

Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica



Opción TI Tesis Profesional

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) DE LOS COMPONENTES ESTRUCTURALES CELULOSA Y HEMICELULOSA EN TULE (*Typha dominguensis*).

Que para obtener el título de:

Ingeniero Químico

Presenta:

Fabiola Lizeth Hernández Delgado 12070985

Asesor:

Dra. Minerva Ana María Zamudio Aguilar

	Nombre del documento: Formato para la autorización de impresión	Código: FR-G-ITCM-7.5.1-31
	Referencia a la Norma ISO 9001:2008 7.5.1	Revisión: 2
		Página 1 de 1



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Ciudad Madero

Cd. Madero, Tam. 13/Marzo/2018

ÁREA: DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA
QUÍMICA Y BIOQUÍMICA.
NO. OFICIO: T.031/18
ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE
IMPRESIÓN

C. FABIOLA LIZETH HERNANDEZ DELGADO
No. CTRL. 12070985
PRESENTE

De acuerdo al fallo emitido por el Jurado asignado para la revisión de su trabajo profesional, integrado por los siguientes catedráticos:

PRESIDENTE: DRA. MINERVA ANA MARÍA ZAMUDIO AGUILAR
SECRETARIO: DR. ERICK HEREDIA OLEA
VOCAL: ING. BEATRIZ IMELDA TIJERINA RAMOS
SUPLENTE: DRA. NANCY PATRICIA DÍAZ ZAVALA

Y considerando que llena todos los requisitos del reglamento de titulación en vigor del Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, doy a Usted autorización para que proceda a imprimir su trabajo profesional de la **Opción TI (TESIS).**

"EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) DE LOS COMPONENTES ESTRUCTURALES CELULOSA Y HEMICELULOSA EN TULE (*Typha domingensis*)"

Lo hago de su conocimiento para los efectos y fines correspondientes a su examen Profesional, esperando que el logro mismo sea congruente con sus deseos profesionales.

ATENTAMENTE

"POR MI PATRIA Y POR MI BIEN"

M.A. FRANCISCO RAFAEL ARTEAGA FANG.
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE
INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA.



c.c. Archivo
FRAF/dahb*



Ave. 1° de Mayo y Sor Juana I. de la Cruz Col. Los Mangos, C.P. 89440 Cd. Madero, Tam.
Tel. (833) 357 48 20. e-mail: itcm@itcm.edu.mx
www.itcm.edu.mx



Dedicatoria

A mis padres que me guiaron siempre por el buen camino, brindándome su apoyo y consejos, y en los momentos difíciles me alentaron a seguir adelante, anhelando siempre mi preparación, siendo ésta la más valiosa de las herencias. **H**oy se ven culminados sus esfuerzos y nuestros deseos.

Por todo ello, a ustedes y a dios, ¡**Gracias!**

Agradecimientos

Primeramente, quiero expresar mi agradecimiento al Instituto Tecnológico de Ciudad Madero y a todos los maestros que fueron parte de mi formación académica, en especial, a la Dra. Minerva Ana María Zamudio Aguilar directora del presente proyecto de investigación, por brindarme la oportunidad y compartir su conocimiento.

Agradezco al Dr. Erick Heredia Olea co-director del proyecto y a la Dra. Esther Pérez Carrillo del Tecnológico de Monterrey por el valioso apoyo brindado durante el desarrollo del proyecto.

Así también, extendo mi agradecimiento a las maestras revisoras del proyecto, Ing. Beatriz Imelda Tijerina Ramos, Dra. Nancy Patricia Díaz Zavala y M.C. Ma. Elena González.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio; Heron, Ángel, Moni, Rafa, Luis, Cesar, Carlos Trápala, Carlos Alberto, Heidi, Ana, Andrea, Laura y chicos de servicio social, sin duda alguna el trabajo fue más ameno gracias a su compañía.

Quiero agradecer a las personas que me han brindado su amistad incondicional y me han apoyado en todo momento, mis mejores amigas; Paola y Julieta, y mi mejor amigo Juan José.

Agradezco a Lili, mi jefa en la papelería donde he trabajado estos años, por su confianza y apoyo.

Por último y muy importante, quiero expresar mi infinito agradecimiento a mis padres; el Sr. Hexiquio y la Sra. Sodelva, y hermanos; Reyna y Manuel, por todo el gran apoyo que me brindaron, comprensión y paciencia. Agradezco también a mi cuñis y a mi sobrino hermoso.

Resumen

El objetivo principal de este trabajo de investigación fue la extracción de azúcares fermentables de la fase líquida (hemicelulosa) y fase sólida (celulosa) de la especie vegetal tule (*Typha dominguensis*) utilizando autohidrólisis e hidrólisis ácido-diluida y su cuantificación por espectroscopia UV, así también, la cuantificación de glucosa-xilosa y compuestos de degradación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los análisis realizados para la caracterización de la planta del tule fueron: porcentaje de humedad (T 257 cm-02), extraíbles con etanol (T 204 cm-07), extraíbles en agua caliente (T 207 cm-08), lignina Klason (T 222 om-06), holocelulosa (método Wise, 1946), α -celulosa (T 203 cm-09) y cenizas (T 203 om-07). Posteriormente se realizó el pretratamiento fisicoquímico, autohidrólisis, el cual se llevó a cabo en un reactor tipo batch con capacidad de 2 litros, con una relación sólido-líquido (1:14), tamaños de partícula de 2.5 cm, malla #14 o malla #40, temperaturas de 160 °C, 180 °C o 190 °C y tiempos de reacción de 40 y 60 minutos. Después del pretratamiento, se procedió con la hidrólisis ácida de la fase líquida la cual contuvo hemicelulosa; utilizando una autoclave a una presión de 2 atm (121 °C) por 20 minutos con H₂SO₄ concentrado equivalente al 4% en peso. La fase sólida conteniendo celulosa, fue sometida a una hidrólisis ácida en un reactor PARR tipo batch modelo 5100, con una solución al 1.2% de H₂SO₄ en una relación 1:10 sólido-líquido a 170°C por 20 minutos.

El mayor rendimiento de azúcares reductores totales (ART) de la planta tule fue 7.66% en autohidrólisis y 13.08% en hidrólisis ácida de la fase líquida. Las condiciones de autohidrólisis que favorecieron la extracción de azúcares en hidrólisis ácida de la fase líquida fueron un tamaño de partícula malla #14 a 180 °C por 40 minutos obteniendo 6.917 mg/mL de azúcares totales equivalentes a: 4.165 mg/mL de xilosa, 1.302 mg/mL de arabinosa, 0.955 mg/mL de galactosa, 0.476 mg/mL de glucosa y 0.019 mg/mL de celobiosa. La concentración de los compuestos de degradación obtenidos en la reacción anterior fueron 4.878 mg/mL equivalentes a: 4.453 mg/mL de ácido acético y 0.425 de 5-HMF. Por otro lado, las condiciones de autohidrólisis que favorecieron la extracción de azúcares en la hidrólisis ácida de la fase sólida del tule fueron un tamaño de partícula malla #40 a 180 °C por 40 minutos obteniendo 14.36 mg/mL de glucosa y 5.857 mg/mL de compuestos de degradación equivalentes a: 2.735 mg/mL de ácido acético, 2.111 mg/mL de 5-HMF y 0.911 mg/mL de furfural.

Contenido

	Página
Índice de tablas y figuras	ix
Introducción.....	xiii
Capítulo 1. Antecedentes.....	1
1.1. Tule (<i>Typha dominguensis</i>).....	1
1.1.1. Características generales	1
1.1.2. Identificación y descripción.....	2
1.2. Materiales lignocelulósicos.....	3
1.2.1. Celulosa.....	5
1.2.2. Hemicelulosa.....	6
1.2.3. Lignina	7
1.3. Normas y métodos para caracterización de materia prima.....	8
1.3.1. Preparación de la materia prima	9
1.3.2. Humedad	9
1.3.3. Extraíbles con etanol.....	10
1.3.4. Extraíbles en agua caliente.....	11
1.3.5. Lignina Klason.....	11
1.3.6. Holocelulosa	12
1.3.7. α -Celulosa	13
1.3.8. Cenizas.....	13
1.4. Clasificación y propiedades de los azúcares	14
1.5. Proceso para la obtención de azúcares	16
1.5.1. Autohidrólisis.....	16
1.5.2. Hidrólisis ácida	18

1.6. Formación de compuestos de degradación de azúcares	20
1.7. Cuantificación de azúcares reductores totales (ART) por espectrofotometría UV	21
1.7.1. Método DNS	21
1.8. Cuantificación de azúcares y compuestos de degradación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	23
Capítulo 2. Parte Experimental.....	25
2.1. Preparación de tule (<i>Typha dominguensis</i>)	25
2.2. Caracterización de tule (<i>Typha dominguensis</i>)	27
2.2.1. Humedad	28
2.2.2. Extraíbles con etanol	28
2.2.3. Extraíbles en agua caliente.....	29
2.2.4. Lignina Klason.....	30
2.2.5. Holocelulosa	30
2.2.6. α -Celulosa	31
2.2.7. Cenizas.....	34
2.3. Proceso para la obtención de azúcares en tule (<i>Typha dominguensis</i>)	34
2.4. Autohidrólisis	35
2.4.1. Diseño de experimentos.....	35
2.4.2. Autohidrólisis de tule.....	36
2.5. Hidrólisis ácida.....	38
2.5.1. Hidrólisis ácida de fase líquida	38
2.5.2. Hidrólisis ácida de fase sólida.....	39
2.6. Cuantificación de azúcares reductores totales (ART) por espectrofotometría UV.	41
2.6.1. Método DNS.	41
2.6.2. Curva de calibración para cuantificación de ART.	41

2.7. Cuantificación de azúcares y compuestos de degradación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	42
2.7.1. Preparación de muestras	42
2.7.2. Configuración del cromatógrafo líquido de alta eficiencia acoplado a un detector de índice de refracción (HPLC-IR).....	43
2.7.3. Curva de calibración	44
Capítulo 3. Resultados.....	46
3.1. Caracterización de tule (<i>Typha dominguensis</i>).....	46
3.1.1. Humedad	46
3.1.2. Extraíbles con etanol.....	46
3.1.3. Extraíbles en agua caliente.....	47
3.1.4. Lignina Klason.....	47
3.1.5. Holocelulosa	48
3.1.6. α -Celulosa	48
3.1.7. Cenizas.....	48
3.1.8. Composición química de Tule (<i>Typha dominguensis</i>).....	49
3.2. Autohidrólisis de tule (<i>Typha dominguensis</i>)	49
3.2.1. Cuantificación de Azúcares reductores totales (ART) de autohidrólisis	49
3.2.2. Cuantificación de azúcares de autohidrólisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	51
3.2.3. Cuantificación de compuestos de degradación en autohidrólisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	52
3.3. Hidrólisis ácida de la fase líquida.....	53
3.3.1. Cuantificación de Azúcares reductores totales (ART) de la hidrólisis ácida de la fase líquida.	53

3.3.2. Cuantificación de azúcares de la hidrólisis ácida de fase líquida por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	55
3.3.3. Cuantificación de compuestos de degradación en hidrólisis ácida de fase líquida por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	56
3.4. Hidrólisis ácida de fase sólida.....	57
3.4.1. Cuantificación de azúcares de la hidrólisis ácida de fase sólida por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	58
3.4.1.1. Materia con autohidrólisis	58
3.4.1.2. Materia sin autohidrólisis.....	59
3.4.2. Cuantificación de compuestos de degradación en hidrólisis ácida de fase sólida por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	60
3.4.2.1. Materia con pretratamiento.....	60
3.4.2.2. Materia sin pretratamiento.....	60
Capítulo 4. Conclusiones.....	61
Anexo A. Preparación del reactivo DNS.....	65
Anexo B. Curvas de calibración de glucosa para ART.	66
Anexo C. Especificaciones de la columna SP0810 y SH1011.	67
Bibliografía.....	68

Índice de tablas y figuras

Tablas	Página
Tabla 1.1 Clasificación taxonómica del tule.	2
Tabla 1.2 Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos.	4
Tabla 1.3 Normas y métodos para caracterización de materia prima.....	8
Tabla 1.4 Clasificación de monosacáridos basado en el número de carbonos.	15
Tabla 2.1 Diseño de experimentos para autohidrólisis.....	36

Tabla 2.2 Curva de calibración para ART en espectrofotómetro UV.	42
Tabla 2.3 Condiciones de operación del HPLC-IR para azúcares y compuestos de degradación.	43
Tabla 2.4 Curva de calibración para azúcares cuantificados en HPLC.....	45
Tabla 2.5 Curva de calibración para compuestos de degradación cuantificados en HPLC.	45
Tabla 3.1 Porcentaje de humedad de tule.	46
Tabla 3.2 Porcentaje de extraíbles en etanol de tule.....	47
Tabla 3.3 Porcentaje de extraíbles en agua caliente de tule.	47
Tabla 3.4 Porcentaje de lignina Klason de tule.	47
Tabla 3.5 Porcentaje de holocelulosa en tule.	48
Tabla 3.6 Porcentaje de α -celulosa en tule.	48
Tabla 3.7 Porcentaje de cenizas en tule.....	49
Tabla 3.9 Resultados de ART en licores de autohidrólisis de tule.....	50
Tabla 3.10 Resultados de azúcares en licores de autohidrólisis cuantificados por HPLC.	51
Tabla 3.11 Resultados de compuestos de degradación en licores de autohidrólisis cuantificados por HPLC.....	53
Tabla 3.12 Resultados de ART en licores hidrolizados de tule.....	54
Tabla 3.13 Resultados de azúcares en licores hidrolizados.....	55
Tabla 3.14 Resultados de compuestos de degradación en licores hidrolizados de tule cuantificados por HPLC.	57
Tabla 3.15 Resultados de azúcares en hidrólisis ácida de la fase sólida de tule con autohidrólisis analizados por HPLC.....	58
Tabla 3.16 Resultados de azúcares en hidrólisis ácida de la materia sin autohidrólisis.....	59
Tabla 3.17 Resultados de compuestos de degradación en hidrólisis ácida de la fase sólida con autohidrólisis analizados por HPLC.	60
Tabla 3.18 Resultados de compuestos de degradación en hidrólisis ácida de la materia sin autohidrólisis analizados por HPLC.	60

Figuras

Página

Figura 1.1 El tule (<i>Typha dominguensis</i>).	2
Figura 1.2 Distribución de tule en México.....	3

Figura 1.3 Estructura de la biomasa lignocelulósica.	4
Figura 1.4 Estructura molecular de la celulosa.....	5
Figura 1.5 Estructura química de la hemicelulosa.....	6
Figura 1.6 Estructura química de la lignina.....	8
Figura 1.7 Fórmulas generales de aldosa y cetosa de los monosacáridos.	15
Figura 1.9 Representación esquemática del efecto de los pretratamientos.	17
Figura 1.10 Formación de compuestos de degradación.	20
Figura 1.11 Reacción de reducción del reactivo DNS.	22
Figura 2.1 Tule en laguna “el conejo” en Altamira, Tamps.	25
Figura 2.2 Selección de <i>Typha dominguensis</i>	26
Figura 2.3 Triturador modelo 2031-SP de IMS Company.	26
Figura 2.4 Licuadora Oster modelo BRLY07-Z00.	27
Figura 2.5 Secuencia de análisis en la caracterización química de la planta tule.....	27
Figura 2.6 Determinación de porcentaje de humedad de la materia prima utilizada.	28
Figura 2.7 Procedimiento de extraíbles con etanol (Tappi T 204 cm-07).	29
Figura 2.8 Procedimiento de extraíbles en agua caliente (Tappi T 207 cm-08).....	30
Figura 2.9 Procedimiento de lignina Klason (Tappi T 222 om-06).	30
Figura 2.10 Procedimiento para determinación de holocelulosa.....	31
Figura 2.11 Proceso para la extracción de azúcares en tule.	35
Figura 2.12 Reactor PARR modelo 5100.....	37
Figura 2.13 Diagrama del proceso de la autohidrólisis del Reactor PARR modelo 5100.	37
Figura 2.14 Secado de la fase sólida obtenida de la autohidrólisis de tule.....	38
Figura 2.15 Sedimentación y filtración de fase líquida de la autohidrólisis de tule.....	38
Figura 2.16 Esquema visual del proceso de hidrólisis ácida de la fase líquida.	39
Figura 2.17 Reactor PARR tipo batch modelo 5100.	40
Figura 2.18 Esquema visual del proceso de hidrólisis ácida de la fase sólida del tule.....	40
Figura 2.19 Procedimiento de método DNS para la cuantificación de los azúcares reductores obtenidos de las fracciones hidrolizadas de tule.....	41
Figura 2.20 HPLC-IR Waters 1515/2414.....	42
Figura 2.21 Muestras en viales colocadas en el carrusel del HPLC Waters.	43
Figura 3.1 Porcentaje de rendimiento de ART en autohidrólisis de tule.....	50

Figura 3.2 Concentraciones de glucosa y xilosa obtenidas en autohidrólisis cuantificadas por HPLC.....	52
Figura 3.3 Porcentaje de rendimiento de ART en hidrólisis ácida de tule.	54
Figura 3.4 Concentraciones de glucosa y xilosa de los licores hidrolizados.....	56
Figura 3.5 Concentraciones de glucosa y xilosa obtenidas en hidrólisis ácida de la fase sólida con autohidrólisis.....	58
Figura 3.6 Concentraciones de glucosa y xilosa obtenidas en hidrólisis ácida de la materia sin autohidrólisis.	59

Introducción

El mundo encara el agotamiento progresivo de sus recursos energéticos basados mayoritariamente en combustibles no renovables. Al mismo tiempo, el consumo de energía aumenta a ritmos cada vez más crecientes (Sánchez y Cardona, 2005). Los combustibles fósiles representan arriba del 80% del abastecimiento energético total en el mundo (Álvarez y col., 2012). En nuestro país, específicamente en la Ciudad de México, cuatro millones de vehículos consumen aproximadamente 17.2 millones de litros de gasolina (Medina y col., 2011). Por otro lado, el consumo global de combustibles genera enormes cantidades de gases contaminantes que son liberados a la atmósfera (Niño y col., 2013). Debido a esto, aumentó la necesidad de disminuir la dependencia hacia el petróleo promoviendo fuentes alternas de energía renovable para la generación de combustibles en gran cantidad y que generen menos contaminación atmosférica como es el caso del etanol (Medina y col., 2011). La producción actual de bioetanol se basa en etanol a partir de almidón y jarabes azucarados (Niño y col., 2013), por lo que es necesaria la búsqueda y utilización de nuevas fuentes de recursos naturales renovables. Es aquí donde la biomasa lignocelulósica se revela como una importante fuente de recurso para la obtención de monosacáridos.

El uso de la biomasa vegetal no es reciente. Desde tiempos remotos las maderas se han empleado como materiales de construcción y, sufriendo una reacción química, también para proporcionar calor. Posteriormente, la celulosa se aprovechó para fabricar papel, y del aguarrás de la madera se obtuvieron adhesivos, saborizantes y fragancias. En la primera mitad del siglo XX se aplicó hidrólisis ácida sobre maderas para obtener azúcares simples y, con ellos, vía fermentativa, etanol que fue usado para accionar motores de combustión interna durante la Segunda Guerra Mundial. La crisis energética iniciada en 1973 renovó el interés por la conversión de la celulosa hasta etanol (Marwa, 2014).

La posibilidad de sintetizar este alcohol más rápidamente partiendo de recursos alimenticios tales como maíz, bagazo de la caña de azúcar o distintos tipos de cereales ha incrementado, en ciertos momentos y en ciertos lugares los precios de los alimentos, lo cual ha suscitado un gran debate social centrado en la necesidad de desligar la producción de

biocombustibles de aquellos materiales que tengan valor alimentario, para basarla en sustratos sin interés nutricional o, aún mejor, de naturaleza residual (Marwa, 2014), como lo son los residuos lignocelulósicos, en los cuales se han llevado un desarrollo tecnológico que permite utilizar casi cualquier tipo de biomasa como materia prima, incluyendo productos forestales, desechos de aserraderos, residuos de cosechas, pastizales, macro-algas, residuos vegetales, desechos domésticos e industriales (Rojas, 2011).

Los materiales lignocelulósicos se encuentran constituidos de tres componentes principales: celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa, es el principal polímero natural, compuesto por D-glucosa unida por enlaces glucosídicos β -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals intramoleculares (Cuervo y col., 2009). La hemicelulosa está constituida principalmente de azúcares, que pueden ser fácilmente obtenidos por medio de hidrólisis ácida (Marwa, 2014), sus grupos funcionales están compuestos por un grupo carbonilo en el primer carbono y grupos hidroxilo en otros carbonos (Egüés y col., 2012). Por su parte, la lignina es un polímero aromático que forma parte de los tejidos de sostén de los vegetales (Ramírez y col., 2012), su estructura está formada por compuestos fenólicos ramificados, entrecruzados y entrelazados con carbohidratos (Abreu Sherrer, 2013).

Un residuo lignocelulósico es el tule (*Typha dominguensis*), una planta acuática, herbácea, enraizada, emergente, perenne; posee un total de siete hojas, una altura promedio de 2.44 m y una densidad aproximada de 69 plantas/m². Esta crece en ambientes lénticos de agua dulce como lagos, presas, pantanos, zonas inundadas, y de ambientes lóticos como manantiales, zanjas y canales (Bonilla-Barbosa y Santamaría, 2012). En ocasiones sus poblaciones rebasan el 35% de la superficie del embalse, considerándose como una planta acuática invasora, ya que constituye un problema en los usos o explotación de los cuerpos de agua. Es considerada dentro de las 10 malezas acuáticas con mayor impacto económico a nivel mundial; las cuales generan en USA un gasto anual de 100 millones de dólares para su control (Martínez Leal, 2016).

A diferencia de los procesos que emplean granos de maíz o caña de azúcar, en los cuales la obtención de monosacáridos fermentables es relativamente sencilla (Vargas y Vecchietti, 2015), la conversión de biomasa lignocelulósica en etanol es difícil debido a la compleja estructura de la pared celular de las plantas. Se requiere un tratamiento previo para modificar la composición química y estructural de los residuos lignocelulósicos con el fin de facilitar la hidrólisis de los hidratos de carbono en azúcares fermentables (Niño y col., 2013). Esto se debe a que las microfibrilas de celulosa se encuentran impregnada en una matriz de hemicelulosa y lignina, actuando estos dos últimos como barreras protectoras de la celulosa. Para poder superar el obstáculo que suponen estos compuestos, es necesario descomponerlos al menos parcialmente (Vargas y Vecchietti, 2015).

El fraccionamiento de la biomasa se puede llevar a cabo mediante el uso de hidrólisis química catalizada, tratamientos físicos como las tecnologías de explosión de vapor y su combinación. Recientemente, tecnologías más amigables con el medio ambiente como el proceso de autohidrólisis, el cual utiliza agua como único reactivo, tiene como objetivo la solubilización de la hemicelulosa (Egüés y col., 2012). Se realiza con agua líquida a temperaturas cercanas a los 200°C, condición en la cual el agua presenta características ácidas (Vargas y Vecchietti, 2015). Esta operación favorece la exposición del sustrato a la segunda etapa del proceso, la hidrólisis, la cual puede ser ácida o enzimática (Rojas, 2011).

La hidrólisis ácida es un proceso de transformación en medio acuoso, que tiene por objetivo transformar las moléculas complejas en azúcares simples mediante reactivos químicos, durante esta reacción química, los ácidos empleados actúan como catalizadores, y transforman las cadenas de polisacáridos en sustancias más simples (Ramírez y col., 2012). Este tratamiento es el más desarrollado para la obtención de azúcares fermentables a partir de materiales lignocelulósicos, el cual fue estudiado intensamente durante la segunda guerra mundial (Vargas y Vecchietti, 2015). El tratamiento puede utilizar ácidos concentrados o diluidos, con altas temperaturas (≥ 180 °C) o bajas temperaturas (≤ 120 °C) durante tiempos cortos o prolongados de reacción (30 a 90 minutos) (Abreu Sherrer, 2013).

Sin embargo, cuando los materiales lignocelulósicos se someten a condiciones severas durante el pretratamiento se forman y/o liberan una amplia gama de compuestos tóxicos que inhiben a los microorganismos, derivados de la degradación de la lignina y de los azúcares, ya sean hemicelulósicos o celulósicos: las pentosas pueden ser degradadas a furfural y las hexosas a 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) (Rojas, 2011; Tomás Pejó, 2009). Como consecuencia de la solubilización de la lignina se generan un amplio rango de compuestos fenólicos, presentes en concentraciones más bajas que los anteriores debido a su menor solubilidad. Los ácidos generados son principalmente el ácido acético, producido a partir de los restos acetilo de las hemicelulosas, y el ácido fórmico, procedente de la degradación del furfural y 5-HMF (Tómas Pejó, 2009).

Los azúcares reductores de una muestra están compuestos por grupos carbonilos que pueden ser aldehídos o cetonas. La determinación de este tipo de azúcares se realiza mediante una reacción colorimétrica utilizando el método DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) en medio alcalino. El método del DNS permite identificar los grupos carbonilos en los azúcares por medio de la reducción y desplazamiento del grupo nitro de los extremos del DNS, dando como resultado la formación de un ácido (Granda Albuja, 2011). Su cuantificación se realiza por espectrofotometría la cual es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución (Abril Díaz y col., 2010).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es un método de separación que se basa en la distribución de los componentes de la muestra a analizar en dos fases inmiscibles, una fase estacionaria y otra móvil (Granda Albuja, 2011). Para la determinación de carbohidratos el sistema de HPLC debe ser acoplado a un detector de índice de refracción, este mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y el solvente que contiene la muestra (Foitzich Molina, 2013).

En este estudio se sientan las bases para futuras investigaciones que conlleven a optimizar el rendimiento de azúcares de la planta de tule y de esta manera, su existencia en un manto acuífero lejos de ser un posible problema se convertiría en oportunidades económicas para la región, mediante la elaboración de subproductos a partir de estos residuos lignocelulósicos,

como la producción de etanol de segunda generación, edulcorantes como xilitol, polimerización de la glucosa para la elaboración de plásticos tipo PET, obtención de nanocristales y nanofibras, la elaboración de papel artesanal y cartón, emplearlo como componente en la obtención de composta y la extracción de lignina para aplicaciones en industria.

Capítulo 1. Antecedentes

1.1. Tule (*Typha dominguensis*)

Los nombres comunes en español como se le conoce son espadaña, masa de agua, cola de gato, cola pecho, petalzimicua, vela de sabana. (Martínez, 1979).

Martínez (1979) también menciona los siguientes nombres comunes en idiomas indígenas de México; beecho, colabecho, peecho, cola-yaquema (lengua zapoteca, Oaxaca), puh (lengua maya, Yucatán).

1.1.1. Características generales

El tule (*Typha dominguensis*) es una planta acuática perenne del tipo emergente, originaria de América. Habita en muchos tipos de comunidades de humedales, incluyendo pantanos, huertos alimentados con agua subterránea, arbustos, lagos y estuarios, así como hábitats antropogénicos donde el suelo es inundado periódicamente (canales de riego, canales de riego, Recipientes de retención), las corrientes de agua dulce permiten que invada las marismas (Beare y Zedler, 1987). Crece sobre lodo orgánico fino y limo, turba y también arena y grava (Finlayson y col., 1983), así como sobre suelos alcalinos (Denny, 1985). Esta especie es ampliamente estudiada en humedales naturales y construidos para el tratamiento de diversos efluentes debido a su elevada resistencia a los contaminantes (Fediuc y col., 2005; Maine y col., 2009; Hegazy y col., 2011; Dordio y col., 2011; Mufarrege, 2012).

En la tabla 1.1 se resume la clasificación taxonómica más actual de esta planta acuática (Smith y Newman, 2001; Smith, 2000).

Tabla 1.1 Clasificación taxonómica del tule.

Reino:	Plantae
Subreino:	Viriplantae
División:	Tracheophy
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Poales
Familia:	Typhaceae
Género:	Typha
Especie:	T. dominguensis

1.1.2. Identificación y descripción.

El tule (*Typha dominguensis*) es una hierba acuática, enraizada, emergente, que llega a medir hasta 2.5 m de altura. Sus hojas generalmente igualando o excediendo la altura de las espigas hasta 1.5 m de largo y de 0.8 a 1.3 cm de ancho, la parte superior de las vainas atenuada hacia la lámina, generalmente asimétricas, pero algunas veces simétricas (figura 1.1). La inflorescencia es de color moreno claro, con una o más brácteas, sus espigas masculinas hasta de 42 cm de largo y 1.5 cm de ancho y en general separadas de las femeninas por 0.7 a 5 cm, y las espigas femeninas hasta de 48 cm de largo y 2 cm de diámetro. Fruto fusiforme, de 1 a 1.5 mm de largo (Rzedowski y Rzedowski, 2001).



Figura 1.1 El tule (*Typha dominguensis*).

En la figura 1.2 se presenta el mapa de la República Mexicana señalando la distribución de tule (*Typha domingensis*).



Figura 1.2 Distribución de tule en México.

1.2. Materiales lignocelulósicos.

La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas, esta biomasa producida por la fotosíntesis es la fuente de carbono renovable más prometedora para solucionar los problemas actuales de energía y materias primas. La producción mundial de la biomasa se estima sea de 146 billones de toneladas métricas que comprende en su mayoría el crecimiento de plantas silvestres y 10 a 50 billones en base seca, además en la misma referencia se describe que la biomasa está en cuarto lugar como fuente de energía y proporciona el 14% de la energía que el mundo necesita (Álvarez y col., 2012). Los materiales lignocelulósicos presentan estructuras complejas compuestas de lignina, hemicelulosa y celulosa, como se muestra en la figura 1.3 (Morales, 2015), siendo matrices resistentes al ataque microbiano debido a la interacción entre sus componentes y a la cristalinidad de la celulosa (Rojas, 2011).

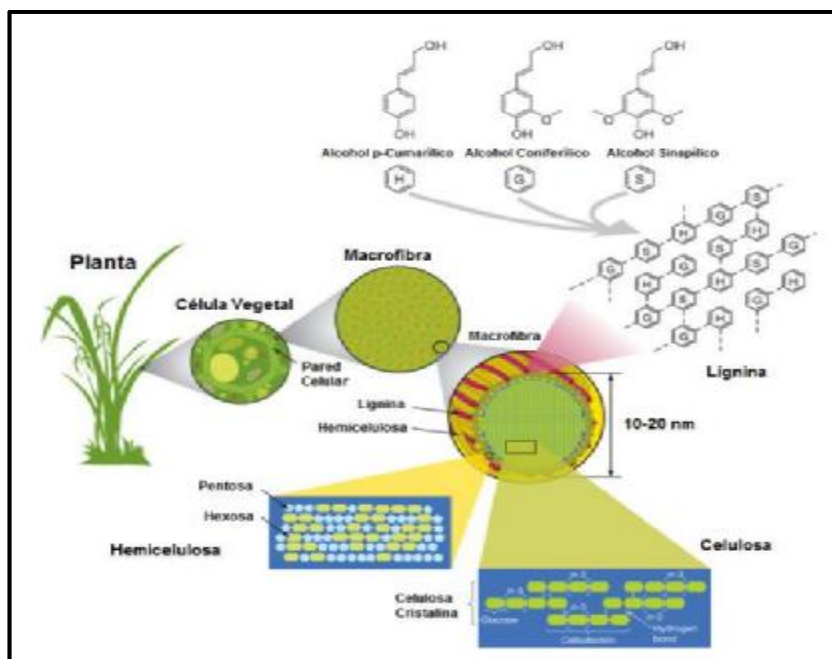


Figura 1.3 Estructura de la biomasa lignocelulósica.

La composición y porcentajes de los polímeros (celulosa, hemicelulosa y lignina) varían entre las especies de plantas, incluso entre la edad y la etapa de crecimiento (Jeffries, 1994) en la tabla 1.2 se muestra la composición de algunos materiales lignocelulósicos (Cuervo y col., 2009).

Tabla 1.2 Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos.

Material lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera suave	45-50	25-35	25-35
Cáscara de nuez	25-30	25-30	30-40
Olote de maíz	45	35	15
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15.20	80-85	0
Algodón	80-95	0	0
Papel periódico	40-55	25-40	18-30
Desecho de papel de pulpeos químicos	60-70	10-20	5-10
Desechos sólidos de aguas residuales	8-15	ND	24-29
Desechos animales (cerdos)	6	28	ND
Desechos sólidos de ganado	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
Hierba Bermuda	25	35.7	64
Pastos de crecimiento rápido	45	31.4	12
ND-No disponible			

1.2.1. Celulosa

La celulosa, es el principal polímero natural y constituye la fuente potencial más abundante de glucosa en la naturaleza (Herrera, 2005) presente en cantidades de 20-40% de la materia seca de todas las plantas superiores (Monteiro Machado, 2010). Sus cadenas se encuentran altamente ordenadas y rodeadas en una matriz por la hemicelulosa y la lignina (Ramírez y col., 2012).

La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos β -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals intramoleculares, como se muestra en la figura 1.4 (Chávez Fernández, 2015), formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Cuervo y col., 2009). Este carbohidrato tiene una estructura fibrosa con superficie suave y ocasionalmente protegido por una capa cerosa externa (Abreu Sherrer, 2013).

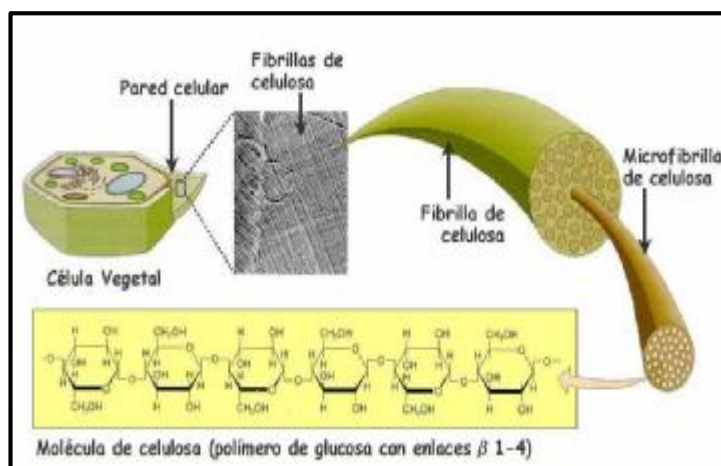


Figura 1.4 Estructura molecular de la celulosa.

Pese a la dificultad de utilizar mecanismos de reacción como la hidrólisis ácida, la celulosa se logra romper y obtener su monosacárido constituyente, en este caso la glucosa, en donde el ácido actúa como un catalizador, reacción química representada en la Ec. 1.1 (Herrera, 2005).



La celulosa es insoluble en agua, a pesar de contener grupos OH-. Esto último es debido a que aproximadamente un 70 % de la celulosa de las fibras naturales es cristalina, mientras que el 30 % restante, está formado de material muy hidrofílico (Herrera, 2005).

1.2.2. Hemicelulosa

Las hemicelulosas son polisacáridos de bajo peso molecular, está compuesta de una combinación de pentosas (xilosa y arabinosa) y/o hexosas (manosa, galactosa y glucosa), que están frecuentemente acetilados y enlazados hacia grupos tales como ácido urónico y el 4-o-metiléster (Hu y Ragauskas, 2012), véase figura 1.5 (Gomez Tovar, 2008). De modo que forma una estructura muy compleja y variable formando enlaces covalentes con la lignina y celulosa.

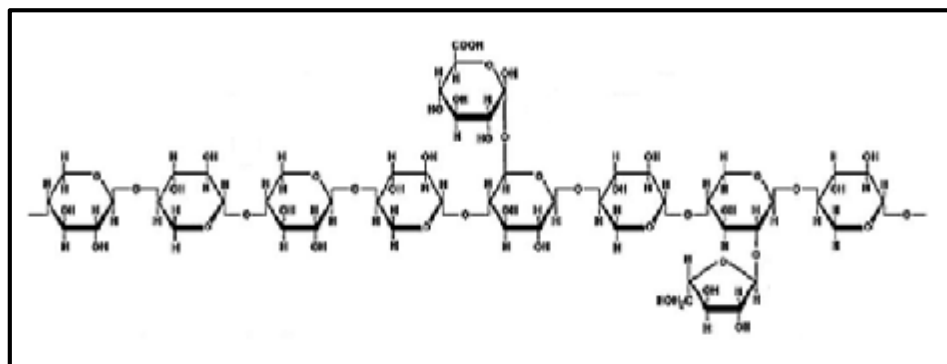


Figura 1.5 Estructura química de la hemicelulosa.

La hemicelulosa es amorfa e hidrofílica y actúa como soporte sobre la celulosa microfibrilar (Abreu Sherrer, 2013). Es mucho más fácil de hidrolizar que la celulosa debido a su estructura ramificada compuesta por diversos monosacáridos, los cuales son más susceptibles a separarse (Gomez Tovar, 2008). La reacción química que representa los productos que se obtienen de la hidrólisis de la hemicelulosa se muestra en la Ec. 1.2 (Herrera, 2005).



La hemicelulosa está presente en la pared celular de las plantas y en ella forma un gel acuoso en el cual están impregnadas las microfibrillas de celulosa. La corta extensión de las cadenas incrementa la solubilidad de las hemicelulosas y la posición expuesta de las mismas en la superficie de las microfibrillas explica porque este polímero está entre los primeros componentes de la pared celular atacados por los hongos causantes de pudrición. Así como la celulosa, la hemicelulosa es también una fuente importante de recurso para la obtención de azúcares fermentables para la producción de energía (Gomez Tovar, 2008).

1.2.3. Lignina

El término lignina deriva del latín *lignum*, que significa madera, y se define al material cementante presente entre las paredes celulares de los tejidos leñosos de los vegetales (Rojas, 2011). La lignina es un bio-polímero que se encuentra principalmente en la lámina media y las capas de la pared celular, de modo que protege a la celulosa y otros polisacáridos estructurales de ataques biológicos, presentando actividad anti-microbial y antifúngica (Abreu Sherrer, 2013).

La lignina es el polímero aromático renovable de origen natural más abundante en la naturaleza, representando una de las reservas más importantes de carbono orgánico junto con la celulosa y la hemicelulosa. Se estima que cada año se generan (gracias a la fotosíntesis) entre 1,011 y 1,012 toneladas. La lignina constituye entre un 15 y un 36% del contenido de los materiales lignocelulósicos (Rojas, 2011).

La importancia de la lignina en las plantas se debe principalmente a dos factores: a su contribución a la fuerza mecánica la cual es importante para el crecimiento de la planta, así como a la protección que brinda contra la degradación (Gomez Tovar, 2008). La lignina es un compuesto formado por diversas unidades de cadenas laterales de tres carbonos, es aromática, por lo tanto, su fórmula es diferente a las de las celulosas y hemicelulosas (Herrera, 2005). La figura 1.6 (Gomez Tovar, 2008) muestra la estructura formada por compuestos fenólicos ramificados, entrecruzados y entrelazados con carbohidratos (los enlaces covalentes con los

carbohidratos se efectúan a través de los grupos bencil-ésteres, bencil-éteres y fenil-glucosídicos presentes en la lignina), donde la esterificación principalmente se lleva a cabo con ácidos fenólicos (en pastos con p-ácido coumárico y en arbustos con p-ácido hidrobenzoico) (Abreu Sherrer, 2013). La lignina es resistente a la hidrólisis térmica, ya sea a concentraciones bajas o a altas de ácido; está más bien permanece como un residuo insoluble de la hidrólisis (Herrera, 2005).

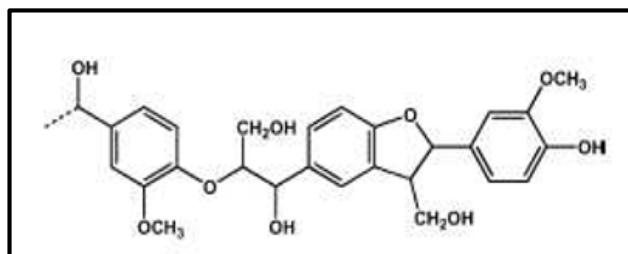


Figura 1.6 Estructura química de la lignina.

1.3. Normas y métodos para caracterización de materia prima

La Asociación Técnica de la Celulosa y el Papel TAPPI (“Technical Association of Pulp and Paper Industry”), crea normas y documentos de información técnica utilizada en la medición, evaluación y descripción de pulpa, papel y productos relacionados (<http://www.tappi.org/Standards-TIPs.aspx>). La tabla 1.3 menciona las normas TAPPI y métodos utilizados para la preparación y caracterización de la materia prima.

Tabla 1.3 Normas y métodos para caracterización de materia prima.

Método	Nombre
Preparación de la materia prima	T 257 cm-02
Porcentaje de humedad	T 412 om-06
Extraíbles con etanol	T 204 cm-07
Extraíbles en agua caliente	T 207 cm-08
Lignina Klason	T 222 om-06
Holocelulosa	Wise y col., 1946
α-Celulosa	T 203 cm-09
Cenizas	T 211 om-07

1.3.1. Preparación de la materia prima

Como preparación de la materia prima (tule) antes de llevarse a cabo los estudios se debe reducir a un tamaño de 2.5 cm, dejándolo secar a temperatura ambiente. Posteriormente se somete a una molienda y selección del material por tamizado de la fracción comprendida entre 0.25 y 0.40 mm, según establece la norma TAPPI T 257 cm-02. Las partículas mayores de 0.40 mm no son bien atacadas por los reactivos y las menores de 0.25 mm pueden ocasionar problemas en la filtración, y por lo tanto son rechazadas para los análisis.

1.3.2. Humedad

El propósito de la determinación de la humedad de la materia prima es trabajar siempre con gramos secos en el reactor, dicha determinación se llevó a cabo bajo la norma TAPPI T 412 om-06, la cual procede de la siguiente manera:

- § Pesaje de contenedores, para las pequeñas muestras, una boca ancha, de 65 mm de diámetro y 45 mm de altura. Para las muestras más grandes, use un metal hermético u otro recipiente hermético, preferiblemente equipado con una cesta de alambre extraíble, y de un tamaño tal como para dar cabida a los especímenes sin que hayan sido apretados.
- § Secado con horno, a temperatura constante, con medios para asegurar el control adecuado de la temperatura a 105 ± 2 ° C y el libre acceso de aire, lo que elimina únicamente el agua del material lignocelulósico y permite cuantificarla.
- § Equilibrio, precisión de 1 mg, para el pesaje de muestras de 2 g y menos; para los especímenes más grandes, con una precisión 0.05% del peso original de la muestra.

Los cálculos de porcentaje de humedad (H) se realizan mediante la siguiente ecuación:

$$\%H = \frac{PRMH-PRMS}{PRMH-PRS} (100) \quad (\text{Ec. 1.3})$$

Donde:

- § PRMH es el peso en gramos del recipiente seco con la muestra húmeda inicial
- § PRMS es el peso en gramos del recipiente con la muestra seca
- § PRS es el peso en gramos del recipiente seco

El porcentaje de sequedad (S) se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$\%S = 100 - H \quad (\text{Ec. 1.4})$$

Donde:

- § H es el porcentaje de humedad

1.3.3. Extraíbles con etanol

Los materiales lignocelulósicos contienen cierto tipo de compuestos (ceras, grasas, resinas, restos de fluidos biológicos, etc.) que pueden separarse mediante extracción al no estar formando parte de la estructura de la pared celular. Esos compuestos, denominados extractos, pueden inferir en los análisis que se realicen sobre el material lignocelulosico, por lo que es necesario separarlos previamente. Históricamente se utilizaban secuencias de disolventes de polaridad creciente (hexano, benceno, éter dietílico, acetato de etilo, etanol, agua e hidróxido sódico al 1%) pero se encontró que una extracción con etanol al 96% es igualmente efectiva y una alternativa al uso del benceno (Tappi T 204 cm-07).

Los extraíbles en etanol (EE) se calculan usando la siguiente ecuación:

$$\%EE = \frac{PRMS-PRS}{PMH(1-H)} (100) \quad (\text{Ec. 1.5})$$

Donde:

- § PRMS es el peso en gramos del balón conteniendo el residuo seco de los extractos (tras extracción, evaporación en rotavapor y secado en estufa).
- § PRS es el peso en gramos del balón seco.
- § PMH es el peso en gramos de la muestra húmeda inicial.
- § H es la humedad de la muestra.

1.3.4. Extraíbles en agua caliente

El agua caliente solubiliza o aumenta la solubilidad de sales minerales, almidón, proteínas, gomas, taninos, etc., y provoca la hidrólisis de ciertos polisacáridos a azúcares (Tappi T 207 cm-08).

Los extraíbles en agua caliente (EAC) se calculan con la siguiente ecuación:

$$\%EAC = \frac{PRMH - PRMS}{PRMH - PRS} (100) \quad (\text{Ec. 1.6})$$

Donde:

- § PRMH es el peso en gramos del recipiente seco con la muestra húmeda inicial
- § PRMS es el peso en gramos del recipiente con la muestra seca
- § PRS es el peso en gramos del recipiente seco

1.3.5. Lignina Klason

Para la caracterización química de un material lignocelulósico y de sus distintas fracciones se realiza la hidrólisis ácida cuantitativa (HAC), es un procedimiento que hidroliza los polisacáridos basándose en su similitud química. Consiste en dos etapas: la primera con H₂SO₄ al 72% que rompe los polisacáridos a oligómeros y la segunda etapa con el ácido al 4% que rompe con estos oligómeros a monómeros. Al finalizar la hidrólisis ácida queda un residuo

sólido denominado lignina de Klason, un polímero tridimensional compuesto de unidades de tipo fenólico, que es prácticamente insoluble en medio ácido. Este método está considerado actualmente el más adecuado para el análisis de los materiales lignocelulósicos y fue desarrollado inicialmente para maderas (Tappi T 222 om-06).

El porcentaje de lignina insoluble en ácido (LK) se calcula mediante siguiente la siguiente ecuación:

$$\%LK = \frac{PRMS-PRS}{PMH(1-H)}(100 - EE) \quad (\text{Ec. 1.7})$$

Donde:

- § PRMS es el peso en gramos del crisol con la muestra seca.
- § PRS es el peso en gramos del crisol seco.
- § PMH es el peso en gramos de la muestra húmeda inicial que se sometió a HAC.
- § H es la humedad de la muestra.
- § EE es el contenido en extractos.

1.3.6. Holocelulosa

La holocelulosa es un agregado heterogéneo de carbohidratos, compuesto por celulosa y hemicelulosa integrados a la pared celular en conjunto con la lignina (Guarnizo-Franco y col., 2012). La determinación se basa en la realización de sucesivos tratamientos con clorito sódico, a partir del cual se forma dióxido de cloro que ataca y disuelve la lignina permaneciendo inalterables los hidratos de carbono (Wise, 1946).

El porcentaje de holocelulosa (HC) se calculan con la siguiente ecuación:

$$\%HC = \frac{PRMS - PRS}{PMS}(100) \quad (\text{Ec. 1.8})$$

Donde:

- § PRMS es el peso en gramos del recipiente con la muestra seca.
- § PRS es el peso en gramos del recipiente seco.
- § PMS es el peso de la muestra seca.

1.3.7. α -Celulosa

El objetivo de este análisis es la determinación de la fracción de celulosa insoluble en bases fuertes (celulosa de cadena larga) bajo la normativa Tappi T 203 cm-09.

El porcentaje de α -celulosa (αC) se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\% \alpha C = \frac{PRMH - PRMS}{PRMH - PRS} (100) \quad (\text{Ec. 1.9})$$

Donde:

- § PRMH es el peso en gramos del recipiente seco con la muestra húmeda inicial
- § PRMS es el peso en gramos del recipiente con la muestra seca
- § PRS es el peso en gramos del recipiente seco

1.3.8. Cenizas

Los materiales lignocelulósicos contienen cenizas en cantidad variable que se determinan mediante incineración en un horno de mufla a 575 °C, calcinándose la materia orgánica (Tappi T 211 om-07).

El contenido de cenizas (C) en porcentaje, en base seca, se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\%C = \frac{PRC-PRS}{(PRMH-PRS)\left(1-\frac{H}{100}\right)} (100) \quad (\text{Ec. 1.10})$$

Donde:

- § PRC es el peso en gramos del recipiente con las cenizas.
- § PRS es el peso en gramos del recipiente seco.
- § PRMH es el peso en gramos del recipiente seco con la muestra húmeda inicial.
- § H es la humedad de la muestra.

1.4. Clasificación y propiedades de los azúcares

Los azúcares, glúcidos o carbohidratos, son químicamente hablando, aldehídos o cetonas polihidroxílicos, o productos derivados de ellos por oxidación, reducción, sustitución o polimerización. Los glúcidos desempeñan una gran variedad de funciones en los organismos, como una fuente energética o formando material estructural de las membranas, esto entre otras muchas funciones, por lo que se consideran moléculas extremadamente versátiles (M. Ramírez, 2007).

Los azúcares tienen la característica de ser solubles en agua y tener un sabor dulce. Pueden estar formados de 3 a 7 átomos de carbono, y se les llama monosacáridos; dos monosacáridos pueden unirse y perder una molécula de agua y formar un disacárido, cuando muchas moléculas se unen se forman polisacáridos. Los almidones son insolubles en agua y no tienen sabor dulce (Monge-Nájera y col., 2005). Los monosacáridos o azúcares sencillos son aldehídos o cetonas polihidroxilados, los monosacáridos con un grupo funcional aldehído se denominan aldosas y los que tienen un grupo cetona se denominan cetosas (figura 1.7). La fórmula general para un monosacárido es $C_n(H_2O)_n$. Los azúcares se clasifican también según el número de átomos de carbono que contienen, véase tabla 1.4.

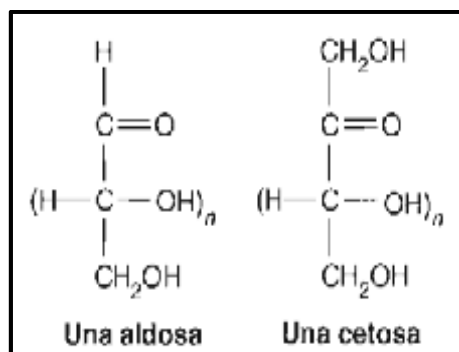


Figura 1.7 Fórmulas generales de aldosa y cetosa de los monosacáridos.

Tabla 1.4 Clasificación de monosacáridos basado en el número de carbonos.

N° de carbonos	Categoría	Formula	Ejemplos
4	Tetrosa		Eritrosa, Treosa
5	Pentosa	$ \begin{array}{cc} \begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} & \begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} \end{array} $ D-Xilosa D-Arabinosa	Arabinosa, Ribosa, Ribulosa, Xilosa, Xilulosa, Lixosa
6	Hexosa	$ \begin{array}{cc} \begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} & \begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} \end{array} $ D-Glucosa D-Manosa	Alosa, Altrosa, Fructosa, Galactosa, Glucosa, Gulosa, Idosa, Manosa, Sorbosa, Talosa, Tagatosa
7	Heptosa		Sedoheptulosa, Manoheptulosa

La celobiosa es un azúcar doble (disacárido) formado por dos glucosas unidas por los grupos hidroxilo del carbono 1 en posición beta de una glucosa y del carbono 4 de la otra glucosa. Por ello este compuesto también se llama beta-D-glucopiranosil(1-4) beta-D-glucopiranososa. La celobiosa aparece en la hidrólisis de la celulosa, su fórmula es $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$. Ya que no se encuentra libre en la naturaleza, se obtiene por acetólisis de celulosa pura con anhídrido acético en presencia de ácido sulfúrico concentrado. Es una sustancia incolora, cristalina, soluble en agua y posee las propiedades convencionales de los disacáridos reductores (Orellan Nava, 2017).

1.5. Proceso para la obtención de azúcares

Se han establecidos diferentes métodos de pretratamientos para poder liberar los azúcares presentes en los materiales lignocelulósicos. Estos incluyen métodos físicos, químicos y biológicos, los que presentan eficiencia variada de acuerdo con la composición de la biomasa. Pero presentan diferentes variables que facilitan los procesos de hidrólisis sin importar el tipo de material que se pretenda hidrolizar, dentro de las cuales se propone como primer paso cortar o moler el material lignocelulósico hasta obtener partículas finas de aproximadamente <0.001 m de tamaño, lo cual produce no solo rotura de las células, sino también reduce la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa, facilitando de esta forma su degradación a monómeros. Con respecto a los métodos de hidrólisis química, la hidrólisis ácida es la más empleada en procesos industriales, no obstante, presenta un rendimiento relativamente bajo y alta formación de productos tóxicos cuando se trabaja con ácidos concentrados, por lo que es recomendable trabajar con ácidos diluidos para bajar los costos finales del proceso (León y col., 2015).

1.5.1. Autohidrólisis

El complejo polimérico está hecho de una matriz de celulignina ligada por cadenas de hemicelulosa. Esta matriz debe ser rota de modo a reducir el grado de cristalinidad de la celulosa y aumentar la celulosa amorfa, que es más accesible al ataque enzimático (Monteiro Machado, 2010).

El término “pretratamiento”, figura 1.9 (Mosier y col., 2005), se refiere a un conjunto de transformaciones que tienen como objetivo modificar ciertas características del material para que las etapas hidrolíticas posteriores sucedan de la mejor manera posible (Marwa, 2014).

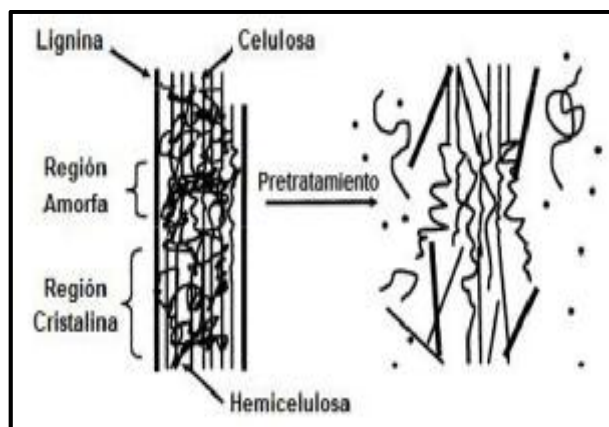


Figura 1.8 Representación esquemática del efecto de los pretratamientos.

Entre los pretratamientos físicoquímicos, el uso de agua líquida a alta temperatura (160–220 °C) ha mostrado ser una alternativa interesante para producir la solubilización completa de las hemicelulosas con una baja alteración de las fracciones de celulosa y lignina. Este pretratamiento también se denomina “hidrotérmico”. La hidrólisis de la hemicelulosa se produce como consecuencia de la liberación al medio acuoso de compuestos químicos de carácter ácido (ácido urónico y ácido acético) procedentes de radicales ácidos (grupos uronatos y acetilo) existentes en las cadenas de hemicelulosa. Existe una generación endógena de ácidos que ayuda a la hidrólisis del polisacárido, característica típica de las reacciones autocatalíticas. Por ello, a este pretratamiento también se le denomina “autohidrólisis”, ya que a alta temperatura el agua da lugar a gran cantidad de iones hidronio, lo que favorece su carácter ácido, por ejemplo: a 220 °C el pH del agua pura es de 5,5 (Marwa, 2014). Para este pretratamiento la celulosa amorfa es más reactiva que la celulosa cristalina, porque la temperatura mínima requerida para la ruptura de los enlaces glucosídicos sobre la celulosa amorfa es de 150 °C, mientras que para la porción cristalina es de 180 °C (Abreu Sherrer, 2013).

El pretratamiento con agua a alta temperatura es una interesante alternativa para la transformación de la biomasa vegetal por las siguientes razones:

§ No se necesitan productos químicos distintos al agua.

- § Es un pretratamiento medioambientalmente poco agresivo en el que no existen graves problemas de corrosión de los equipos ni de neutralización de hidrolizados.
- § Las hemicelulosas pueden ser solubilizadas con facilidad en condiciones en las que existen bajas degradaciones de monosacáridos y reducida presencia de inhibidores fermentativos.
- § Las pequeñas alteraciones físicoquímicas experimentadas por la estructura de la celulosa y la lignina generan un residuo sólido rico en lignina y celulosa que, posteriormente, puede volver a fraccionarse. La eliminación de la fracción de hemicelulosas mejoraría la hidrólisis enzimática de la celulosa pretratada.

Debido a que los niveles del pH son cercanos a la neutralidad, los problemas de corrosión se reducen, y los pasos del reciclaje y la eliminación de ácido no son necesarios. Esto reduce tanto los costos en capital, como los costos operativos, con consecuencias beneficiosas para el medio ambiente en comparación con otras tecnologías hidrolíticas (Rojas, 2011). Sin embargo, el tratamiento hidrotérmico presenta inconvenientes, siendo uno de los principales el hecho de que las hemicelulosas se hidrolicen formando, principalmente, oligosacáridos. Estos productos no pueden ser metabolizados directamente por microorganismos, por lo que habría que proceder a su posterior hidrólisis (ácida o enzimática) para obtener sustratos de fermentación (Marwa, 2014).

1.5.2. Hidrólisis ácida

La hidrólisis es un proceso de transformación en medio acuoso de las moléculas complejas en azúcares simples mediante reactivos químicos, durante esta reacción química los ácidos empleados actúan como catalizadores y transforman las cadenas de polisacáridos en sustancias más simples. En ellos se producen modificaciones de la composición de los materiales biomásicos (Ramírez y col., 2012). A nivel industrial los procesos de hidrólisis ácida pueden agruparse, en función de la concentración de ácido; hidrólisis con ácido concentrado o hidrólisis con ácido diluido.

- § Hidrólisis con ácido concentrado: los procesos que trabajan con ácidos concentrados operan a bajas temperaturas, pudiendo obtenerse altos rendimientos de hidrólisis (superiores al 90%) en la transformación de celulosa a D-glucosa. A pesar de esto, los procesos no son rentables debido al alto coste del ácido y de la posterior etapa de neutralización de los hidrolizados, así como a los intensos efectos corrosivos de los medios que obligan a construir reactores con materiales especiales y caros. Hay que indicar que, en los últimos años, los procesos que utilizan ácidos concentrados han adquirido un renovado interés debido a nuevos métodos que mejoran la economía de recuperación de los ácidos y que han sido desarrollados por varias compañías como Masada Resource Group (Birmingham, Ala), Arkenol (Mission Viejo, California) y APACE (Australia) (Marwa, 2014).
- § Hidrólisis con ácido diluido: la principal ventaja que se tiene es el relativo bajo consumo de ácidos, sin embargo, se deben emplear altas temperaturas para alcanzar rendimientos aceptables de conversión. En la hidrólisis con ácido diluido, se obtiene una fracción líquida que contiene principalmente xilosa (alrededor de un 50 a un 70% de peso en peso). De acuerdo con la literatura existen diversos estudios relacionados con el aprovechamiento de varios residuos agroindustriales para la obtención de xilosa por medio de un tratamiento con ácido diluido. Investigadores en el campo de la hidrólisis establecen condiciones similares de proceso, porque en la mayoría de los casos se utiliza como catalizador HCl o H₂SO₄ en concentraciones que varían entre el 2 y el 6% v/v y en un rango de temperatura entre 100-128 °C. Estas condiciones aceleran la producción de los azúcares hemicelulósicos por la relativa alta energía de activación en la fase sólido-líquido del medio de reacción. Sin embargo, a altas temperaturas parte de la xilosa obtenida puede ser degradada rápidamente y la celulosa de la región amorfa puede producir glucosa (Ramírez y col., 2012).

1.6. Formación de compuestos de degradación de azúcares

Durante el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos se forman y/o liberan una amplia gama de compuestos que inhiben a los microorganismos, figura 1.10, (Rojas, 2011). La formación de compuestos de degradación depende tanto de la composición de la biomasa tratada, como de las condiciones utilizadas en el pretratamiento, como temperatura, presión, tiempo, pH y adición de catalizadores (Monteiro Machado, 2010). Estos compuestos limitan el uso eficiente de los hidrolizados para la producción de diversos productos por fermentación (Rojas, 2011).

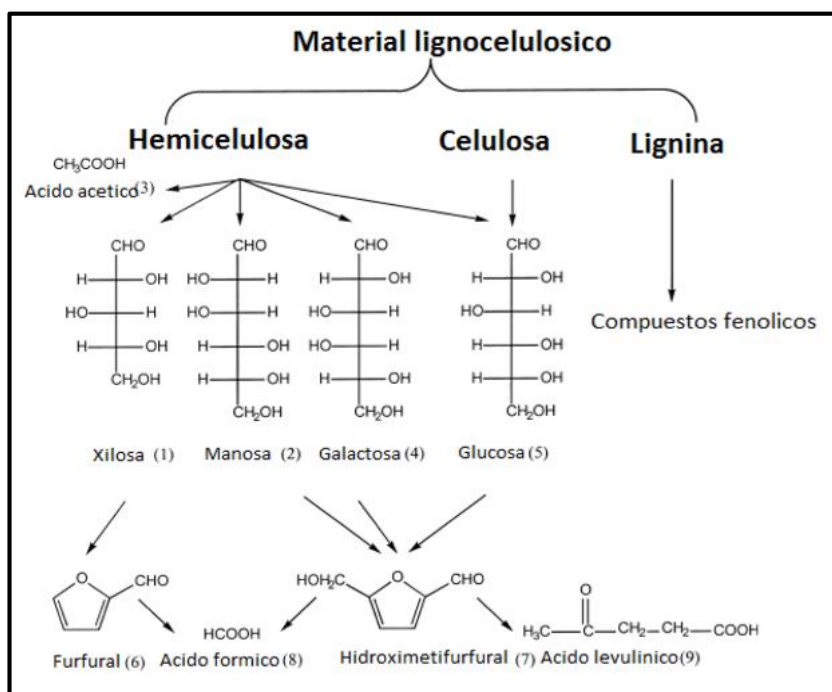


Figura 1.9 Formación de compuestos de degradación.

Con base en su origen los compuestos de degradación se dividen en tres grandes grupos: productos de la degradación de azúcares, productos de la degradación de lignina y compuestos derivados de la estructura lignocelulósica (Monteiro Machado, 2010).

§ Productos de la degradación de azúcares: durante la hidrólisis ácida las pentosas pueden ser degradadas a furfural y las hexosas a 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). Ácidos

hidroxicarboxílicos como ácido glicólico y ácido láctico son formados por la degradación de los carbohidratos en condiciones alcalinas (Monteiro Machado, 2010).

- § Productos de la degradación de lignina: una gran variedad de compuestos (aromáticos, poliaromáticos, fenólicos y aldehídicos) es liberada de la lignina durante la hidrólisis de materiales lignocelulósicos. Los compuestos fenólicos poseen un efecto inhibitorio considerable en la fermentación de hidrolizados lignocelulósicos, siendo más tóxicos que el furfural y el 5-HMF (Monteiro Machado, 2010).
- § Compuestos derivados de la estructura lignocelulósica: principalmente el ácido acético, producido a partir de los restos acetilo de las hemicelulosas que son liberados en el hidrolizado durante el proceso hidrolítico (Tómas Pejó, 2009).

1.7. Cuantificación de azúcares reductores totales (ART) por espectrofotometría UV

La espectrofotometría es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración (Abril Díaz y col., 2010). La región visible cubre diferentes longitudes de onda, entre 400 nm a 800 nm el rango que va desde la región ultravioleta hasta la región infrarroja. En este rango se miden compuestos coloreados (Granda Albuja, 2011). Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma (Abril Díaz y col., 2010).

1.7.1. Método DNS

Los azúcares reductores de una muestra están compuestos por grupos carbonilos que pueden ser aldehídos o cetonas. La determinación de este tipo de azúcares se realiza mediante

una reacción colorimétrica utilizando el método DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) en medio alcalino (Granda Albuja, 2011).

Según el método Miller (1959), los azúcares reductores pueden reducir al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) bajo determinadas condiciones. El método del DNS permite identificar los grupos carbonilos en los azúcares por medio de la reducción y desplazamiento del grupo nitro de los extremos del DNS, dando como resultado la formación de un ácido.

El reactivo DNS está formado por tres componentes principales:

- § Ácido dinitrosalicílico (ácido 2 hidroxí – 3,5 dinitrobenzoico), el cual actúa como oxidante en la reacción.
- § La Sal de Rochelle (tartrato sódico y potásico), el cual impide la disolución de oxígeno en el reactivo.
- § Hidróxido de sodio, hace el medio alcalino que es apropiado para que se produzca la reacción redox.

La reacción del DNS consiste en que el ácido 3,5-dinitrosalicílico se reduzca en presencia del grupo reductor de la glucosa (carbonilo) formando el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, mientras que el grupo aldehído reductor se oxida, para formar un grupo carboxílico (Granda Albuja, 2011), desarrollando un cambio de color parecido al café-rojizo, véase figura 1.11 (Tena y Jorrín, 2008). La intensidad de color es directamente proporcional a la cantidad de azúcares reductores que contengan las muestras.

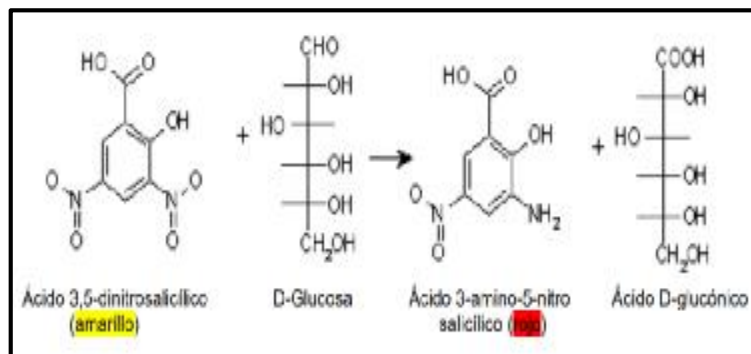


Figura 1.10 Reacción de reducción del reactivo DNS.

El cambio de coloración puede determinarse midiendo la densidad óptica, leídas por espectrofotometría a una determinada longitud de onda. La concentración de los azúcares reductores totales liberados en la muestra se determina haciendo una interpolación con una curva patrón del azúcar utilizado, graficando la absorbancia en función de la concentración (Ávila y col., 2012).

1.8. Cuantificación de azúcares y compuestos de degradación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

De los métodos de análisis que actualmente se utilizan para separación, identificación y cuantificación de azúcares, se destacan la cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y en menor medida, electroforesis capilar (CE). Debido a que los azúcares son altamente polares, muy hidrofílicos y muy poco volátiles, antes de ser analizados por métodos de cromatografía de gas, los carbohidratos deben ser convertidos en sus derivados volátiles estables, como derivados trimetilsilil o acetato, lo que lo hace un método complejo. Sin embargo la determinación de carbohidratos por HPLC es un método sencillo que no requiere derivatizar los azúcares para su identificación (Foitzich Molina, 2013).

La cromatografía en general es un método de separación que se basa en la distribución de los componentes de la muestra a analizar en dos fases inmiscibles, una fase estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la fase móvil corresponde a un líquido, el cual fluye a través de la fase fija que está contenida en la columna (Granda Albuja, 2011).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica analítica de separación ampliamente utilizada dada su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies y, sobre todo, su aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, así como en muchos campos de la ciencia y la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides,

plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies órgano-metálicas y una variedad de sustancias inorgánicas (Foitzich Molina, 2013).

Se utilizan diversos detectores acoplados a los métodos cromatográficos, los detectores de índice de refracción (IR), detector de ultra violeta/visible (UV/Vis), detector de fluorescencia y detección de la dispersión de luz por evaporación (ELSD), son los detectores más comúnmente usados para HPLC. Para la determinación de carbohidratos el sistema de cromatografía líquida de alta resolución debe ser acoplado a un detector de índice de refracción, este mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y el solvente que contiene la muestra. Es un detector universal, ya que es altamente improbable que el índice de refracción del soluto sea similar al del solvente. Como inconveniente tiene la desventaja de ser muy poco sensible, esto limita su campo de aplicación y es muy afectado por cambios de temperatura. No se puede utilizar con programación de solventes porque el cambio de la composición de la fase móvil se acompaña del cambio de su índice de refracción, como consecuencia no se estabiliza la línea base. Existen tres tipos diferentes de detectores de Índice de Refracción: Fresnel, Deflexión e Interferométrico (Foitzich Molina, 2013).

Capítulo 2. Parte Experimental

Para llevar a cabo el presente proyecto para la obtención de azúcares se utilizó el tule (*Typha dominguensis*) como materia prima, realizando como primer paso la preparación de la materia y su caracterización. Posteriormente se realizó la autohidrólisis e hidrólisis ácida, cuantificando azúcares reductores totales (ART) por espectrofotometría UV utilizando el método DNS y la cuantificación de azúcares (glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa y celobiosa) y compuestos de degradación (ácido acético, furfural y 5-HMF) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

2.1. Preparación de tule (*Typha dominguensis*)

La especie de tule (*Typha dominguensis*) utilizada como materia prima en la presente investigación, fue recolectada de la laguna “El conejo” (figura 2.1), ubicado al sur de Tamaulipas en el municipio de Altamira con las coordenadas 22°25'13.5"N - 97°52'51.6"W.



Figura 2.1 Tule en laguna “el conejo” en Altamira, Tamps.

La planta de tule se cortó, seleccionada en tres partes: alta, baja y media (figura 2.2). Se utilizó la parte media, misma que fue secada a temperatura ambiente por 24 horas de manera que la humedad excesiva fue eliminada naturalmente, posteriormente se realiza la reducción

de tamaño a 2.5 cm, siguiendo la técnica y procedimiento indicado en la norma Tappi T 257 cm-02.

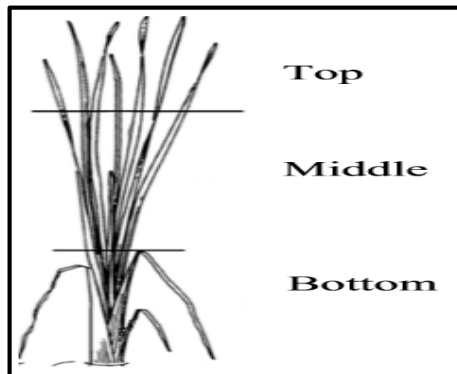


Figura 2.2 Selección de *Typha domingensis*.

La materia prima de tule cortado a un tamaño de 2.5 cm, se pasó por un triturador modelo 2031-SP de IMS Company (figura 2.3), el cual redujo la partícula a un tamaño de 5 mm, debido que no se logró el tamaño de partícula deseado con esta primera trituración, la materia se sometió a una reducción de tamaño a malla #14 (1.41 mm) y malla #40 (0.420 mm), utilizando una licuadora de marca Oster modelo BRLY07-Z00 (figura 2.4).



Figura 2.3 Triturador modelo 2031-SP de IMS Company.



Figura 2.4 Licuadora Oster modelo BRLY07-Z00.

2.2. Caracterización de tule (*Typha dominguensis*)

La serie de análisis químicos y el orden seguido en su realización se muestran en la figura 2.5, señalando la norma internacional o método experimental utilizado para cada determinación.

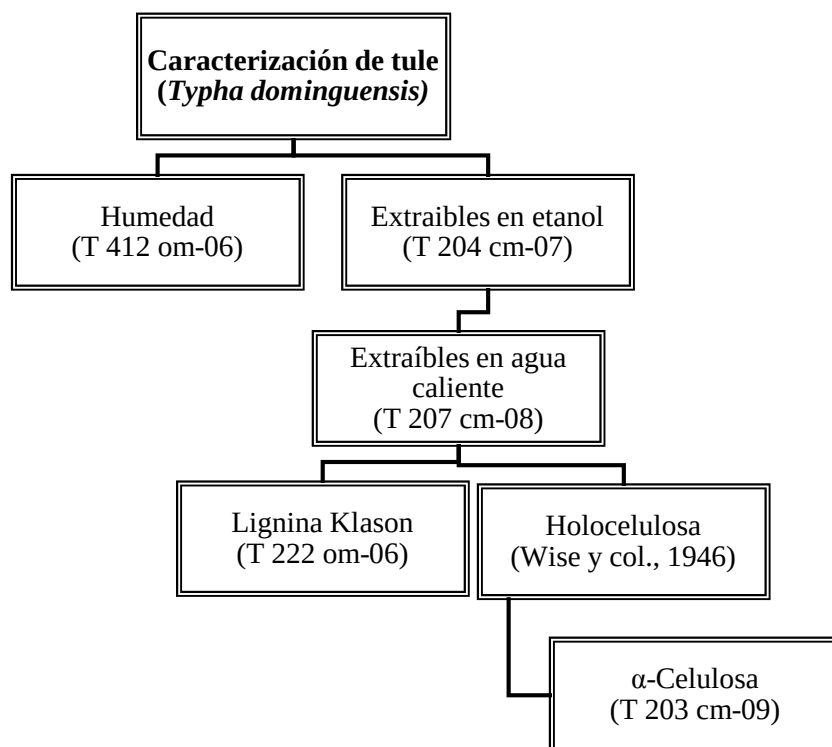


Figura 2.5 Secuencia de análisis en la caracterización química de la planta tule.

2.2.1. Humedad

Esta metodología se basa en las especificaciones de la norma TAPPI T 412 om-06.

La determinación de porcentaje de humedad del material vegetal (lignocelulósico) se llevó a peso constante vasos de precipitado para eliminar la humedad contenida en estos, colocándolos en la estufa a 105° C por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo se colocaron en un desecador y después de 20 – 30 min se pesan en una balanza analítica y se agregan 1 a 3 g de materia prima (figura 2.6).



Figura 2.6 Determinación de porcentaje de humedad de la materia prima utilizada.

Los vasos de precipitado con muestra fueron llevados nuevamente a la estufa a 105° C durante 24 horas, para eliminar el agua presente de la materia, una vez transcurrido el tiempo, la muestra fue llevada al desecador por 20 - 30 minutos, registrando el peso del vaso ya con muestra seca.

2.2.2. Extraíbles con etanol

Para su cuantificación se realizó una extracción tipo Soxhlet con etanol, siguiendo la normativa Tappi T 204 cm-07. El procedimiento que se llevó a cabo se describe en el esquema de la figura 2.7.

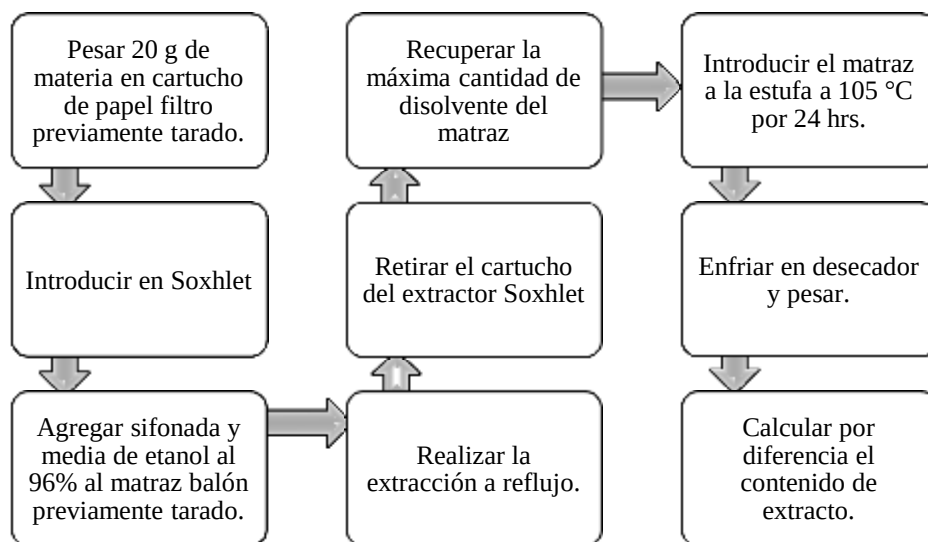


Figura 2.7 Procedimiento de extraíbles con etanol (Tappi T 204 cm-07).

Se realizaron extracciones hasta no apreciar coloración en el sifón, no debiendo sobrepasar las 6 horas de ensayo.

2.2.3. Extraíbles en agua caliente

El procedimiento utilizado para la extracción y cuantificación de extraíbles en agua caliente siguiendo la normativa Tappi T 207 cm-08 se muestra en la figura 2.8.

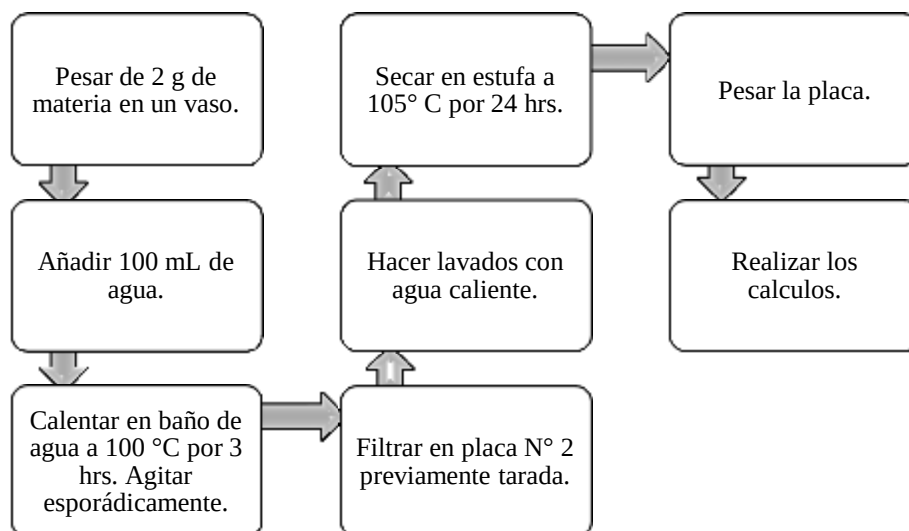


Figura 2.8 Procedimiento de extraíbles en agua caliente (Tappi T 207 cm-08).

2.2.4. Lignina Klason

La metodología para la extracción y cuantificación de lignina se presenta en la figura 2.9, basada en la norma Tappi T 222 om-06.

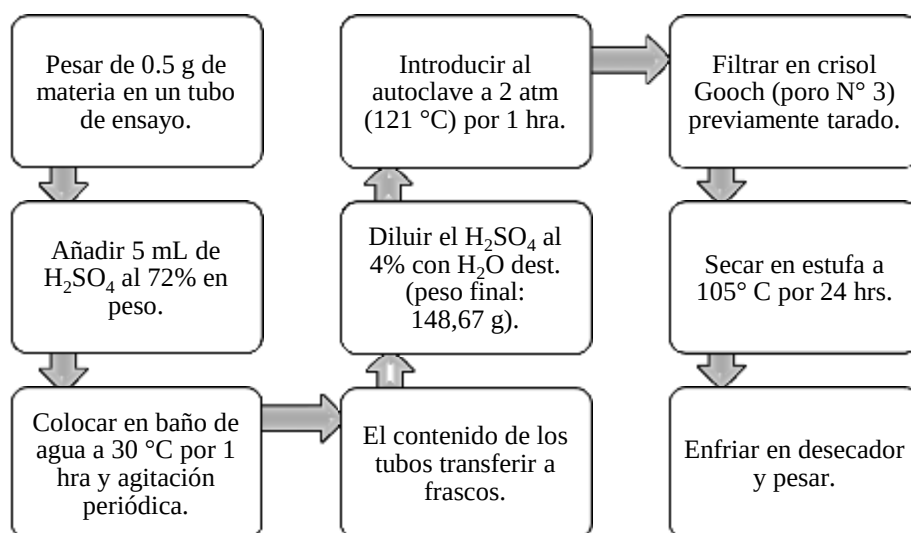


Figura 2.9 Procedimiento de lignina Klason (Tappi T 222 om-06).

2.2.5. Holocelulosa

Los residuos lignocelulósicos están constituidos principalmente por holocelulosa, corresponde a más del 50% del peso seco de la biomasa. La holocelulosa es un agregado heterogéneo de carbohidratos, compuesto por celulosa y hemicelulosa integrados a la pared celular en conjunto con la lignina (Guarnizo-Franco y col., 2012).

El procedimiento para la determinación de holocelulosa descrito en el método de Wise (1946) se resume en la figura 2.10.

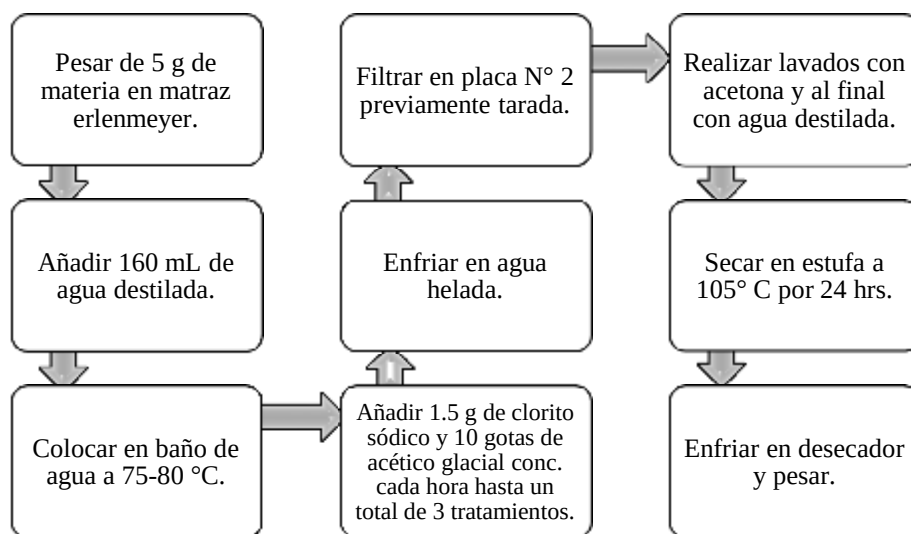


Figura 2.10 Procedimiento para determinación de holocelulosa.

2.2.6. α -Celulosa

Para determinar el contenido de α -celulosa se pesaron 3 ± 0.001 g de la materia en un vaso de precipitado y se colocó en un baño de agua a 20 °C. Se agregaron 75 mL de NaOH al 17.5% y se añaden de la siguiente manera:

- § 15 mL y agitar durante 1 minuto
- § 10 mL y agitar durante 45 segundos
- § 10 mL y agitar durante 15 segundos

Se dejó reposar durante 1 minuto y se continuó de la siguiente manera:

- § 10 mL y agitar durante 2.5 minutos
- § a los 2.5 minutos añadir 10 mL
- § a los 2.5 minutos añadir 10 mL
- § a los 2.5 minutos añadir 10 mL y agitar 2.5 minutos.

Al terminar se cubrió con un vidrio de reloj y se dejó reposar 30 minutos. Se añadieron 100 mL de agua y se agita rápida y vigorosamente. Se dejó reposar durante 30 minutos y se filtró en placa N° 2 sobre un kitasato; se lavó el vaso con 25 mL de NaOH al 8.3% y se filtró durante 5 minutos. Posteriormente se realizaron 5 lavados con 50 mL de agua y en otro kitasato se hizo nuevamente un lavado con 400 mL de agua. Sin vacío, se llenó la placa con ácido acético 2 N y se dejó reposar 5 minutos antes de aspirar. Se lavó con agua hasta pH neutro. Finalmente se secó en estufa a 105 °C por 24 horas, se enfrió y pesó el vaso.

2.2.7. Cenizas

Para la cuantificación de cenizas presentes en la muestra se pesó 2 ± 0.001 g de materia con humedad conocida en un crisol de peso seco conocido. Posteriormente se colocó en la mufla y se mantuvo a una temperatura de 575 °C hasta alcanzar peso constante, aproximadamente de 4-6 h. Si el material se introduce en el horno a 575 °C puede producirse su deflagración y la pérdida de material. Para conseguir una combustión lenta y controlada, el material debe introducirse en el horno de mufla a baja temperatura, 100-150 °C, e ir subiéndola poco a poco, a intervalos de 50 °C, hasta llegar a 575 °C. Finalmente, se enfría en un desecador conteniendo gel de sílice y se pesa.

2.3. Proceso para la obtención de azúcares en tule (*Typha dominguensis*)

El proceso en el que se llevará a cabo la extracción de azúcares se muestra en la figura 2.11. Inicia con un tratamiento previo llamado autohidrólisis donde se obtienen dos fases, la fase sólida con un gran contenido de humedad y la fase líquida. La primera contiene sólidos insolubles en agua principalmente celulosa, lignina y alguna fracción de hemicelulosa y la fase líquida se tienen principalmente agua, xilo-oligosacáridos, xilosa, gluco-oligosacáridos, glucosa, furfural, 5-Hidroximetilfurfural (HMF) y ácido acético. Para una mayor concentración de azúcares es necesario descomponer los oligosacáridos en monosacáridos. Esta descomposición se puede realizar mediante una segunda etapa de hidrólisis ácida, con 4%

peso de H_2SO_4 en autoclave para la fase líquida y H_2SO_4 al 1.2% v/v en reactor para la fase sólida. Para fines de investigación se realiza la cuantificación de azúcares reductores por el método DNS, así también como cuantificación de azúcares y compuestos de degradación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a los licores obtenidos de la autohidrólisis e hidrólisis ácida de ambas fases (sólido y líquido).

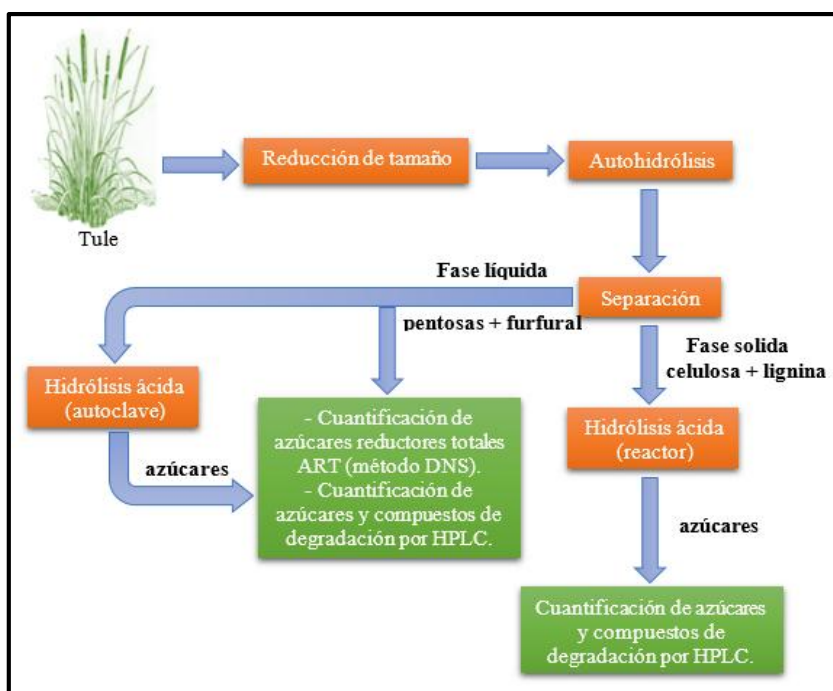


Figura 2.11 Proceso para la extracción de azúcares en tule.

2.4. Autohidrólisis

2.4.1. Diseño de experimentos

Con el fin de determinar el comportamiento de la especie vegetal tule (*Typha dominguensis*) en el proceso de autohidrólisis se realizaron reacciones preliminares a diferentes temperaturas, tiempos y relación sólido-líquido basadas en literatura de otros residuos vegetales, esto con el objetivo de establecer valores para el diseño experimental en base al rendimiento del reactor y de celulosa al final de la reacción. De acuerdo con los

experimentos preliminares y literatura se concluyó que las variables serían; la temperatura (160° C, 180 °C o 190 °C), el tiempo (40 min o 60 min) y el tamaño de partícula: 2.5 cm, malla #14 (1.41 mm) y malla #40 (0.420 mm), mientras que la relación sólido-líquido (1:14) permanecería constante en todo el diseño experimental, en la tabla 2.1 se enumeran las reacciones.

Tabla 2.1 Diseño de experimentos para autohidrólisis.

Nº de reacción	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Tamaño de partícula
1	160	40	2.5 cm
2	180		
3	190		
4	160	60	
5	180		
6	190		
7	160	40	Malla 14
8	180		
9	190		
10	160	60	
11	180		
12	190		
13	160	40	Malla 40
14	180		
15	190		
16	160	60	
17	180		
18	190		

2.4.2. Autohidrólisis de tule

El proceso se lleva a cabo en un reactor PARR modelo 5100 con una capacidad de 2 litros (figura 2.12), donde se añade la materia prima ya tamizada con la relación sólido-líquido (1:14) y las condiciones establecidas en el diseño experimental.



Figura 2.12 Reactor PARR modelo 5100.

El proceso de autohidrólisis se describe en la figura 2.13. Cabe mencionar que el tiempo de reacción inició una vez que se alcanzada la temperatura deseada y es importante mantener esta temperatura constante durante todo el tiempo de la reacción.

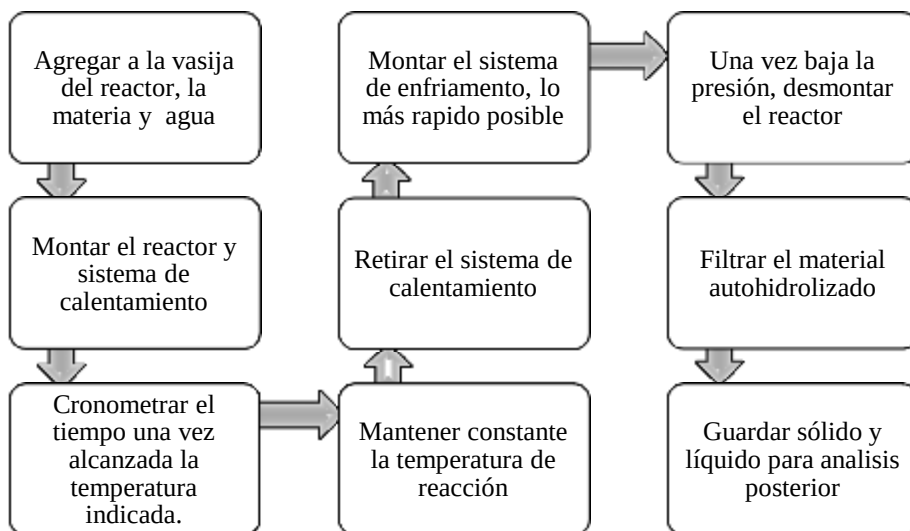


Figura 2.13 Diagrama del proceso de la autohidrólisis del Reactor PARR modelo 5100.

Para conservar en buen estado el sólido obtenido del proceso de autohidrólisis, fue necesario secarlo a temperatura ambiente esparciéndolo sobre una superficie plana (figura 2.14).



Figura 2.14 Secado de la fase sólida obtenida de la autohidrólisis de tule.

La fase líquida se sedimentó en refrigeración durante 24 horas, (figura 2.15a), se filtró a vacío usando papel filtro poro fino (figura 2.15b). Posteriormente el líquido filtrado fue conservado a temperatura de congelación (-4°C).

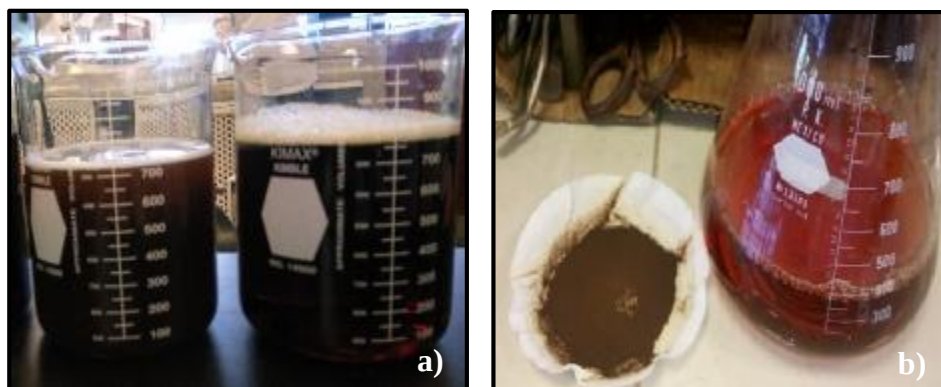


Figura 2.15 Sedimentación y filtración de fase líquida de la autohidrólisis de tule.

2.5. Hidrólisis ácida

2.5.1. Hidrólisis ácida de fase líquida

En la fase líquida obtenida de los tratamientos hidrotérmicos se encuentran los productos de solubilización de las hemicelulosas, que son mayoritariamente oligómeros de composición

muy heterogénea. Su cuantificación directa, mediante cromatografía o técnicas similares, no es posible, por lo que se llevó a cabo una hidrólisis de esta fase líquida con 4% de H_2SO_4 , en una autoclave (All American) modelo N°25X.

Para llevar a cabo la hidrólisis ácida, los líquidos obtenidos de la autohidrólisis se descongelaron a temperatura ambiente, se pesó una alícuota (10-20 g) en un frasco de vidrio de 100 mL (figura 2.16a). Se añadió H_2SO_4 hasta lograr una concentración equivalente de 4% en peso, realizando este paso por triplicado. Posteriormente los frascos se cerraron y se introdujeron en la autoclave (figura 2.16b), manteniéndola a 2 atm (121 °C) durante 20 min. Transcurrido el tiempo se sacan los frascos (figura 2.16c) y se enfriaron en baño de agua a temperatura ambiente. Los hidrolizados se filtraron con acrodiscos para eliminar partículas de lignina (figura 2.16d) y se almacenaron en tubos para centrífuga cónicos a -4 °C.



Figura 2.16 Esquema visual del proceso de hidrólisis ácida de la fase líquida.

2.5.2. Hidrólisis ácida de fase sólida

La hidrólisis ácida de la fase sólida se realizó en un reactor PARR tipo batch modelo 5100 (figura 2.17), con una solución al 1.2% de H_2SO_4 en una relación 1:10 sólido-líquido a 170°C por 20 minutos.



Figura 2.17 Reactor PARR tipo batch modelo 5100.

Para llevar a cabo la hidrólisis ácida de la fase sólida (figura 2.18a), se pesó 100 g de la materia pretratada con autohidrólisis seca (figura 2.18b). Se añadió a la vasija del reactor 1000 mL de H_2SO_4 al 1.2% (figura 2.18c). Posteriormente se montó el reactor y el sistema de calentamiento (figura 2.18d), manteniendo a 170 °C durante 20 min. Transcurrido el tiempo se retira el sistema de calentamiento y se montó el sistema de enfriamiento, lo más pronto posible. Una vez que la presión fue igual a cero se procedió a desmontar el reactor. Se filtró el contenido de la vasija por la tela porosa, separando el líquido hidrolizado. Finalmente, el líquido se filtró nuevamente a vacío y se almacenó en tubos para centrífuga cónicos a -4 °C.



Figura 2.18 Esquema visual del proceso de hidrólisis ácida de la fase sólida del tule.

2.6. Cuantificación de azúcares reductores totales (ART) por espectrofotometría UV.

2.6.1. Método DNS.

El procedimiento para la coloración de las muestras con el reactivo DNS (anexo A) se muestra en la figura 2.19, posteriormente se realizan las lecturas de absorbancias mediante el espectrofotómetro UV GBC modelo Cintra 303, a 540 nm. Cabe mencionar que las diluciones para la curva de calibración llevaron el mismo procedimiento que las muestras.

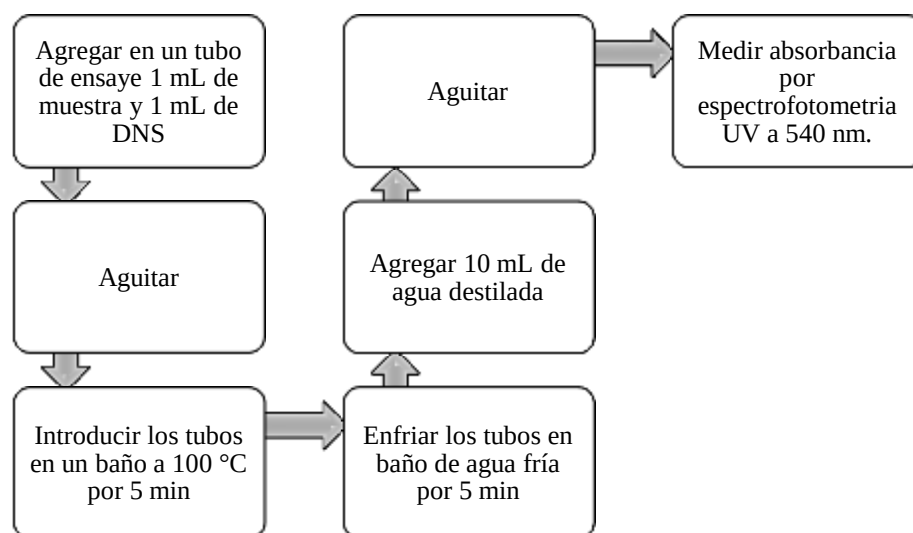


Figura 2.19 Procedimiento de método DNS para la cuantificación de los azúcares reductores obtenidos de las fracciones hidrolizadas de tule.

2.6.2. Curva de calibración para cuantificación de ART.

Para la curva de calibración se preparó una solución de glucosa con concentración de 2 g/L.

En una gradilla se colocó una serie de tubos de ensayo ≥ 15 mL para evitar derrames, debidamente etiquetados. La tabla 2.2 muestra la cantidad de estándar y agua destilada que debe llevar cada tubo para la curva de calibración.

Tabla 2.2 Curva de calibración para ART en espectrofotómetro UV.

Tubo	Glucosa (ml)	H ₂ O destilada (ml)	DNS (ml)	Glucosa (g/L)
Blanco	0	1.0	1.0	0
1	0.2	0.8	1.0	0.4
2	0.4	0.6	1.0	0.8
3	0.6	0.4	1.0	1.2
4	0.8	0.2	1.0	1.6
5	1.0	0	1.0	2

2.7. Cuantificación de azúcares y compuestos de degradación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para el análisis de cuantificación de azúcares y compuestos de degradación obtenidos a partir de los tratamientos realizados a la biomasa tule (*Typha dominguensis*), se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución marca Waters 1515 acoplado a un detector de índice de refracción Waters 2414 (figura 2.20).



Figura 2.20 HPLC-IR Waters 1515/2414.

2.7.1. Preparación de muestras

Las muestras líquidas obtenidas de los procesos de autohidrólisis e hidrólisis ácida se neutralizaron con CaCO_3 y se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante

obtenido se filtró por una membrana de 0.2 μm y se depositó en viales para HPLC con capacidad de 1.5 mL con tapas (figura 2.21).



Figura 2.21 Muestras en viales colocadas en el carrusel del HPLC Waters.

2.7.2. Configuración del cromatógrafo líquido de alta eficiencia acoplado a un detector de índice de refracción (HPLC-IR)

Las condiciones con las que operó el cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) se muestran en la tabla 2.3. En el anexo C se muestran las especificaciones de cada columna utilizada.

Tabla 2.3 Condiciones de operación del HPLC-IR para azúcares y compuestos de degradación.

Muestra	Temp. de Horno	Flujo de fase móvil	Fase móvil	Columna	Detector	Tiempo de corrida	Vol. de inyección
Azúcares	80 °C	0.6 mL/min	H ₂ O	Shodex SUGAR SP-G (6 mm x 50 mm) + Shodex SP0810 (8 mm x 300 mm)	IR	30 min	10 μL
Compuestos de degradación	60 °C	0.6 mL/min	H ₂ SO ₄ 5 mM	Shodex SH1011 (8 mm x 300 mm)	IR	52 min	10 μL

Los pasos para iniciar a trabajar en el HPLC-IR son los siguientes:

1. Preparar la fase móvil a utilizar y filtrar por una membrana de 0.2 μm , posteriormente sónico durante 10 min.
2. Cambiar el reservatorio de residuos.
3. Colocar la fase móvil y sellar perfectamente para evitar la entrada de aire.
4. Encender los interruptores correspondientes a la bomba del cromatógrafo, el horno de la columna y el detector de índice de refracción.
5. Encender la computadora y abrir el software “Empower 2”.

Panel principal → Selección del proyecto y sistema cromatográfico → Run samples.

6. Ajustar el flujo a 1 mL/min y purgar la línea principal y la celda del detector.
7. Disminuir el flujo a 0.6 mL/min y conectar la columna a utilizar, eliminando cualquier burbuja de aire dejando pasar unas cuantas gotas y posteriormente conectar completamente el sistema.
8. Colocar los viales en el carrusel e introducirlo al automuestreador Waters 717 plus.
9. En la pantalla del sistema, cargar el método del instrumento (selección del método → set up).
10. Enlistar en “samples” las muestras a analizar llenando los campos (# vial – nombre de la muestra – volumen de inyección - # de inyecciones – función (estándar o muestra) – tiempo del análisis).
11. Oprimir el botón verde para iniciar la secuencia establecida.

2.7.3. Curva de calibración

Para realizar el análisis cuantitativo se realizaron curvas de calibración con soluciones patrones de concentración conocida. La solución patrón de azúcares estuvo compuesta de:

glucosa 25 mg/mL, xilosa 10 mg/mL, arabinosa 4 mg/mL, galactosa 3 mg/mL y celobiosa 0.5 mg/mL. Se realizaron diluciones en matraces de 5 mL. La tabla 2.4 muestra las diluciones para la curva de calibración y las concentraciones de cada azúcar.

Tabla 2.4 Curva de calibración para azúcares cuantificados en HPLC.

Diluciones		Concentración de azúcares (mg/mL)				
Solución patrón (mL)	Agua (mL)	Glucosa	Xilosa	Arabinosa	Galactosa	Celobiosa
0.02	4.98	0.1	0.04	0.016	0.012	0.002
0.1	4.9	0.5	0.2	0.08	0.06	0.01
0.2	4.8	1	0.4	0.16	0.12	0.02
0.5	4.5	2.5	1	0.4	0.3	0.05
1	4	5	2	0.8	0.6	0.1
2	3	10	4	1.6	1.2	0.2
3	2	15	6	2.4	1.8	0.3
4	1	20	8	3.2	2.4	0.4
5	0	25	10	4	3	0.5

La solución patrón los compuestos de degradación consta de: ácido acético 2 mg/mL, furfural 2 mg/mL y 5-HMF 2 mg/mL. Se realizó diluciones en matraces de 5 mL. La tabla 2.5 muestra las diluciones para la curva de calibración de compuestos de degradación y sus concentraciones.

Tabla 2.5 Curva de calibración para compuestos de degradación cuantificados en HPLC.

Diluciones		Concentración de compuestos de degradación (mg/mL)		
Solución patrón (mL)	Agua (mL)	Ácido acético	Furfural	5-HMF
0.5	4.5	0.2	0.2	0.2
1	4	0.4	0.4	0.4
2	3	0.8	0.8	0.8
3	2	1.2	1.2	1.2
4	1	1.6	1.6	1.6
5	0	2	2	2

Capítulo 3. Resultados

En el presente capítulo se muestran los resultados obtenidos en la caracterización de tule (*Typha dominguensis*) y las concentraciones de los azúcares reductores totales (ART), azúcares (glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa y celobiosa) y compuestos de degradación (ácido acético, furfural y 5-HMF) de los licores obtenidos en autohidrólisis e hidrólisis ácida.

3.1. Caracterización de tule (*Typha dominguensis*)

3.1.1. Humedad

Los resultados de la determinación de porcentaje de humedad contenido en la materia prima tule (*Typha dominguensis*) se representan en la tabla 3.1, desarrollando la técnica y procedimiento indicado en la norma Tappi T 257 cm-02, los cálculos de porcentaje de humedad y sequedad se realizaron con las ecuaciones 1.3 y 1.4, respectivamente.

Tabla 3.1 Porcentaje de humedad de tule.

Materia	PRS (g)	PRMH (g)	PRMS (g)	Humedad %	Sequedad %
Tule	47.49	48.48	48.38	11.06	88.94
	51.66	52.67	52.57	10.52	89.48
			Promedio	10.79 %	89.21 %

3.1.2. Extraíbles con etanol

Para la cuantificación de extraíbles en etanol se realizó una extracción tipo Soxhlet con etanol, siguiendo la normativa Tappi T 204 cm-07. Los resultados del contenido de extraíbles en etanol de la planta de tule se calcularon con la ecuación 1.5. La tabla 3.2 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 3.2 Porcentaje de extraíbles en etanol de tule.

Muestra	PRS (g)	PMH (g)	PRMS (g)	Extraíbles en etanol %
Tule	103.330	17.000	104.959	10.74
	98.340	16.282	99.948	11.06
	100.908	16.203	102.535	11.25
	175.800	17.000	177.660	12.26
			Promedio	11.33 %

3.1.3. Extraíbles en agua caliente

El contenido de extraíbles en agua caliente se expresa en porcentaje sobre base seca, establecido en el procedimiento de la norma Tappi T-207 cm-08 y se calculó mediante la ecuación 1.6. Los resultados de esta caracterización se muestran en la tabla 3.3.

Tabla 3.3 Porcentaje de extraíbles en agua caliente de tule.

Muestra	PRS (g)	PRMH (g)	PRMS (g)	Extraíbles en agua caliente %
Tule	24.55	26.35	26.15	11.17
	24.72	26.51	26.32	10.52
	25.14	26.98	26.77	11.56
			Promedio	11.08 %

3.1.4. Lignina Klason

El método de Klason descrito en la norma Tappi T 222 om-06 permite determinar el porcentaje de lignina insoluble en ácido. Los cálculos se realizaron mediante la ecuación 1.7, los datos y el resultado se muestran en la tabla 3.4.

Tabla 3.4 Porcentaje de lignina Klason de tule.

Muestra	PRS (g)	PMH (g)	PRMS (g)	Extraíbles en etanol %	Lignina Klason %
Tule	24.55	0.501	24.66	11.33	21.26
	24.86	0.527	24.97	11.33	21.40
	23.85	0.506	23.98	11.33	24.32
				Promedio	22.32 %

3.1.5. Holocelulosa

El porcentaje de contenido de holocelulosa de la planta tule se realizó con el método Wise (1946), los cálculos se realizaron con la ecuación 1.8. La tabla 3.5 se muestran los datos y resultados de esta determinación.

Tabla 3.5 Porcentaje de holocelulosa en tule.

Muestra	PRS (g)	PMS (g)	PRMS (g)	Holocelulosa %
Tule	24.55	4.460	27.96	76.52
	24.73	4.478	28.24	78.30
	25.14	4.458	28.62	78.20
			Promedio	77.68 %

3.1.6. α -Celulosa

La determinación de α -celulosa en tule se realizó bajo la norma Tappi T 203 cm-09, para los cálculos se utilizó la ecuación 1.9. La tabla 3.6 muestra los datos y resultado obtenido.

Tabla 3.6 Porcentaje de α -celulosa en tule.

Muestra	PRS (g)	PRMH (g)	PRMS (g)	α-celulosa %
Tule	32.13	34.81	33.61	44.91
	24.18	26.85	25.90	35.69
	23.67	26.35	25.29	39.73
			Promedio	40.11 %

3.1.7. Cenizas

El contenido de cenizas en tule se muestra en la tabla 3.7, expresado en porcentaje en base seca, dicha determinación se realizó bajo la norma Tappi T 211 om-07 y se calculó con la ecuación 1.10.

Tabla 3.7 Porcentaje de cenizas en tule.

Muestra	PRS (g)	PRMH (g)	PRC (g)	Cenizas %
Tule	16.16	18.16	16.29	7.28
	44.00	46.00	44.13	7.28
	55.78	57.80	55.92	7.77
			Promedio	7.44 %

2.1.8. Composición química de Tule (*Typha dominguensis*)

Los resultados de la composición química de 100 g. de tule en base seca se concentran en la tabla 3.8, calculados de acuerdo con la serie de análisis químicos mostrados en la figura 2.5.

Tabla 3.8 Resultados de caracterización de la materia prima.

DETERMINACIONES	Tule (<i>Typha dominguensis</i>)	g / 100 g. materia base seca
	Extraíbles con etanol	11.33
	Extraíbles en agua caliente	9.82
	Lignina Klason	17.60
	Holocelulosa · α -Celulosa	61.25 24.57

3.2. Autohidrólisis de tule (*Typha dominguensis*)

3.2.1. Cuantificación de Azúcares reductores totales (ART) de autohidrólisis

En los licores obtenidos de autohidrólisis de la especie tule se cuantificaron los azúcares reductores totales (ART) por el método DNS. La concentración de ART se calculó con la ecuación de la recta $y=1.9044x-0.019$ obtenida de la curva de calibración (anexo B) tomando en cuenta en los cálculos la concentración del estándar de glucosa (2 g/l) y el factor de dilución (10).

Las absorbancias leídas en el espectrofotómetro UV a 540 nm de cada reacción a las diferentes condiciones establecidas en el diseño experimental se muestran en la tabla 3.9, así

como la concentración de los ART expresado en gramos equivalentes de glucosa por litro (gEG/l) y el porcentaje de rendimiento de azúcares referidos a 90 g. en base seca procesada en el reactor.

Tabla 3.9 Resultados de ART en licores de autohidrólisis de tule.

N° Reacción	Absorbancia	Concentración ART (gEG/L)	Rendimiento %
1	0.138	2.025	2.25%
2	0.354	4.582	5.09%
3	0.353	4.563	5.07%
4	0.156	2.248	2.50%
5	0.377	4.865	5.41%
6	0.205	2.749	3.05%
7	0.234	2.934	3.26%
8	0.576	6.897	7.66%
9	0.362	4.419	4.91%
10	0.213	2.688	2.99%
11	0.338	4.144	4.60%
12	0.198	2.520	2.80%
13	0.233	3.008	3.34%
14	0.313	3.965	4.41%
15	0.501	6.203	6.89%
16	0.273	3.482	3.87%
17	0.244	3.139	3.49%
18	0.193	2.532	2.81%

El comportamiento de los resultados de porcentaje de rendimiento de azúcares reductores totales mostrados en la tabla 3.9 se representan en la gráfica de la figura 3.1.

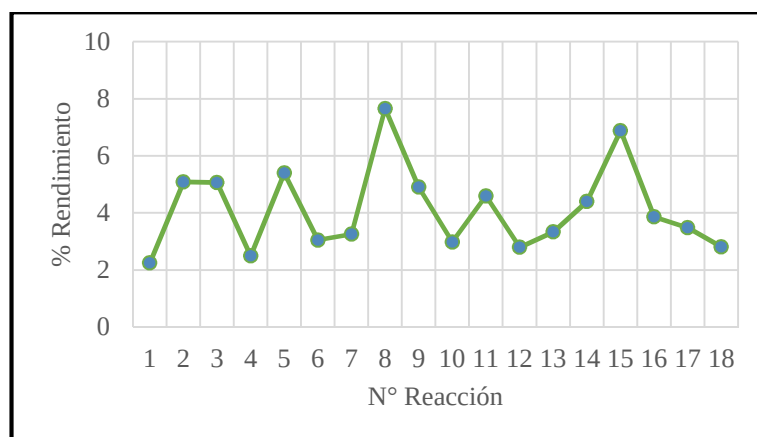


Figura 3.1 Porcentaje de rendimiento de ART en autohidrólisis de tule.

3.2.2. Cuantificación de azúcares de autohidrólisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los licores autohidrolizados que anteriormente se cuantificaron también se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificar los azúcares presentes. La tabla 3.10 muestra las concentraciones de los azúcares expresados en miligramos por mililitro.

Tabla 3.10 Resultados de azúcares en licores de autohidrólisis cuantificados por HPLC.

N° Reacción	Concentración de azúcares (mg/mL)					
	Arabinosa	Celobiosa	Glucosa	Xilosa	Galactosa	Total
1	0.328	0.036	0.257	0.211	0.351	1.177
2	0.216	0.091	0.020	0.277	0.049	0.654
3	ND	0.351	0.142	0.408	0.225	1.125
4	0.996	0.032	0.227	0.196	ND	1.451
5	0.130	0.129	0.215	0.206	0.351	1.030
6	0.997	0.363	0.173	0.308	0.196	2.037
7	1.696	ND	0.340	0.123	ND	2.159
8	1.198	ND	ND	0.533	0.447	2.177
9	1.154	0.292	0.567	0.299	ND	2.312
10	1.752	ND	0.395	0.272	0.303	2.722
11	0.078	0.073	0.111	0.128	ND	0.390
12	0.168	0.051	0.172	0.192	ND	0.583
13	1.425	ND	0.528	0.214	0.187	2.354
14	0.288	0.202	0.105	0.257	0.065	0.917
15	0.149	0.317	0.422	0.411	ND	1.298
16	1.436	0.013	0.279	0.187	ND	1.915
17	0.171	0.152	0.031	0.392	0.013	0.759
18	0.457	0.052	0.170	0.257	0.068	1.005

Los compuestos no detectados en los cromatogramas están descritos como ND.

En el análisis que se llevó a cabo en el equipo HPLC se encontraron los azúcares; arabinosa, celulosa, glucosa, xilosa y galactosa en diferentes concentraciones en cada una de las reacciones de autohidrólisis las cuales se llevaron a cabo a diferentes condiciones. Fijando el interés en las concentraciones de glucosa y xilosa, la figura 3.2 muestra las concentraciones en las diferentes condiciones de autohidrólisis.

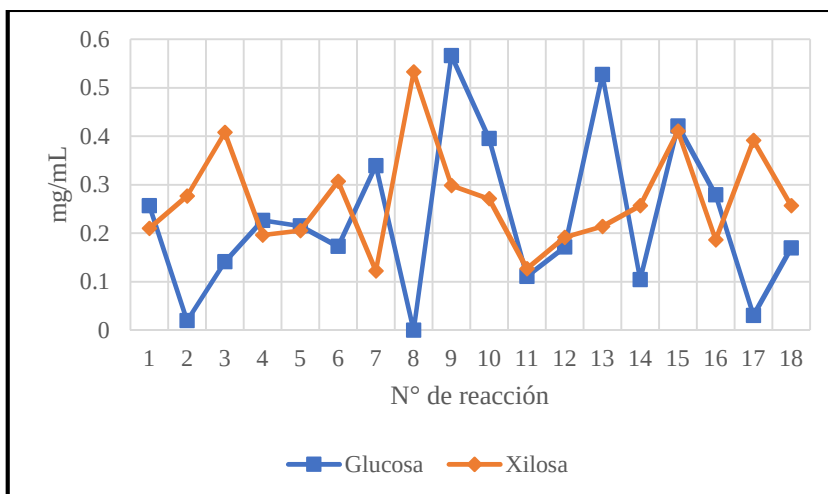


Figura 3.2 Concentraciones de glucosa y xilosa obtenidas en autohidrólisis cuantificadas por HPLC.

3.2.3. Cuantificación de compuestos de degradación en autohidrólisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Durante el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos se forman y/o liberan una amplia gama de compuestos que inhiben a los microorganismos (Rojas, 2011). La formación de estos compuestos de degradación varía de acuerdo con la composición de la biomasa y las condiciones utilizadas en el pretratamiento, por esta razón se cuantificaron los compuestos de degradación en los licores de autohidrólisis y se analizó su comportamiento a las diferentes condiciones como el tamaño de partícula, temperatura y tiempo. La tabla 3.11 muestra las concentraciones obtenidas de los compuestos de degradación en licores autohidrólizados de tule.

Tabla 3.11 Resultados de compuestos de degradación en licores de autohidrólisis cuantificados por HPLC.

N° Reacción	Concentración de compuestos de degradación(mg/mL)			
	Ácido Acético	Furfural	5-HMF	Total
1	0.063	ND	ND	0.063
2	0.449	ND	ND	0.449
3	2.984	0.016	0.928	3.929
4	0.358	ND	ND	0.358
5	0.676	ND	0.120	0.796
6	3.186	0.044	0.997	4.228
7	0.812	ND	ND	0.812
8	2.907	ND	0.224	3.131
9	1.997	ND	0.654	2.651
10	0.732	ND	ND	0.732
11	0.448	ND	0.102	0.550
12	1.524	ND	0.437	1.961
13	0.700	ND	ND	0.700
14	0.822	ND	ND	0.822
15	1.289	ND	0.304	1.593
16	0.468	ND	ND	0.468
17	0.533	ND	0.099	0.633
18	1.415	ND	0.424	1.839

Los compuestos no detectados en los cromatogramas están descritos como ND.

3.3. Hidrólisis ácida de la fase líquida

3.3.1. Cuantificación de Azúcares reductores totales (ART) de la hidrólisis ácida de la fase líquida.

Las lecturas de absorbancias de los licores hidrolizados obtenidos en autohidrólisis utilizando un espectrofotómetro UV a 540 nm se muestran en la tabla 3.12, así como las concentraciones de ART calculadas con la ecuación de la recta $y=1.7101x-0.2333$ de la curva de calibración (anexo B), expresados en gramos equivalentes de glucosa por litro (gEG/L) y los resultados del porcentaje de rendimiento de azúcares referidos a 90 g. en base seca procesada en el reactor.

Tabla 3.12 Resultados de ART en licores hidrolizados de tule.

Nº Reacción	Absorbancia	Concentración ART (gEG/L)	Rendimiento %
1	0.248	6.901	7.67%
2	0.446	9.090	10.10%
3	0.295	7.067	7.85%
4	0.309	7.766	8.63%
5	0.470	9.414	10.46%
6	0.250	6.469	7.19%
7	0.311	7.026	7.81%
8	0.553	10.15	11.28%
9	0.332	7.303	8.11%
10	0.365	7.720	8.58%
11	0.559	10.23	11.37%
12	0.247	6.199	6.89%
13	0.397	8.374	9.30%
14	0.652	11.768	13.08%
15	0.413	8.581	9.53%
16	0.428	8.781	9.76%
17	0.514	9.923	11.03%
18	0.204	5.817	6.46%

El comportamiento de los resultados de porcentaje de rendimiento de azúcares reductores totales mostrados en la tabla 3.12 se representa en la gráfica de la figura 3.3, a las diferentes condiciones realizadas en el pretratamiento de autohidrólisis.

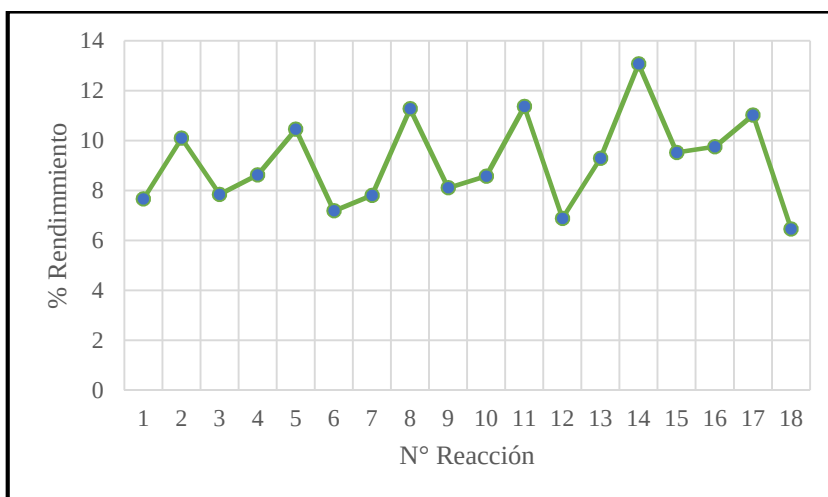


Figura 3.3 Porcentaje de rendimiento de ART en hidrólisis ácida de tule.

3.3.2. Cuantificación de azúcares de la hidrólisis ácida de fase líquida por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La hidrólisis de la fase líquida obtenida de la autohidrólisis se realizó en un autoclave con 4% peso de H_2SO_4 . Monteiro Machado (2010) dice que la hidrólisis de la hemicelulosa de maderas blandas rinde mayoritariamente a manosa y xilosa, siendo la xilosa la más importante.

Las concentraciones de cada azúcar obtenidas de la hidrólisis ácida de los licores de autohidrólisis leídas en HPLC se muestran en la tabla 3.13, expresadas en miligramos por mililitro.

Tabla 3.13 Resultados de azúcares en licores hidrolizados.

N° Reacción	Concentración de azúcares (mg/mL)					
	Arabinosa	Celobiosa	Glucosa	Xilosa	Galactosa	Total
1	1.542	0.354	0.612	0.332	0.725	3.564
2	1.349	0.219	0.415	2.915	0.671	5.568
3	0.825	0.270	0.406	1.556	0.382	3.438
4	2.308	0.339	0.802	1.089	0.812	5.349
5	1.271	0.265	0.523	2.983	0.755	5.796
6	0.684	0.235	0.350	0.969	0.276	2.516
7	1.401	0.066	0.622	0.696	0.578	3.363
8	1.302	0.019	0.476	4.165	0.955	6.917
9	0.733	0.058	0.419	1.871	0.402	3.482
10	1.743	0.134	0.650	1.251	0.698	4.477
11	0.916	0.089	0.558	3.730	0.747	6.040
12	0.462	0.252	0.345	0.808	0.253	2.119
13	1.969	0.199	0.709	0.753	0.798	4.427
14	1.534	0.061	0.624	3.775	0.826	6.821
15	0.709	0.087	0.332	2.138	0.427	3.692
16	2.007	0.174	0.707	1.349	0.786	5.023
17	1.083	0.055	0.334	3.014	0.642	5.128
18	0.425	0.362	0.339	0.523	0.151	1.799

Las concentraciones de glucosa y xilosa obtenidas al realizar la hidrólisis ácida de la fase líquida se muestran en la figura 3.4.

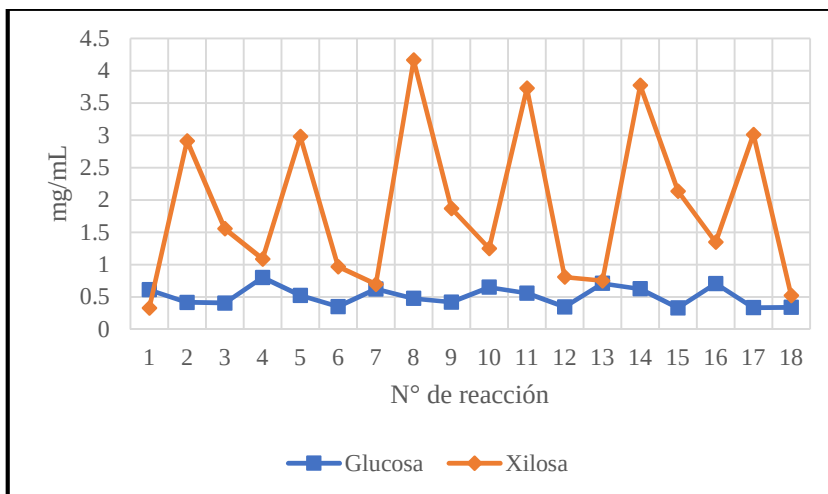


Figura 3.4 Concentraciones de glucosa y xilosa de los licores hidrolizados.

3.3.3. Cuantificación de compuestos de degradación en hidrólisis ácida de fase líquida por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Con la hidrólisis ácida se obtiene básicamente xilosa, ácido acético y ácido metilglucurónico (Monteiro Machado, 2010). Por esta razón y siguiendo el interés del comportamiento de los compuestos de degradación formados, se analizaron por HPLC los licores hidrolizados. La tabla 3.14 muestra las concentraciones obtenidas de los compuestos de degradación en los licores hidrolizados de tule.

Tabla 3.14 Resultados de compuestos de degradación en licores hidrolizados de tule cuantificados por HPLC.

N° Reacción	Concentración de compuestos de degradación (mg/mL)			
	Ácido Acético	Furfural	HMF	Total
1	1.022	ND	0.004	1.026
2	3.644	ND	0.314	3.958
3	4.627	ND	0.713	5.340
4	2.071	ND	0.083	2.154
5	4.767	ND	0.441	5.208
6	5.258	0.007	0.762	6.027
7	1.263	ND	0.056	1.320
8	4.453	ND	0.425	4.878
9	4.395	ND	0.795	5.190
10	1.779	ND	0.101	1.879
11	5.502	0.046	0.838	6.386
12	6.134	ND	0.898	7.033
13	1.432	ND	0.048	1.480
14	3.865	ND	0.295	4.160
15	4.655	ND	0.631	5.286
16	1.871	ND	0.098	1.969
17	3.982	ND	0.539	4.521
18	4.760	0.007	0.724	5.490

Los compuestos no detectados en los cromatogramas están descritos como ND.

3.4. Hidrólisis ácida de fase sólida

Para la hidrólisis ácida de la fase sólida pretratada se hizo una selección de 6 reacciones en base a los resultados obtenidos en los azúcares reductores totales en autohidrólisis e hidrólisis ácida de la fase líquida, las cuales fueron:

- § concentraciones mínimas en autohidrólisis: reacciones N°1 y N°4
- § concentraciones máximas en autohidrólisis: reacciones N°8 y N°15
- § concentraciones máximas en hidrólisis ácida de fase líquida: reacciones N°11 y N°14.

3.4.1. Cuantificación de azúcares de la hidrólisis ácida de fase sólida por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

3.4.1.1. Materia con autohidrólisis

El material sólido (celulosa) de las reacciones elegidas en el apartado anterior se les realizó hidrólisis ácida con H_2SO_4 al 1.2% en reactor. La cuantificación de las concentraciones de los azúcares obtenidos de la celulosa hidrolizada se realizó en HPLC. La tabla 3.15 muestra las concentraciones de los azúcares expresados en miligramos por mililitro.

Tabla 3.15 Resultados de azúcares en hidrólisis ácida de la fase sólida de tule con autohidrólisis analizados por HPLC.

N° Reacción	Concentración de azúcares (mg/mL)				
	Arabinosa	Glucosa	Xilosa	Galactosa	Total
1	2.099	11.062	1.427	0.690	15.28
4	1.574	10.574	0.909	ND	13.06
8	0.449	11.542	ND	ND	11.99
11	1.088	9.886	1.983	0.607	13.56
14	ND	14.359	ND	ND	14.36
15	ND	14.141	ND	ND	14.14

Los compuestos no detectados en los cromatogramas están descritos como ND.

Las concentraciones de glucosa y xilosa obtenidos en la hidrólisis ácida de la fase sólida con autohidrólisis de la tabla 3.15 se muestran en la gráfica de la figura 3.5.

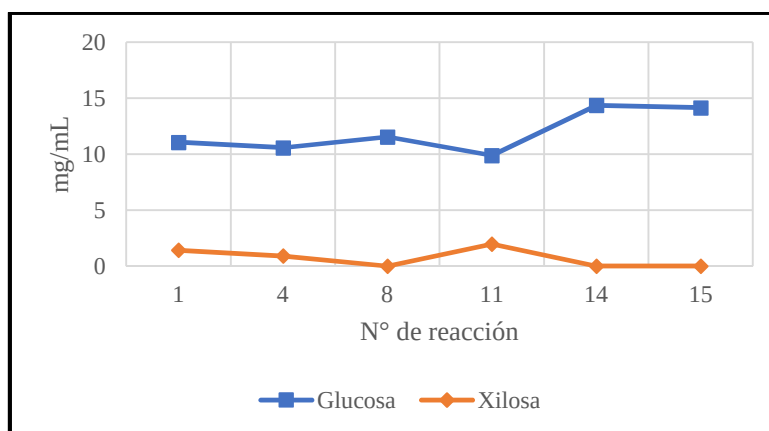


Figura 3.5 Concentraciones de glucosa y xilosa obtenidas en hidrólisis ácida de la fase sólida con autohidrólisis.

3.4.1.2. Materia sin autohidrólisis

Con el fin de tener un punto de comparación con las concentraciones obtenidas de la celulosa pretratada se realizó hidrólisis ácida a la materia prima en los tres tamaños diferentes sin tratamiento previo. Dichos resultados se muestran en la tabla 3.16, donde las concentraciones se expresan en miligramos por mililitro.

Tabla 3.16 Resultados de azúcares en hidrólisis ácida de la materia sin autohidrólisis.

N° Reacción	Concentración de azúcares (mg/mL)					
	Arabinosa	Celobiosa	Glucosa	Xilosa	Galactosa	Total
2.5 cm	2.259	0.041	3.026	1.959	0.902	8.187
Malla #14	0.817	0.004	2.944	0.632	0.412	4.809
Malla #40	2.282	0.000	6.922	3.204	1.137	13.55

El contenido de glucosa y xilosa a los diferentes tamaños de materia sin autohidrólisis indicados en la tabla 3.16 se representan en la gráfica de la figura 3.6.

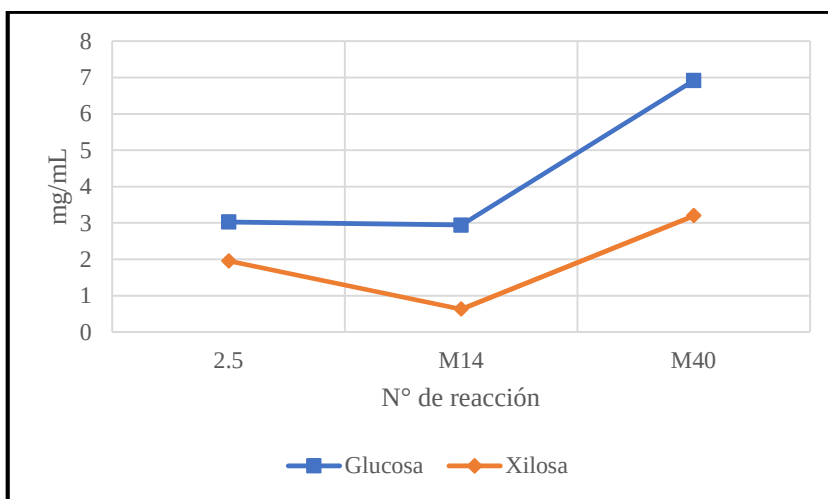


Figura 3.6 Concentraciones de glucosa y xilosa obtenidas en hidrólisis ácida de la materia sin autohidrólisis.

3.4.2. Cuantificación de compuestos de degradación en hidrólisis ácida de fase sólida por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

3.4.2.1. Materia con pretratamiento

Los resultados obtenidos en el HPLC de los compuestos de degradación formados en la hidrólisis ácida de la celulosa pretratada se muestran en la tabla 3.17.

Tabla 3.17 Resultados de compuestos de degradación en hidrólisis ácida de la fase sólida con autohidrólisis analizados por HPLC.

N° Reacción	Concentración de compuestos de degradación (mg/mL)			
	Ácido Acético	Furfural	5-HMF	Total
1	7.509	0.971	6.493	14.97
4	7.446	0.965	6.486	14.90
8	2.722	1.127	2.257	6.107
11	5.681	0.834	4.866	11.38
14	2.735	0.911	2.211	5.857
15	1.236	0.960	0.867	3.063

3.4.2.2. Materia sin pretratamiento

Los resultados de los compuestos de degradación obtenidos en las reacciones de hidrólisis ácida de la celulosa sin pretratamiento se representan en la tabla 3.18.

Tabla 3.18 Resultados de compuestos de degradación en hidrólisis ácida de la materia sin autohidrólisis analizados por HPLC.

N° Reacción	Concentración de compuestos de degradación (mg/mL)			
	Ácido Acético	Furfural	5-HMF	Total
2.5 cm	4.308	0.365	2.333	7.006
Malla #14	3.019	0.477	1.597	5.093
Malla #40	7.546	0.758	3.996	12.30

Capítulo 4. Conclusiones

Con referencia de los resultados obtenidos en la determinación de porcentaje de humedad indicado en la norma Tappi T 412 om-06, el valor obtenido fue de 10.79% siendo el 89.21% de sequedad.

Con respecto al porcentaje de contenido de extraíbles en etanol (ceras, grasas, resinas, aceites, clorofilas, gomas, restos de fluidos biológicos, etc.) determinados por la norma Tappi T 204 cm-07, que forman parte de la estructura lignocelulósica de los residuos vegetales de un 2.7 al 16.99% (García y col., 2017; Pepijn, 2010). De la planta tule se obtuvo un 11.33%, valor que resulta aceptable si consideramos que se extrajo algún otro compuesto insoluble que sería necesario identificar.

En los residuos vegetales, el contenido de extraíbles en agua caliente oscila entre 7.3-17.5% (García y col., 2017). En la planta tule, los extraíbles en agua caliente se obtuvieron en un 11.08%, valor aceptable, desde el punto de vista que la planta sería sometida a autohidrólisis, y que el agua caliente solubiliza componentes como sales o taninos que pudieran estar presentes, además de que provoca la despolimerización de los polisacáridos a azúcares.

La cantidad de lignina Klason presente en la planta tule es de 22.32% este un valor alto y aceptable, ya que es el segundo polímero natural más abundante del mundo vegetal, representando del 12.0-26.91% en los materiales lignocelulósicos (García y col., 2017; Pepijn, 2010). Este resultado abre un panorama a la producción de productos químicos (polímeros o adhesivos) a la partir de la lignina de la planta del tule.

El contenido holocelulosa en los residuos vegetales representa del 60 al 76.6% (García y col., 2017). En la planta tule se obtuvo un 77.68% de contenido de holocelulosa, del cual el 40.11% representa la fracción de α -celulosa (norma Tappi T 203 cm-09) siendo un valor aceptado para la producción de papel.

El rendimiento de ART más alto obtenido en autohidrólisis de la especie tule fue 7.66% con la reacción N° 8 (malla #14, 180 °C y 40 min). La siguiente reacción sobre saliente fue la N° 15 (malla #40, 190 °C y 40 min) con 6.89%. En base a los resultados obtenidos se concluye que las variables de mayor impacto fueron la temperatura y el tiempo, siendo 180 °C y 40 minutos las condiciones óptimas para la mayor extracción de azúcares reductores totales en tule.

Con el análisis que se llevó a cabo en el equipo HPLC de los licores obtenidos de autohidrólisis se confirmó la presencia de azúcares: glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa y celobiosa. La mayor cantidad total de azúcares extraídos fue 2.722 mg/mL con la reacción N°10 (malla #14, 160 °C y 60 min), en la cual la mayor concentración es de arabinosa (1.752 mg/mL). En el caso de la arabinosa la variable significativa fue la temperatura siendo 160 °C la óptima para la extracción de este azúcar.

La mayor concentración de glucosa extraída en autohidrólisis fue 0.567 mg/mL con la reacción N°9 (malla #14, 190 °C y 40 min), la disminución de tamaño de partícula y tiempos cortos (40 min) benefician la extracción de glucosa. Por otro lado, la mayor concentración de xilosa fue de 0.533 mg/mL con la reacción N°8 (malla #14, 180 °C y 40 min), concluyendo que tiempos cortos de reacción (40 min) a altas temperaturas (180 °C y 190 °C) favorecen la extracción de este azúcar.

La mayor concentración de compuestos de degradación en autohidrólisis se obtuvo en la reacción N° 6 (2.5 cm, 190 °C y 60 min) con 4.228 mg/mL, equivalente a: 3.186 mg/mL es ácido acético, 0.997 mg/mL es 5-HMF y 0.044 mg/mL es furfural. La segunda reacción con la concentración más alta fue la N°3 (2.5 cm, 190 °C y 40 min) con 3.929 mg/mL equivalentes a: 2.984 mg/mL es ácido acético, 0.928 es 5-HMF y 0.016 mg/mL es furfural. Se concluye que en el proceso de autohidrólisis el tamaño de partícula grande (2.5 cm) a alta temperatura (190 °C) beneficia la formación y liberación de compuestos de degradación.

En general la autohidrólisis como pretratamiento para la materia prima acompañado de la hidrólisis ácida, favoreció la conversión de polisacáridos a azúcares obteniendo mayores

concentraciones y a su vez, no utiliza reactivos agregados, siendo así un proceso más amigable con el medio ambiente.

En el caso de los ART de la hidrólisis de la fase líquida, la reacción N°14 en autohidrólisis obtuvo un rendimiento del 4.41% y la misma reacción procesada con hidrólisis ácida incrementó el rendimiento a 13.08%. La reacción N°11 en autohidrólisis obtuvo un rendimiento de 4.60% y procesada con hidrólisis ácida incrementó el rendimiento a 11.37%.

Se cuantificaron los azúcares por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en los licores hidrolizados. Los azúcares cuantificados fueron: arabinosa, celobiosa, glucosa, xilosa y galactosa. La reacción N°8 tiene la mayor cantidad total de azúcares con 6.917 mg/mL, en la cual se extrajo la mayor concentración de xilosa con 4.165 mg/mL y galactosa con 0.955 mg/mL. En la reacción N°4 se extrajo la mayor concentración de arabinosa y glucosa con 2.308 mg/mL y 0.802 mg/mL, respectivamente.

La mayor concentración de compuestos de degradación que se formó en la hidrólisis ácida de la fase líquida se obtuvo en la reacción N°12 con 7.033 mg/mL equivalente a: 6.134 mg/mL de ácido acético y 0.898 mg/mL de 5-HMF. La segunda reacción con la concentración más alta fue la N°11 con 6.386 mg/mL, equivalente a: 5.502 mg/mL de ácido acético, 0.838 de 5-HMF y 0.046 mg/mL de furfural.

Se concluye que la hidrólisis ácida de la fase líquida aumentó la concentración de los azúcares obtenidos en la autohidrólisis. Las condiciones para autohidrólisis son: tule a un tamaño de malla #14, relación sólido-líquido (1:14), temperatura de 180 °C y un tiempo de reacción de 40 minutos y posteriormente hidrólisis ácida con H₂SO₄ concentrado al 4% en peso, en autoclave a 2 atm (121 °C) durante 20 minutos, siendo este proceso el óptimo para una mayor extracción de azúcares en hemicelulosa de la planta tule, donde la xilosa y arabinosa son los azúcares predominantes.

En hidrólisis ácida de la materia con autohidrólisis la mayor concentración de glucosa fue 14.359 mg/mL, mientras que la materia con hidrólisis ácida y sin autohidrólisis la

concentración obtenida es de 6.922 mg/mL de glucosa. Por lo tanto, se concluye que el proceso de autohidrólisis como tratamiento previo a la materia favoreció la extracción de glucosa. Las condiciones óptimas para autohidrólisis es tule a un tamaño de malla #40 fueron: relación sólido-líquido (1:14), temperatura de 180 °C y un tiempo de reacción de 40 minutos y posteriormente el sólido recuperado someterlo a hidrólisis ácida en reactor con H₂SO₄ al 1.2% a una relación sólido-líquido (1:10), temperatura de 170 °C y un tiempo de 20 minutos.

Los compuestos de degradación en la hidrólisis de la fase sólida con autohidrólisis la reacción N°1 obtuvo la mayor concentración con 14.973 mg/mL equivalente a: 7.509 mg/mL de ácido acético, 6.493 mg/mL de 5-HMF y 0.971 mg/mL de furfural. Mientras que en la hidrólisis ácida sin autohidrólisis la mayor concentración se obtuvo en la reacción con la materia a un tamaño de malla #40 con 12.3 mg/mL equivalente a: 7.546 mg/mL de ácido acético, 3.996 mg/mL de 5-HMF y 0.758 mg/mL de furfural. Se concluye que las mayores concentraciones de 5-HMF y furfural se obtuvieron en las reacciones de hidrólisis ácida de la materia con autohidrólisis.

Anexo A. Preparación del reactivo DNS.

Inicialmente se prepara el reactivo DNS y para un litro de solución, se requiere pesar las siguientes cantidades:

- 10 g de ácido dinitrosalicílico (1%).
- 2 g de fenol cristal (0.2%).
- 0.5 g de bisulfito de sodio (0.5%).
- 10 g de hidróxido de sodio (10g).
- 200 g de tartrato de sodio - potasio.

En una parrilla con agitación magnética se coloca un vaso de precipitado con la mínima cantidad de agua destilada y dentro un magneto. El vaso de precipitado se debe cubrir con papel aluminio y una tapa encima para evitar el paso de luz.

Se pone en agitación y se van añadiendo los reactivos como se indica a continuación: Disolver el hidróxido de sodio y el ácido 3,5 dinitrosalicílico con la mínima cantidad de agua destilada en un vaso precipitado. Una vez disuelto añadir fenol y lentamente el tartrato de sodio y potasio hasta que se disuelva. Finalmente adicionar el meta bisulfito de sodio enjuagando la charola. Después mezclar hasta disolver. Colocar en un matraz de aforación y posteriormente vaciar a un frasco ámbar cubriéndolo con aluminio.

El reactivo DNS debe mantenerse en refrigeración y atemperar antes de ser usado, si se observa precipitado o cambio de coloración, se debe desechar.

Anexo B. Curvas de calibración de glucosa para ART.

La curva de calibración mostrada en la figura B.1 fue utilizada para calcular la concentración de azúcares reductores de las muestras de autohidrólisis, la ecuación de la recta de la gráfica es $y = 1.9044x - 0.019$ con una $R^2 = 0.9916$.

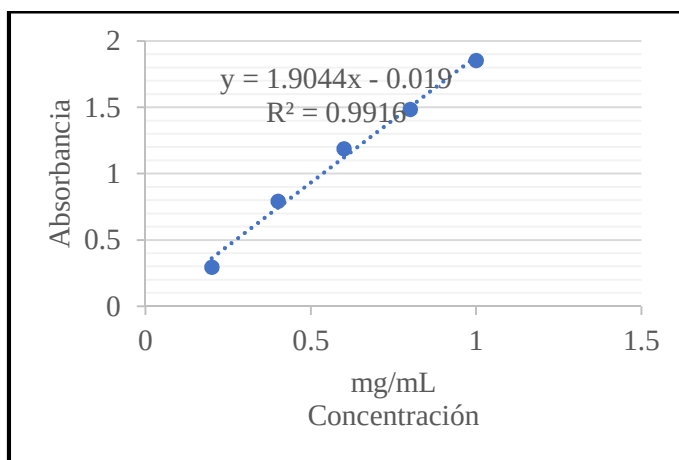


Figura B.1 Primer curva de calibración para método DNS.

La curva de calibración mostrada en la figura B.2 se utilizó para el cálculo de concentración de azúcares reductores en la hidrólisis ácida de tule, la ecuación de la recta de la gráfica es $y = 1.7101x - 0.2333$ con un $R^2 = 0.9937$.

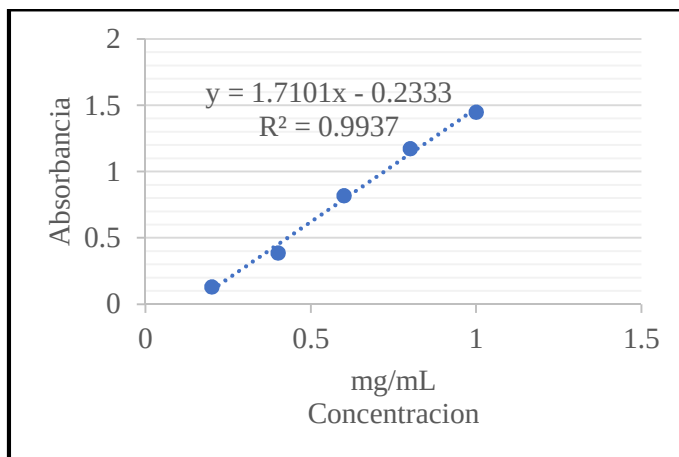
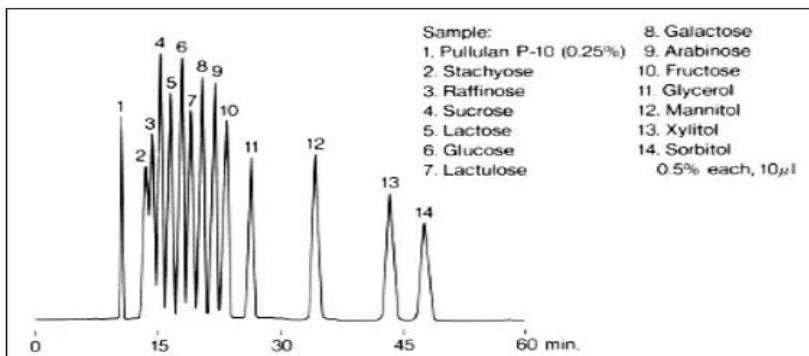


Figura B.2 Segunda curva de calibración para método DNS.

Anexo C. Especificaciones de la columna SP0810 y SH1011.

Saccharides and Sugar Alcohols (2) (SP0810)

SUGAR SP0810 allows the analysis of saccharides and sugar alcohols in a single run with simple aqueous eluent though the column can be used only for limited combinations of saccharides and sugar alcohols because no organic solvent can be added to the eluent.

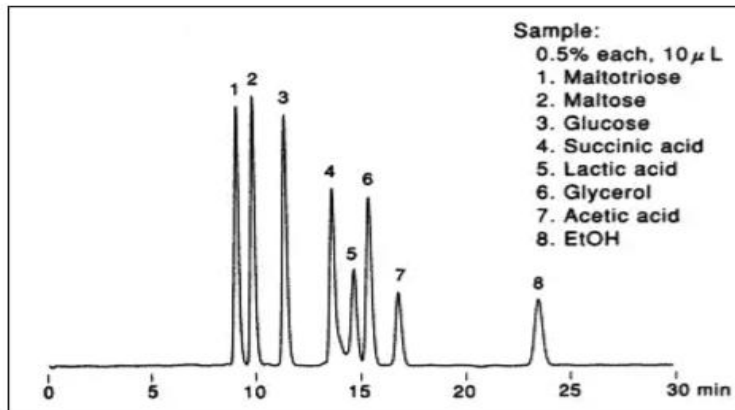


Sample : 0.5% each, 10µL
1. Pullulan P-10, 2. Stachyose
3. Raffinose, 4. Sucrose
5. Lactose, 6. Glucose
7. Lactulose, 8. Galactose
9. Arabinose, 10. Fructose
11. Glycerol, 12. Mannitol
13. Xylitol, 14. Sorbitol

Columns : Shodex SUGAR SP-G 6B (6.0mmI.D. x 50mm) + SP0810 (8.0mmI.D. x 300mm)
Eluent : H₂O
Flow rate : 0.5mL/min
Detector : Shodex RI
Column temp. : 80°C

Saccharides and Organic Acids (2) (SH1011)

Saccharides and sugar alcohols were separated using SUGAR SH1011, a column for saccharides analysis. In acidic eluent such as sulfuric acid solution, dissociation of organic acids is not so much and they are retained in the column by reversed phase mode because of the increase of hydrophobicity. However, since organic acids are partly dissociated, minus charge of packing material and plus charge of organic acids repel each other and, therefore, organic acid whose dissociation is larger elutes faster. This mechanism is called as "ion exclusion mode". Saccharides are eluted by GFC mode.



Sample :
1. Maltotriose
2. Maltose
3. Glucose
4. Succinic acid
5. Lactic acid
6. Glycerol
7. Acetic acid
8. Ethanol

Column : Shodex SUGAR SH1011 (8.0mmI.D. x 300mm)
Eluent : 5mM H₂SO₄ aq.
Flow rate : 0.6mL/min
Detector : Shodex RI
Column temp. : 60°C

Bibliografía

- Abreu Sherrer, J. (2013). Aprovechamiento de bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de bio-hidrógeno, 1–111.
- Abril Díaz, N., Bárcena Ruiz, J. A., Fernández Reyes, E., Galván Cejudo, A., Jorrín Novo, J., Peinado Peinado, J., ... Túnez Fiñana, I. (2010). Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. *Campus Universitario de Rabanales. Departamento de Bioquímica Y Biología Molecular*, 1, 1–8. Retrieved from http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf
- Álvarez, A., Salgado, R., García, E., Domínguez, M., Granandos, J., Aguirre, A., ... Mendoza, A. (2012). Aprovechamiento Integral De Los Materiales Lignocelulósicos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13(4), 140–150. Retrieved from <http://www.ehu.eus/reviberpol/pdf/SEPT12/alvarez.pdf>
- Ávila, R., Rivas, B., Hernández, R., & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease. *Multiciencias*, 12(2), 129–135. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3143>
- Beare, P.A. & Zedler, J.B. (1987). Cattail invasion and persistence in a coastal salt marsh: the role of salinity reduction. *Estuaries*, 10(2):165-170.
- Bonilla-Barbosa, J. R., & Santamaría Araúz, B. (2012). *Flora Del Bajío Y De Regiones Adyacentes*.
- Chávez Fernández, J. (2015). *Caracterizar y cuantificar la lignina contenida en la corona de piña (Ananas comosus) y residuos de café para la elaboración de polímeros biodegradables*.
- Cuervo, L., Folch, J., & Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Bio Tecnología*, 13(3), 11–25. Retrieved from http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Lignocelulosa.pdf
- Denny, P. (1985). Submerged and floating-leaved aquatic macrophytes (euhydrophytes). In: *The Ecology and Management of African Wetland Vegetation*. Dordrecht, Netherlands: W. Junk, 19-42.

- Domínguez Domínguez, M. M., Alvarez-Castillo, A., Castrejón-Rosales, T., Granados Baeza, M. J., Hernández Campos, F. J., Alcalá Octaviano, V. H., ... Tapia Picazo, J. C. (2011). Estudio de la cinética de la hidrólisis ácida de bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento para la obtención de azúcares reductores. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 12(3), 153–159. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3694933&info=resumen&idioma=SPA>
- Dordio, A.V., Belo, M., Martins Teixeira, D., Palace Carvalho, A.J., Dias, C.M.B., Picó, Y. & Pinto, A.P. (2011). Evaluation of carbamazepine uptake and metabolization by *Typha* spp., a plant with *potential use in phytotreatment*. *Biores. Technol.* 112: 7827- 7834.
- Egüés, I., Sanchez, C., Mondragon, I., & Labidi, J. (2012). Effect of alkaline and autohydrolysis processes on the purity of obtained hemicelluloses from corn stalks. *Bioresource Technology*, 103(1), 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.139>
- Fediuc, E., Lips, S.H. & Erdei, L. (2005). O-Acetylserine (thiol) lyase activity in *Phragmites* and *Typha* plants under cadmium and NaCl stress conditions and the involvement of ABA in the stress response. *J. Plant Physiol.* 162: 865-872.
- Finlayson, C.M., Roberts, J., Chick, A.J. & Sale P.J.M. (1983). The biology of Australian weeds. II. *Typha domingensis* Pers. and *Typha orientalis* Presl. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*, 49(1):3-10.
- Foitzich Molina, A. C. (2013). Desarrollo y validación de una metodología para determinar azúcares simples en matrices orgánicas mediante HPLC- IR., 59. Retrieved from <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2014/bmfciu.41i/doc/bmfciu.41i.pdf>
- García, M. T., Alfaro, A., García, J. C., Zamudio, M. A. M., Morales, A. B., & López, F. (2017). Pulp from wheat straw following cold alkaline extraction., 51, 465–475.
- Garrote, Gil, Herminia Domínguez, & Juan Carlos Parajó. (2001). Generation of Xylose Solutions from Eucalyptus Globulus Wood by Autohydrolysis-Posthydrolysis Processes: Posthydrolysis Kinetics. *Bioresource Technology* 79:155–64.
- Gomez Tovar, F. (2008). Métodos secuenciales de pretratamiento químico y enzimático de residuos agrícolas para la producción de metano.
- Granda Albuja, M. G. (2011). *Determinación de azúcares, productos de fermentación e inhibidores de fermentación por HPLC en un proceso de obtención de etanol lignocelulósico*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

- Guarnizo-Franco, Anderson, Martínez-Yepes, P. N., & Pinzón-Bedoya, M. L. (2012). Azúcares del pseudotallo de plátano : una opción para la obtención de alcohol de segunda generación.
- Hegazy, A.K., Adbel Ghani, N.T. & El-Chaghabby, G.A. (2011). Phytoremediation of industrial wastewater potentiality by *Typha domingensis*. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 8 (3), 639- 648.
- Herrera. (2005). Hidrolisis termica del bagazo de la caña de azucar para la produccion de etanol via fermentacion.
- Hu, F., & Ragauskas, A. (2012). Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. *Bioenergy Research*, 5(4), 1043–1066. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9208-0>
- Jeffries, T.W. (1994). Biodegradation of lignin and hemicelluloses. In: Biochemistry of microbial degradation. Ratledge C (ed.) Kluwer, Dordrecht. 233–277.
- León Torres, C., Florián Chamache, P., Mostacero León, J., Arellano Barragan, J., Bardales Vásquez, C., Martin Alva, E., ... Villanueva Polo, F. (2015). Extracción de Azúcares Reductores Totales “ART” de “coronta” de *Zea mays* “maíz amarillo duro.” *Ucv-Scientia*, 3(2), 214–218.
- Maine, M.A., Suñé, N., Hadad, R.H., Sánchez, G.C., Bonetto, C. (2009). Influence of vegetation on the removal of heavy metals and nutrients in a constructed wetland. *J Environ Manag.* 90: 355-363.
- Martínez Leal, M. E. (2016). *Obtención de celulosa de tule (Typha dominguensis) mediante proceso sosa-antraquinona.*
- Martínez, M. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Marwa, S. (2014). *Tratamiento a presión e hidrólisis del hueso de aceituna.* Jaén.
- Medina-Morales, M. A., Lara-Fernández, L., Aguilar, C. N., & de la Garza-Toledo, H. (2011). Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante. *Acta Química Mexicana*, 3(6), 35–41. Retrieved from <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM6/Art 4.pdf>
- Miller G.L. (1959). The use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.

- Monge-Nájera, J., Gómez Figueroa, P., & Rivas Rossi, M. (2005). *Biología General*. San José, Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia.
- Monteiro Machado, C. M. (2010). Situación de los Biocombustibles de segunda y tercera generación en América Latina y Caribe. *Virtual Pro*, (122).
- Morales, S. (2015). Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos, 21–26. Retrieved from http://digital.csic.es/bitstream/10261/132717/1/morales_de_la_rosa_silvia.pdf
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673–686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- Mufarrege, M. (2012). *Tolerancia y eficiencia de Typha domingensis Pers. en la retención de metales y nutrientes de efluentes industriales. (Tesis Doctoral). Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. Argentina*. Retrieved from <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8180/tesis/handle/1/406>
- Niño López, L., Cárdenas, A. A., & Zambrano, R. G. (2013). Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista Facultad de Ingeniería*, (69), 317–326.
- Orellan Nava, Á. D. J. (2017). *Obtención de xilitol a partir de xilosa contenida en los residuos de tule (Typha domingensis) y paja de sorgo (Sorghum vulgare)*. Instituto Tecnológico de Ciudad Madero.
- Pepijn, P. (2010). *Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. The Fungal Population*. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla.
- Ramírez, K., Rojas, O., Alvarado, P., & Vega, J. (2012). Obtención de xilosa a partir de desechos lignocelulósicos de la producción y proceso industrial de la piña (*Ananas comosus*). *Uniciencia*, 75–89.
- Ramírez, M. (2007). Carbohidratos. *Unam, Unidad 3*, 7. Retrieved from http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/p_estudios/apuntes_bioquimica/Unidad_3.pdf
- Rojas, L. (2011). Evaluación de pretratamientos biológicos y térmicos previos a la hidrólisis enzimática de fibra prensada de palma , para la producción de azúcares fermentables, 115.

- Rzedowski, G. C., & Rzedowski, J. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México* (2da ed.). Pátzcuaro, Michoacán, México.: Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Saeman, J. F. (1945). Kinetics of wood saccharification. Hydrolysis of cellulose and decomposition of sugars in dilute acid at high temperature. *Industrial and Engineering Chemistry*, 37, 43–52.
- Sánchez, O. J., & Cardona, C. A. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, 30(11), 22–47.
- Smith, S.G. (2000). Typhaceae. In: *Flora of North America* [ed. by Flora of North America Editorial Committee] New York, USA: Oxford University Press, 278-285.
- Smith, S.M. & Newman, S. (2001). Growth of southern cattail (*Typha domingensis Pers.*) seedlings in response to fire-related soil transformations in the Northern Florida Everglades. *Wetlands*, 21(3):363-369.
- Tena, M., & Jorrín, J. V. (2008). Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería-estudio cinético de la actividad invertasa de levadura de panadería. *Revista Virtual Pro, Panificaci*(72), 1–10.
- Tómas Pejó, M. E. (2009). *Bioetanol De Paja De Trigo: Estrategias De Integración De Las Etapas Del Proceso. Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Universidad Complutense de Madrid.
- Vargas, R. R. A., & Vecchiatti, A. R. (2015). Fermentables a Partir De Eucaliptus Globulus. *Asociación Argentina de Ingenieros Químicos*.
- Wise, L. E., Murphy, M., & ADDIECO, A. A. (1946). Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and studies on the hemicelluloses. *Paper Trade Journal*, 122, 2, 35-43.