contenido del material vegetal sin tratamiento, se da un incremento en la celulosa del 70,27 % y decrecimiento de hemicelulosa y lignina en un 41,45 % y 30,16 % respectivamente (Xu, Wnag, Jiang, Yang, y Ji, 2007; Moncada et al., 2016).

Materiales y métodos

Procesamiento de las muestras

Las muestras de aserrín de *Pinus patula* fueron sometidas a un análisis fisicoquímico para determinación de humedad, celulosa, hemicelulosa y lignina. Para efectuar el proceso de hidrólisis del material lignocelulósico se realizó un diseño experimental tipo factorial 2² variando la concentración de hidróxido de sodio (p/v) y el tiempo de hidrólisis (min). Los resultados fueron analizados empleando el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.

Tratamiento físico

Se obtuvieron las muestras de aserrín, utilizando una sierra eléctrica (manual Skill 3 ¼ HP), luego se pasaron por un molino eléctrico (Retsch – Germany SK100) y se tamizaron utilizando tamices malla 30 y 40. Las muestras se guardaron en un lugar seco para proceder con los análisis respectivos.

Análisis fisicoquímico

En el análisis fisicoquímico, inicialmente se determinó el porcentaje de humedad existente en las muestras de aserrín de *Pinus patula*.

Determinación de humedad de las muestras de aserrín

El porcentaje de humedad del aserrín de *Pinus patula* fue determinado por diferencia de peso. Se colocó una muestra de 1.000 g en la estufa (Fisher scientific isotemp oven) a 105 °C previamente molida y pasada por un tamiz de malla 30 hasta peso constante.

Determinación de hemicelulosa por el método neutro detergente y ácido detergente de Van Soest

En un segundo paso, con la utilización de los métodos neutro detergente y ácido detergente propuesto por Van Soest (Moncada, Cardona, Higuaita, Vélez, y López-Suarez, 2016) se determinó el contenido de hemicelulosa, para las respectivas muestras. Cada ensayo se efectuó por triplicado. Se utilizó un equipo de reflujo con balones de fondo plano de 500 mL y se preparó un litro de solución neutro detergente que contenía sulfato lauril sódico GR (Grado Reactivo). Ácido etilendiamino tetracético (EDTA) GR, borato de sodio decahidratado GR, fosfato disódico anhidro GR y éter etílico GR. Se pesaron 1.000 g de muestra molida y pasada por tamiz malla 30 y se depositaron en el balón, luego se agregaron 100 mL de solución neutro detergente, 1,6 mL de naftaleno y 0,500 g de sulfito de sodio. Se calentó y se mantuvo el reflujo por 60 min después de la ebullición. Luego se colocó la solución con la muestra suspendida en un embudo de porosidad gruesa y se filtró al vacío, se lavó con agua caliente y luego acetona. Los embudos con la muestra se secaron a 105 °C durante toda la noche y después de enfriarlos en desecador se pesaron para calcular el porcentaje de hemicelulosa (w1). Luego se preparó 1,0 L de solución ácido detergente que contenía ácido sulfúrico GR 1,0 N y 20,00 g de bromuro de cetil trimetil amonio GR. Para iniciar el procedimiento se pesaron 1.000 g de aserrín y se depositaron en un balón de 500 mL, se adicionó 100 mL de solución ácido detergente y 1,6 mL de naftaleno, después se reflujo por 60 min, luego se filtró a través de un embudo de porosidad gruesa previamente pesado y se lavó con agua caliente (90 – 100 °C) y luego con acetona. La muestra se secó a 105 °C en estufa, se enfrió en un desecador y se pesó (w2). La diferencia entre el contenido de fibra por el método de detergente neutro (w1), y detergente ácido (w2) es el porcentaje de hemicelulosa presente en la muestra. Las determinaciones de los dos componentes mayoritarios del aserrín se realizaron por separado, utilizando las metodologías implementadas en la industria papelera que a continuación se mencionan (ASTM, 1985).

Determinación de celulosa por el método de Kurscher y Hoffer

Se pesaron 1.000 g de aserrín seco tamizado por malla 40, se colocaron en un balón de 250 mL y se adicionó a esta muestra 20 mL de alcohol etílico al 95 % GA (Grado Analítico) y 5,0 mL de ácido nítrico concentrado GR. Se reflujo en un baño María por tiempo inferior a 1 hora, luego se decantó la solución sobre un embudo de porosidad gruesa previamente tarado, el procedimiento antes descrito se repitió una vez más y por último se llevó a cabo una tercera digestión con 100 mL de agua destilada durante 1 h. Cumplido este tiempo se filtró en un embudo de porosidad gruesa, previamente tarado y se lavó el residuo varias veces con agua destilada caliente, luego se lavó con una solución saturada de acetato de sodio y nuevamente con agua caliente. Se secó a 105 °C hasta peso constante y se registró el peso obtenido. Luego se calculó el porcentaje de celulosa en base seca.

Determinación del contenido de lignina por el método Klason

Se colocaron 1.000 g de aserrín seco, molido pasado por un tamiz malla 40, en un vaso de 50 mL y se adicionaron 15 mL de ácido sulfúrico GR frío al 72 %, macerando la muestra con una varilla de vidrio y mantenido el recipiente en un baño a 20 °C por dos horas, agitando regularmente. Al cabo de este tiempo se pasó el contenido del vaso a un balón de 1000 mL de fondo redondo con 575 mL de agua destilada hasta obtener una concentración de ácido sulfúrico al 3,0 %. Esta solución se mantuvo a reflujo por cuatro horas y se dejó en reposo para que se sedimente durante aproximadamente 12 h, luego se decantó el líquido sobrenadante sobre el embudo de porosidad gruesa (Kimax Brand 40-60 µm) previamente tarado, transfiriendo luego la lignina al embudo usando agua caliente hasta quitar completamente el ácido, posteriormente se secó a 105 °C, se enfrió en desecador y se pesó, para calcular finalmente el porcentaje de lignina en base seca.

Tratamiento de las muestras

Pretratamiento de las muestras de aserrín de *Pinus patula* con hidróxido de sodio (hidrólisis básica).

Para realizar la hidrólisis básica se pesaron 35.000 g de aserrín de la especie en estudio y se depositaron en un reactor de acero inoxidable grado 304 que tiene un volumen de 500 mL, se le adicionó 250 mL de hidróxido de sodio GR (Grado Reactivo); (se trabajó con tres concentraciones 9, 10 y 12 % p/v). El reactor fue conectado a una termocupla y se procedió al calentamiento hasta alcanzar una temperatura de $176\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ la cual se mantuvo durante 60 y 90 min. De este procedimiento se obtienen los licores negros, a los cuales se les determinó la cantidad de soda residual mediante un análisis volumétrico. El residuo sólido se lavó cuidadosamente con agua hasta neutralidad y se secó en estufa, los datos se reportan en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos para Hidrólisis Básica de aserrín de *Pinus patula*

| Muestra | W muestra inicial (g) | [NaOH] %p/v | Tiempo (min) | Soda Residual (mL) | W muestra final (g) | % de muestra hidrolizada |
|---------|-----------------------|--------------|--------------|--------------------|---------------------|--------------------------|
| m1-30 | 35,005 | 9,0 | 60 | 0,70 | 26,940 | 12,45±0,026 |
| m2-30 | 35,006 | 9,0 | 90 | 0,53 | 29,110 | 5,290±0,035 |
| m3-30 | 35,223 | 10 | 60 | 1,56 | 24,620 | 20,48±0,044 |
| m4-30 | 35,007 | 10 | 90 | 1,13 | 27,900 | 9,330±0,020 |
| m5-30 | 35,004 | 12 | 60 | 2,53 | 27,660 | 10,11±0,026 |
| m6-30 | 35,000 | 12 | 90 | 1,70 | 26,100 | 15,18±0,035 |
| m1-40 | 35,005 | 9,0 | 60 | 0,60 | 28,240 | 8,220±0,017 |
| m2-40 | 35,005 | 9,0 | 90 | 0,15 | 26,470 | 13,98±0,111 |
| m3-40 | 35,140 | 10 | 60 | 0,36 | 27,900 | 9,680±0,044 |
| m4-40 | 35,001 | 10 | 90 | 0,21 | 26,690 | 13,26±0,035 |
| m5-40 | 35,031 | 12 | 60 | 1,40 | 25,860 | 16,01±0,053 |
| m6-40 | 35,004 | 12 | 90 | 2,16 | 24200 | 21,35±0,035 |

Fuente: Los Autores

Determinación de soda residual en los licores negros

Se tomaron 10 mL de licor negro mediante una pipeta volumétrica y se depositaron en un erlenmeyer de 250 mL, se adicionó 50 mL de agua destilada y 10 mL de una solución de cloruro de bario al 10 %, luego se tituló la mezcla con ácido clorhídrico GR 0,25 N hasta un pH de 8,3 potenciométricamente y se reportó el volumen consumido de ácido para realizar los respectivos cálculos y establecer las concentraciones adecuadas de hidróxido de sodio durante la hidrólisis básica.

Determinación del número permanganato (Lignina residual)

Para la determinación de la efectividad de la hidrólisis básica, en cuanto al grado de deslignificación obtenido, se hizo la determinación del "Número Permanganato", para lo cual se tomaron 1.000 g de muestra tratada y se colocaron en un beaker de 600 mL, el cual contenía 200 mL de agua destilada y un agitador magnético. Mediante una plancha con agitación la muestra se mezcla y se verifica que no haya grumos. En un erlenmeyer de 250 mL se depositan 25 mL de permanganato de potasio GR 0,100 N y 25 mL de ácido sulfúrico 0,280 N, esta mezcla se adiciona al contenido del beaker y se coloca en marcha un cronómetro, inmediatamente se midieron 25 mL de sulfato ferroso amoniacal GR, 0,100 N depositándose en el mismo erlenmeyer que antes contenía las soluciones de ácido y permanganato, así mismo se midieron 100 mL de agua destilada en una probeta graduada. La reacción se suspendió a los tres (3) min agregando el contenido del erlenmeyer en el vaso, la agitación se suspendió a los 15 s. Luego se filtró en un embudo Buchner y el filtrado se tituló con una solución de permanganato de potasio 0,100 N hasta obtener una coloración violeta pálido. Se anotó el volumen gastado durante la titulación y con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de lignina residual en las muestras ya hidrolizadas.

Resultados y discusión

Todos los análisis que se realizaron para determinar los componentes del aserrín de la especie de *Pinus patula* en estudio se hicieron por triplicado. En la Tabla 2 se muestran los promedios de los datos obtenidos para humedad, celulosa, lignina y hemicelulosa. También se presentan estos valores para coníferas.

Tabla 2. Resultados del Análisis Bromatológico de aserrín

| Determinación (%) | <i>Pinus patula</i> | Conífera* ¹ |
|-------------------|---------------------|------------------------|
| Humedad | 12,10 ± 0,20 | - |
| Celulosa | 54,75 ± 0,15 | 40 – 45 |
| Lignina | 27,98 ± 0,11 | 25 – 30 |
| Hemicelulosa | 7,80 ± 0,10 | 20 |

*Díaz, 1986

Fuente: Los autores

Hidrólisis básica

Todas las determinaciones se hicieron por triplicado, teniendo un total de 36 muestras. Inmediatamente después de realizar la hidrólisis básica de todas las muestras se determinó la soda residual, o análisis de alcalinidad residual a los licores negros, con el fin de saber cuánto sodio reaccionó en el proceso. Las muestras fueron lavadas cuidadosamente con agua destilada hasta la neutralidad, luego se secaron en un horno para análisis posteriores. En la Figura 1 se muestra el reactor de acero inoxidable en el cual se llevó a cabo la hidrólisis básica, también una muestra de licor negro y aserrín después de la hidrólisis.



Figura 1. Reactor para la realización de la hidrólisis básica, licor negro y aserrín después de la hidrólisis.

Fuente: Los autores

Los datos reportados en la Tabla 1 muestran los resultados obtenidos después de la hidrólisis básica de las muestras de *Pinus patula* tamizadas por malla 30 y por malla 40. En los datos reportados en la Tabla 1, se puede apreciar que de las muestras tamizadas por malla 30, la que presenta mayor porcentaje de hidrólisis es la tratada con hidróxido de sodio al

10 %, pero en general se presenta un comportamiento poco secuencial. Se pudo observar que con malla 30, 10 % de hidróxido de sodio y 90 min se obtienen porcentajes de muestra hidrolizada más bajo que con un tiempo de 60 min. De igual forma se observa para malla 30, 9 % de hidróxido de sodio y 90 min, un porcentaje más alto a tiempos de 60 min. Lo contrario ocurre para malla 30, 12 % de hidróxido de sodio, donde se obtienen porcentajes más altos a tiempos de 90 min. Para malla 40, concentraciones de hidróxido de 9, 10 y 12 % se observan mayores rendimientos a tiempos altos de 90 min. Teniendo en cuenta estos resultados, se muestra que tamaños de partícula pequeños facilitan la hidrólisis a concentraciones intermedias y menores tiempos de reacción. (Singh, Shukla, Tiwari, y Srivastava, 2014). Se pudo observar una alta correlación (0,993) entre la concentración de hidróxido y el porcentaje de muestra hidrolizada a malla 30 y tiempo de 90 min. También se observó alta correlación (0,976) entre la concentración de hidróxido y el porcentaje de muestra hidrolizada a malla 40 y tiempo de 60 min. De esta tabla también se puede concluir que el porcentaje de hidrólisis para las muestras tamizadas por malla 40, aumenta a medida que aumenta la concentración de hidróxido de sodio y el tiempo de reacción. El porcentaje de muestra hidrolizada en el pretratamiento básico representa una fracción de la muestra que fue extraída, el cual consiste de carbohidratos solubles (pentosas, xilosas, etc.), resinas, lignina, hemicelulosa hidrolizada durante el pretratamiento y productos de degradación de la celulosa. Se estima que la celulosa no se hidrolizó en esta etapa, puesto que para lograrlo se necesitan condiciones más severas como son: temperatura por encima de los 180 °C y tiempo de reacción no menor de dos horas (Mojica *et al.*, 1984; Díaz, 1986). Un adecuado pretratamiento involucra el rompimiento de los enlaces de hidrógeno de la celulosa cristalina, la ruptura de la matriz hemicelulosa-lignina, y finalmente, un incremento de la porosidad y área superficial de la celulosa para la subsecuente hidrólisis enzimática (Mood *et al.*, 2013). Se pudo observar en los resultados de la Tabla 4, un incremento en el porcentaje promedio de celulosa del 8,67 al 10,23 % después de realizar el pretratamiento, al compararse con el contenido de celulosa reportado en la Tabla 1, lo cual indica que el pretratamiento usando la solución alcalina incrementa la disponibilidad de celulosa para una posterior hidrólisis. Para incrementar la digestibilidad de la celulosa se deben remover grandes cantidades de hemicelulosa debido a que la hemicelulosa cubre fibrillas de la celulosa limitando su disponibilidad para realizar una hidrólisis enzimática (Singh *et al.*, 2014).

La cantidad requerida para efectuar una buena deslignificación depende de la especie de la madera y de otros factores tales como la dimensión de la madera, pero está en el orden del 12 % (p/v) de solución de hidróxido de sodio, que es con la que en nuestro caso se logra un mayor grado de hidrólisis (McDonald, 1970; Saddler, Hogan, Chan, y Louis-Seize, 1982). De acuerdo con nuestros resultados respecto a los valores obtenidos de soda residual, se puede decir que en todos los casos siempre hay presencia de ella, pero no es adecuado trabajar con valores muy bajos, lo más apropiado es tener aproximadamente un 2 % de soda residual en un proceso como el realizado para la deslignificación del aserrín de la especie en estudio. Estudios del pretratamiento para especies como el Pino rojo han arrojado porcentajes de madera no tratada del 1,8 al 3,7 % (Zhu, Pan, Wang, y Gleisner, 2009). Además, es un parámetro a tener en cuenta en un proceso productivo, ya que sirve como control de consumo de reactivos e indica si existe una cantidad susceptible de recuperar (Alkasrawi, Galbe, y Zacchi, 2002; Dowe y McMillan 2000).

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza (ANOVA), realizado con ayuda del software Statgraphics Centurion XVI. El análisis de varianza se llevó a cabo para determinar la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental; de esta manera se obtienen los valores de los parámetros significativos en el proceso de hidrólisis básica del aserrín de *Pinus patula*.

Tabla 3. Análisis de varianza para la hidrólisis del aserrín de *Pinus patula*

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A:Concentracion | 14,2506 | 1 | 14,2506 | 0,68 | 0,5607 |
| B:Tiempo | 19,5027 | 1 | 19,5027 | 0,93 | 0,5111 |
| AA | 29,3356 | 1 | 29,3356 | 1,40 | 0,4464 |
| AB | 50,5145 | 1 | 50,5145 | 2,42 | 0,3640 |
| Error total | 20,9157 | 1 | 20,9157 | | |
| Total (corr.) | 137,833 | 5 | | | |

Fuente: Los autores

Los resultados estadísticos de ANOVA presentados en la Tabla 3 muestran que en el proceso de hidrólisis básica del aserrín de *Pinus patula* la concentración de hidróxido de sodio y el tiempo no muestran un efecto significativo en su rendimiento, debido a que ningún factor presenta un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0 %. El diagrama de Pareto, mostrado en la Figura 2, muestra que ni la concentración de hidróxido de sodio ni el tiempo de reacción influyen significativamente sobre el porcentaje de hidrólisis. Se puede observar en el diagrama de Pareto una influencia positiva de la concentración de hidróxido de sodio, lo que indica que a medida que aumenta la concentración mayor es el rendimiento del proceso de hidrólisis y una influencia negativa del tiempo de reacción, indicando que el rendimiento aumenta al disminuir el tiempo de reacción.

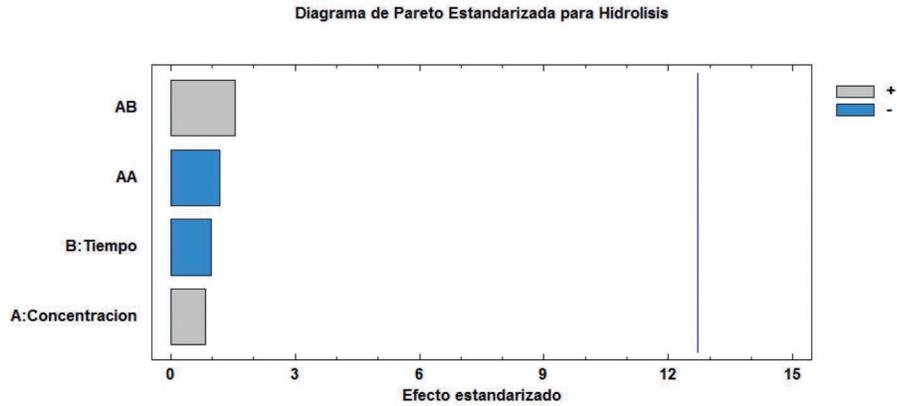


Figura 2. Diagrama de Pareto para el proceso de hidrólisis del aserrín de *Pinus patula*.
Fuente: Los autores

La Tabla 4 presenta la combinación de los valores de los factores, con la cual se maximiza el porcentaje de rendimiento de hidrólisis del aserrín de *Pinus patula* para alcanzar un rendimiento máximo del 18,07 %.

Tabla 4. Parámetros para una respuesta para maximizar el porcentaje de rendimiento de hidrólisis del aserrín de *Pinus patula*

| Factor | Bajo | Alto | Óptimo |
|---------------|------|------|---------|
| Concentración | 9,0 | 12,0 | 10,2766 |
| Tiempo | 60,0 | 90,0 | 60,0 |

Fuente: Los autores

El número permanganato es una medida que permite corroborar el grado de deslignificación logrado durante el proceso, debido a que determina el porcentaje de lignina residual. La lignina residual debe expresarse como el volumen en mililitros de permanganato de potasio para oxidar una cantidad equivalente de ella:

$$\# \text{KMnO}_4 \text{ (mL)} = \frac{V \times N \text{KMnO}_4}{0,1} + \frac{25 (N \text{KMnO}_4 - N \text{FAS})}{0,1} \quad (1)$$

En donde:

25 = Volumen de KMnO_4 y FAS adicionados a la mezcla de reacción

0,1 = Normalidad de las soluciones

V = Volumen de KMnO_4 gastado en la titulación.

N KMnO_4 = Normalidad del KMnO_4 .

N FAS = Normalidad del Sulfato ferroso amoniacal.

En la Tabla 5 se muestran los resultados de la determinación del número permanganato de las muestras de aserrín hidrolizadas con hidróxido de sodio. Se puede observar que el volumen gastado de permanganato de potasio en la titulación, corresponde al mismo número permanganato, esto se debe a que durante la realización de las pruebas se trabajó

con soluciones de concentraciones iguales y por lo tanto el segundo factor de la ecuación 1 es igual a cero. En general, se puede observar que los resultados del # KMnO_4 se encuentran entre 10 y 20 mL, lo que correspondería aproximadamente a un porcentaje de lignina residual entre el 2,5 % y 4,8 %, de acuerdo con la tabla de correlación entre diferentes números de grado de deslignificación y el porcentaje de lignina Klason presente (ASTM, 1985). Debido a los porcentajes bajos de lignina residual se puede concluir que el pretratamiento utilizado, en este caso, la hidrólisis básica, es adecuado para los fines que se busca conseguir, como son la deslignificación del aserrín para obtener un sustrato casi libre de lignina y una mayor superficie de contacto, para una posterior hidrólisis enzimática (Mood *et al.*, 2013., Singh *et al.*, 2014).

Tabla 5. Datos y resultados del # KMnO_4 para *Pinus patula*

| Muestra | W muestra (g) | [NaOH] % | Tiempo (min.) | V KMnO_4 (mL) | # KMnO_4 (mL) |
|---------|---------------|----------|---------------|------------------------|------------------------|
| m1-30 | 1.000 | 9,0 | 60 | 10,6 | 10,6 |
| m2-30 | 1.000 | 9,0 | 90 | 10,0 | 10,0 |
| m3-30 | 1.000 | 10 | 60 | 15,0 | 15,0 |
| m4-30 | 1.000 | 10 | 90 | 10,2 | 10,2 |
| m5-30 | 1.000 | 12 | 60 | 9,40 | 9,4 |
| m6-30 | 1.000 | 12 | 90 | 11,0 | 11,0 |
| m1-40 | 1.000 | 9,0 | 60 | 16,1 | 16,1 |
| m2-40 | 1.000 | 9,0 | 90 | 14,7 | 14,7 |
| m3-40 | 1.000 | 10 | 60 | 14,0 | 14,0 |
| m4-40 | 1.000 | 10 | 90 | 14,5 | 14,5 |
| m5-40 | 1.000 | 12 | 60 | 14,5 | 14,5 |
| m6-40 | 1.000 | 12 | 90 | 13,5 | 13,5 |

Fuente: Los autores

El contenido de celulosa presente en las muestras ya hidrolizadas, y que fue determinado tomando 1.000 g de aserrín digerido, permitió conocer el incremento en el porcentaje de celulosa en las muestras hidrolizadas. Los resultados de estos análisis se observan en la Tabla 6. Se pudo observar para las muestras de aserrín de *Pinus patula* que casi todos los tratamientos son apropiados para que haya una mayor disponibilidad del contenido de celulosa (Stenberg, Bollók, Réczey, Galbe, y Zacchi, 2000), obteniéndose los mejores resultados cuando las muestras se trataron con soluciones de hidróxido de sodio al 10 y 12 %, un tamaño de malla 30 y un tiempo de 60 min.

Tabla 6. Celulosa presente después del pretratamiento para *Pinus patula*

| Muestra | W muestra (g) | [NaOH] % | Tiempo (min) | % celulosa |
|---------|---------------|----------|--------------|------------|
| m1-30 | 1.000 | 9,0 | 60 | 55,98 |
| m2-30 | 1.000 | 9,0 | 90 | 60,92 |
| m3-30 | 1.000 | 10 | 60 | 70,38 |
| m4-30 | 1.000 | 10 | 90 | 66,38 |
| m5-30 | 1.000 | 12 | 60 | 63,62 |
| m6-30 | 1.000 | 12 | 90 | 72,58 |
| m1-40 | 1.000 | 9,0 | 60 | 59,08 |
| m2-40 | 1.000 | 9,0 | 90 | 63,18 |
| m3-40 | 1.000 | 10 | 60 | 66,08 |
| m4-40 | 1.000 | 10 | 90 | 62,44 |
| m5-40 | 1.000 | 12 | 60 | 61,10 |
| m6-40 | 1.000 | 12 | 90 | 68,63 |

Fuente: Los autores

Con los resultados reportados anteriormente se pudo establecer que las muestras de la especie *Pinus patula* más indicadas para ser sometidas a un ataque enzimático son las que se trataron con hidróxido de sodio con concentraciones del 10 y 12 % pero tamizadas por malla 30, debido a los mayores porcentajes de celulosa (Alegría y Muñoz, 2004).

Conclusiones

El pretratamiento básico es un procedimiento de vital aplicación para el aprovechamiento del material de interés (celulosa), ya que elimina gran parte de la lignina presente en un alto porcentaje en la especie objeto de estudio. En general el pretratamiento más favorable para la especie *P. patula* se obtuvo empleando hidróxido de sodio al 12 %. Entre los tiempos empleados se alcanzó una mayor deslignificación a 60 min y tamizaje por malla 30 (600 μm). Este pretratamiento permite obtener un mayor porcentaje de muestra hidrolizada y un mayor porcentaje de celulosa, con un alto rendimiento de hidrólisis y de obtención de bioetanol.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Colciencias, Smurfit Cartón de Colombia, Cootraforc y a la Universidad del Cauca por el apoyo brindado durante el desarrollo de esta investigación.

Referencias

- Alegría, F., y Muñoz, A. (2004). *Obtención de etanol a partir de aserrín de Pinus patula y Pinus oocarpa mediante hidrólisis básica y enzimática, y cuantificación por cromatografía de gases*. (Trabajo de grado). Universidad del Cauca, Colombia.
- Alkasrawi, M., Galbe, M., y Zacchi, G. (2002). Recirculation of process stream in fuel ethanol production from softwood based on simultaneous saccharification and fermentation. *Biochemistry and Biotechnology*, 98, 849-861. doi: <https://doi.org/10.1385/ABAB:98-100:1-9:849>
- ASTM International. (1985). *Standard Test Method for Acid-Insoluble Lignin in Wood (ASTM D-1106-84)*. Annual Book of standards. Vol. 04.09 Feb. (1985).
- Camacho, F., Gonzales, P., Jiménez, J. M., y Moya, M. (1987). Influencia de las condiciones de pretratamiento con NaOH sobre la eficacia de la hidrólisis enzimática de la paja de trigo. *Revista de agroquímica y tecnología de alimentos*, 27(2), 231-236.
- Chang, V.S., Nagwani, M., Kim, C.H., y Holtzapple, M.T. (2001). Oxidative lime pretreatment of high-lignin biomass: poplar wood and newspaper. *Applied biochemistry and biotechnology*, 94(1), 1-28. doi: <https://doi.org/10.1385/ABAB:94:1:01>
- Cunningham R. E. (Ed.) y López G. D. (Ed.). (1994). *Etanol de lignocelulósicos: tecnología y perspectivas*. Servicio de publicación e intercambio científico, Campus Universitario Santiago de Compostela.
- Díaz, A. (1986). *Ciencia de la madera*. Ciudad Habana, Cuba: Editorial ENPES.
- Dowe, N y McMillan, J. (2000). *SSF Experimental protocols: lignocelulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation*. National Renewable Energy Laboratory (NREL) Analytical Procedures.
- Fengel, D. y G. Wegener. (1989). *Wood, chemistry, ultrastructure, reactions*. Nueva York: Walter de Gruyter Ed. p: 90-115.

- Gallo, J. A., Sarria-Villa, R., y Palta, J. (2012). Comparación de la producción resinera de dos especies de pino cultivadas en el municipio de Cajibío. *Journal de Ciencia e Ingeniería*, 4(1), 37-42. Disponible en: <http://jci.uniautonomia.edu.co/>
- Gallo, J., Sarria-Villa, R. (2013). Obtención de colofonia y trementina a partir de la resina de pino de la especie patula y posterior evaluación de los parámetros de calidad. *Journal de Ciencia e Ingeniería*, 5(1), 88-91. Recuperado de : <http://jci.uniautonomia.edu.co/>
- Geddes, C.C., Peterson, J.J., Roslander, C., Zacchi, G., Mullinnix, M.T., Shanmugam, K.T., Ingram, L. O. (2010). Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. *Bioresource technology*, 101(6), 1851-1857. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.070>
- Hsu, T., Guo, G., Chen, W., y Hwang, W. (2010). Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresource technology*, 101(13), 4907-4913. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.009>
- Lima, S. (2000). *Mejoramiento al ciclo de recuperación de soda cáustica en el pulpeo de bagazo*. (Trabajo de grado). Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- Linde, M., Jakobsson, E. L., Galbe, M., y Zachhi, G. (2008). Steam pretreatment of dilute H₂SO₄ impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production. *Biomass and bioenergy*, 32(4), 326-332. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.09.013>
- Liu, C. G., y Wyman, C. E. (2005). Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresource technology*, 96(18), 1978-1985. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.012>
- Marcotullio, G., y Krisanti, E. (2011). Selective production of hemicellulose-derived carbohydrates from wheat straw using dilute HCl or FeCl₃ solutions under mild conditions. X-ray and thermo-gravimetric analysis of the solid residues. *Bioresource technology*, 102(10), 5917-5923. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.092>
- McDonald, R.G. (1970). *Pulp and paper manufacture*. Vol. II, Chap. 4. New York: McGraw-Hill.
- Mojica, H.M., Peñaloza, L.F., y Retamoso, C. (1984). Hidrólisis enzimática de residuos celulósicos. *Revista ION*, 8(1). 99-111.
- Moncada, J., Cardona, C. A., Higuaita, J. C., Vélez, J.J., y López-Suárez, F. E. (2016). Wood residue (*Pinus patula* bark) as an alternative feedstock for producing ethanol and furfural in Colombia: experimental, techno-economic and environmental assessments. *Chemical Engineering Science* 140, 309-318. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.10.027>
- Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M., y Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 27, 77-93. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>
- Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I., Oliva, J.M., Cabañas, A., Ballesteros, M. (2000). Producción de etanol-combustible a partir de biomasa lignocelulósica. *V Congreso nacional del medio ambiente*. Fundación CONAMA, Madrid, España. 7 p.
- Saddler, J.N., Hogan, C., Chan, M. H., y Louis-Seize, G. (1982). Ethanol fermentation of enzymatically Hydrolysed pretreated wood fractions using *Trichoderma cellulases*, *Zymomonas mobilis*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(12), 1311-1319. doi: <https://doi.org/10.1139/m82-196>

- Sánchez, C y Clavijo, O. (1982). *Estudio preliminar de la obtención de azúcares fermentables por ataque enzimático de residuos celulósicos*. (Trabajo de grado). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias, Bogotá, Colombia.
- Sassner, P., Martensson, C., Galbe, M., y Zacchi, G. (2008). Steam pretreatment of H₂SO₄-impregnated *Salix* for the production of bioethanol. *Bioresource Technology*, 99(1), 137-145. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.039>
- Shi, J., Sharma-Shivappa, R. R, Chinn, M., y Howell, N. (2009). Effect of microbial pretreatment on enzymatic hydrolysis and fermentation of cotton stalks for ethanol production. *Biomass and bioenergy*, 33(1), 88-96. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.04.016>
- Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., y Srivastava, M. (2014). A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 32, 713-728. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.051>
- Stenberg, K., Bollók, M., Réczey, K., Galbe, M., y Zacchi, G. (2000). Effect of Substrate and Cellulase Concentration on Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated Softwood for Ethanol Production. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(2), 204-210. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000420\)68:2<204::AID-BIT9>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000420)68:2<204::AID-BIT9>3.0.CO;2-4)
- Sucklin, J. (1990). *Enzyme Chemistry Impact and Applications*. Dordrecht: Springer Netherlands. doi: <https://doi.org/10.1007/978-94-009-1832-0>
- Taherzadeh, M. J., y Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International journal of molecular sciences*, 9(9), 1621-1651. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>
- Tarkov, H., y Feist, W.C. (1969). A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid ammonia. *Advances in Chemistry Series*, (95), 197. doi: <https://doi.org/10.1021/ba-1969-0095.ch012>
- Xu, Z., Wnag, Q., Jiang, Z., Yang, X., y Ji, Y. (2007). Enzymatic hydrolysis of pretreated soybean Straw. *Biomass and Bioenergy*, 31(2), 162-167. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2006.06.015>
- Yang, B., y Wyman, C. E. (2008). Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic Etanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy*, 2(1), 26-40. doi: <https://doi.org/10.1002/bbb.49>
- Zhang, Q., y Cai, W. (2008). Enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated rice straw by *Trichoderma reesei* ZM4-F3. *Biomass and Bioenergy*, 32(12), 1130-1135. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.02.006>
- Zhang, R., Lu, X. B., Liu, Y., Wang, X., y Zhang, S. H. (2011). Kinetic study of dilute nitric acid treatment of corn stover at relatively high temperature. *Chemical Engineering & Technology*, 34(3), 409-414. doi: <https://doi.org/10.1002/ceat.201000258>
- Zhu, J. Y., Pan, X. J., Wang, G. S., y Gleisner, R. (2009). Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. *Bioresource Technology*. 100, 2411-2418. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.057>
- Zilliox, C., y Debeire, P. (1998). Hydrolysis of wheat straw by a thermostable endoxylanase: adsorption and kinetic studies. *Enzyme and Microbial technology*, 22(1), 58-63. doi: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00105-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00105-1)