



Optimización del pretratamiento peróxido-alcálico para la reducción de lignina en maderas puras empleando un Diseño Box-Behnken

Héctor Daniel Hernández-Ramos¹, Leticia López-Zamora^{1*}

¹ Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Orizaba, División de Estudios de Posgrado e

Investigación, Oriente 9 núm. 852 Emiliano Zapata, C.P. 94320 Orizaba, Veracruz.

*Autor de correspondencia: llopezz02@yahoo.com.mx

Recibido 19 de mayo de 2020; aceptado 19 de junio de 2020

RESUMEN

En el presente trabajo se propone la optimización del proceso de hidrólisis alcalina mediante el uso de residuos de madera de dos diferentes tipos: cedro (RM_C) y pino (RM_P), con el fin de modificar su estructura y buscar la mayor remoción en el porcentaje de lignina presente, que permita una mejor acción enzimática para una mayor conversión en azúcares fermentables. Los RM_C y RM_P se caracterizaron previamente mediante la técnica estandarizada NREL y pretratados mediante hidrólisis ácida, empleando las condiciones óptimas de tiempo, de 30 min, % de H₂SO₄ a 3.45%, y una relación líquido-sólido (RLS) de 3.36 p/v. Para la optimización, se empleó un diseño de experimentos Box-Behnken, donde se consideraron como variables independientes: tiempo del proceso (27, 38.5 y 50 h), concentración de H₂O₂ (6%, 8% y 10% v/v) y RLS (12, 16 y 20 v: p), estableciendo como variable de respuesta el porcentaje de lignina removido durante el proceso. Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos experimentalmente, generando un polinomio de segundo orden, que representa la relación de las variables consideradas y la respuesta, obteniéndose un coeficiente de correlación (R²) del 95.35 % y 95.24 % para los RM_C y

RM_P, respectivamente, garantizando la confiabilidad en la reproducción de las correlaciones experimentales con los valores establecidos. Las condiciones óptimas para los RM_C fueron: 38.1 h, 8.4% de H₂O₂ y una RLS de 16.6 v: p; en tanto que, para los RM_P, las condiciones óptimas fueron: 38.7 h, 8.2% de H₂O₂ y RLS de 18.4 v: p, con una remoción final de lignina de 46% y 36%, respectivamente, con relación al contenido inicial.

PALABRAS CLAVE: biocombustibles, residuos de madera, pretratamiento, lignina.

ABSTRACT

In this work, the optimization of the alkaline hydrolysis process is proposed through the use of wood residues of two different types: cedar (RM_C) and pine (RM_P), in order to modify its structure and seek the highest percentage removal of lignin present, that allows a better enzymatic action for a greater conversion into fermentable sugars. The RM_C and RM_P were previously characterized by means of the standard NREL technique and pretreated by acid hydrolysis, using the optimal conditions of time of 30 min, % H₂SO₄ to 3.45% and an solid-liquid ratio (SLR) of 3.36 v/w. For optimization, a Box-Behnken design of experiments was used, where the independent variables were considered: process time (27, 38.5 and 50 h), H₂O₂ concentration (6%, 8% and 10% v/v) and SLR (12, 16 and 20 v: w), establishing as a response variable the percentage of lignin removed during the process. A statistical analysis of the results obtained experimentally was performed, generating a second order polynomial, which represents the relationship of the variables considered and the response, obtaining a correlation coefficient (R²) of 95.35% and 95.24% for the RM_C and RM_P, respectively, guaranteeing the reliability in the reproduction of the experimental correlations with the established values. The optimal conditions for the RM_C were: 38.1 h, 8.4% H₂O₂ and an SLR of 16.6 v:w; while for the RM_P, the optimal conditions were: 38.7 h, 8.2% H₂O₂ and SLR of 18.4 v:w, with a final removal of lignin of 46% and 36%, respectively, in relation to the initial content.

KEY WORDS: Biofuels, wood waste, pretreatment, lignin.

INTRODUCCIÓN

La actual problemática del cambio climático, la inestabilidad de los precios del petróleo y las políticas de seguridad energética emprendida por muchos países han convertido a los biocombustibles en una potencial fuente de energía alternativa (Alejos et al. 2015); una de las alternativas es la utilización de los residuos lignocelulósicos. Sifontes et al. (2013) mencionan que los materiales lignocelulósicos se refieren a toda la materia orgánica que proviene de árboles, plantas y desechos de animales que pueden ser convertidos en energía, o las provenientes de la agricultura (residuos de maíz, café), del aserradero (podas, ramas, aserrín, cortezas). Los materiales lignocelulósicos que pueden ser usados para la producción de energía cubren un amplio rango de materiales y fuentes, y es que los residuos de la industria forestal y la agricultura, los desechos urbanos y las plantaciones energéticas se usan, generalmente, para procesos modernos de conversión que involucran la generación de energía a gran escala, enfocados hacia la sustitución de combustibles fósiles. Por su parte, González et al. (2013) mencionan que los materiales lignocelulósicos presentan una estructura compuesta principalmente por tres componentes

(celulosa, hemicelulosa y lignina), y que la estructura química, el grado de entrecruzamiento de los componentes que forman los materiales lignocelulósicos y la composición de sus elementos principales están relacionadas con el material de origen del cual proceden. Por lo tanto, el uso de biocombustibles de segunda generación se potencializa. Permingeat (2017) menciona que los biocombustibles de segunda generación son aquellos que se obtienen a partir de biomasa lignocelulósica, la cual procede de residuos de cultivos, de subproductos de la industria alimentaria y forestal. No obstante, Álvarez (2013) menciona que, debido a que su procesamiento es muy complejo, pues estos cultivos se caracterizan por su alta densidad energética almacenada en la celulosa, es común utilizar diversos pretratamientos, entre los que se encuentra el proceso de hidrólisis para poder romper los enlaces químicos presentes en la materia prima. En tanto que Sánchez (2018) menciona que la madera es un material que se extrae del tronco existente debajo de la corteza de los árboles y arbustos que poseen estructura fibrilar. México posee un alto número de especies forestales, ubicándose en el cuarto lugar entre los 17 países denominados megadiversos. Cabe apuntar que

existen dos tipos de maderas: duras y blandas; la madera dura es aquellas que provienen de árboles que tienen un crecimiento lento, lo que hace que pesen más y sean tolerables a las inclemencias del tiempo, además de que poseen mayor dureza y una mejor estética, mientras que la madera blanda es lo contrario, ya que proviene de árboles que tienen un periodo de crecimiento mucho más corto, lo que las hace más ligeras y un con mayor posibilidad de ser conseguidas.

Téllez et al. (2017) mencionan que el estado de Durango, debido a la cubierta de superficie forestal que posee, es considerado uno de los principales productores de residuos de madera; otros estados con menor participación son Chihuahua, Michoacán, Oaxaca y Veracruz.

Y es que procesar los residuos conlleva la utilización de pretratamientos, como es el proceso de hidrólisis, por lo que Jaramillo (2013) señala que la hidrólisis se puede llevar a cabo química o enzimáticamente. Cuando se parte de un material lignocelulósico, el pretratamiento es un paso esencial para la obtención de azúcares fermentables en la etapa de hidrólisis; el objetivo del tratamiento previo es separar la lignina de la celulosa y

hemicelulosa, para hacer a los carbohidratos más accesibles a las enzimas hidrolíticas.

El pretratamiento alcalino se lleva a cabo con soluciones diluidas de NaOH y H₂O₂, provocando una reacción de saponificación que produce un hinchamiento de la biomasa lignocelulósica, conduciendo a un aumento en el área superficial interna y un descenso de la cristalinidad, lo que permite el rompimiento de la estructura de la lignina.

MATERIALES Y MÉTODOS

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de deslignificación de fibras de maderas puras pretratadas con ácido diluido, empleando peróxido de hidrógeno a fin de maximizar la remoción de lignina, lo que permitirá potencializar en procesos posteriores la obtención de azúcares fermentables.

Para el estudio del proceso de hidrólisis alcalina, se consideró como materia prima dos tipos de residuos de madera de cedro (RM_C) y pino (RM_P), los cuales fueron recolectados de una maderería de la zona de Orizaba, Veracruz.

Inicialmente, se aplicó la caracterización de lignocelulósica correspondiente a la materia prima,

determinando el porcentaje de humedad mediante una termobalanza (AMB, modelo 50), así como el porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina mediante la técnica estandarizada NREL.

Ambos residuos se pretrataron con una hidrólisis ácida diluida, considerando las condiciones óptimas obtenidas por Morales (2019) [tiempo = 30 min, % de H₂SO₄ = 3.45% y una RLS = 3.36 p/v], empleando una autoclave (AESA, modelo CV-250, México) para reducir la cantidad de hemicelulosa.

El residuo obtenido del pretratamiento ácido se sometió a un pretratamiento alcalino, para lo cual se empleó un diseño Box-Behnken de tres factores con el fin de optimizar el proceso, y las variables evaluadas fueron: tiempo (X₁), concentración de H₂O₂ (X₂) y relación sólido líquido (X₃), siendo la variable de respuesta el porcentaje de lignina removida. En la tabla 1, se muestran las variables independientes y sus respectivos niveles.

Tabla 1. Variables del diseño Box-Behnken del pretratamiento alcalino

Variables	Símbolo	Niveles		
		-1	0	1

Tiempo [h]	X ₁	27	38.5	50
H₂O₂ [% v/v]	X ₂	6	8	10
RLS [g:mL]	X ₃	12	16	20

La mezcla del residuo con el peróxido, se sometió a agitación para homogenizar y favorecer el contacto; posteriormente, se ajustó el pH a 11.5 con NaOH 10M.

Transcurrido el tiempo de reacción, la muestra es prensada para separar la fracción líquida del sólido, que es lavado con agua corriente hasta alcanzar un pH neutro y luego someterla a secado, utilizando una estufa (Lab-line Instrument Inc, modelo 3471) durante aproximadamente de 2 a 3 h.

Se evaluó la composición lignocelulósica presente en los residuos mediante la técnica estandarizada NREL, mencionada por Sluiter et al, (2012). La lignina soluble se analizó con un espectrofotómetro Thermo Scientific UV-Vis (Genesys 10s), con detector de matriz de diodos a una longitud de 240 nm; la muestra de lignina insoluble se determinó de acuerdo a el método AOCS (Ab 2-49), utilizando una estufa (Lab-line Instrument Inc, modelo 3471), y las cenizas se cuantificaron empleando la metodología AOCS (Ba 5^a-49) en una mufla (Fisher Scientific).

RESULTADOS

La caracterización de la materia prima que se empleó durante este estudio se muestra en la tabla 2, en la que se tomaron muestras del lote inicial.

Tabla 2. Caracterización inicial del material

lignocelulósico

Componente	RM _C	RM _P
Celulosa (%)	50.01	44.35
Hemicelulosa (%)	26.59	29.13
Lignina (%)	14.87	14.18
Humedad (%)	11.41	10.34

Los resultados del contenido de lignina (%), se obtuvieron mediante un diseño de experimentos Box-Behnken, los cuales fueron analizados estadísticamente empleando el software Minitab Inc. 2017 (versión 17.1: MINITAB Inc., State College, PA, USA), siendo la variable de respuesta el porcentaje en el contenido de lignina (%).

La aplicación del RSM al RM_C y RM_P generó un polinomio de regresión de segundo orden para cada residuo (ecuación 1 y 2, respectivamente).

$$\begin{aligned} \%Lignina_{RM_C} = & 74.7 - 1.600X_1 - 2.98X_2 - 2.76X_3 \\ & + 0.02322X_1^2 + 0.417X_2^2 + 0.1448X_3^2 \\ & - 0.0098X_1X_2 - 0.00549X_1X_3 - 0.2201X_2X_3 \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \%Lignina_{RM_P} = & 80.5 - 1.761X_1 - 3.56X_2 - 2.470X_3 \\ & + 0.02513X_1^2 + 0.266X_2^2 + 0.0703X_3^2 \\ & - 0.0179X_1X_2 - 0.00205X_1X_3 - 0.0060X_2X_3 \end{aligned} \quad (2)$$

La significancia estadística de cada uno de los coeficientes fue evaluada por la prueba F de Fisher y el valor *p*, los cuales se muestran en las tablas 3 y 4, con un nivel de confianza del 95 %. El mayor efecto para ambos residuos (RM_C y RM_P) se observa en los términos lineales de concentración de H₂O₂ (X₂) y RLS (X₃).

Tabla 3. Significancia de los coeficientes de regresión para la hidrólisis alcalina de RM_C

Variable	Coefficiente de regresión	Valor F	Valor <i>p</i>
Intercepción	74.7		
X₁	-1.600	0.68	0.448
X₂	-2.98	2.06	0.211
X₃	-2.76	1.71	0.248
X₁²	0.02322	48.87	0.001

X_2^2	0.417	14.42	0.013
X_3^2	0.1448	27.83	0.003
$X_1 X_2$	-0.0098	0.29	0.615
$X_1 X_3$	-0.00549	0.36	0.576
$X_2 X_3$	-0.2201	17.42	0.009

Tabla 4. Significancia de los coeficientes de regresión para la hidrólisis alcalina de RM_P

Variable	Coefficiente de regresión	Valor F	Valor p
Intercepción	80.5		
X_1	-1.761	0.01	0.942
X_2	-3.56	0.35	0.580
X_3	-2.470	24.77	0.004
X_1^2	0.02513	65.80	0.000
X_2^2	0.266	6.76	0.048
X_3^2	0.0703	7.54	0.040
$X_1 X_2$	-0.0179	1.10	0.343
$X_1 X_3$	-0.00205	0.06	0.820
$X_2 X_3$	-0.0060	0.01	0.908

de determinación (R^2) de 0.9535 para el cedro y de 0.9524 para el pino, lo cual indica que el 95.35% y el 95.24% de los datos de las variables se ajustaron al modelo, siendo menor al 5% de la variación total y que no pudo ser explicada por ambos polinomios. En las figuras 1, 2 y 3 se presenta el análisis de superficie de respuesta del RM_C , observándose el comportamiento de las diferentes combinaciones de efectos, donde el menor contenido de lignina se presenta en niveles medios de tiempo (36 h – 42 h), concentración de H_2O_2 (7.5% – 8.5%) y de RLS (15 g:mL – 18 g:mL), obteniendo un contenido de lignina de aproximadamente 8.0207 %.

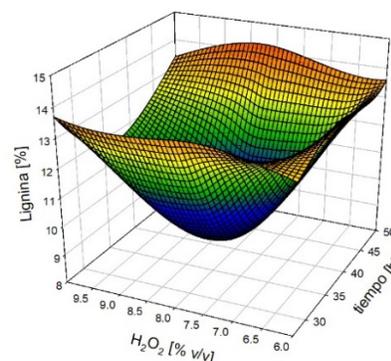


Figura 1. Gráfico de superficie de respuesta tiempo [h] vs H_2O_2 [%v/v].

Ambos modelos presentan un buen ajuste con los datos experimentales, obteniéndose un valor del coeficiente

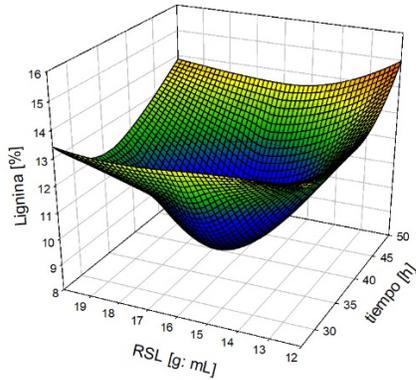


Figura 2. Gráfico de superficie de respuesta tiempo [h] vs RLS [g: mL].

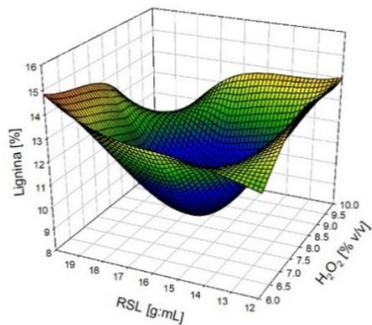


Figura 3. Gráfico de superficie de respuesta H₂O₂ [%v/v] vs RLS [g: mL].

La caracterización de la superficie del modelo de segundo orden (ecuación 1) permitió determinar los puntos estacionarios del proceso que representan la minimización del porcentaje de lignina, siendo estos: tiempo de 38.1 h, concentración de H₂O₂ de 8.4% y RLS de 16.6 g: mL, teniendo un porcentaje de lignina de

8.0207% y una remoción del 46% respecto a lignina presente en la materia prima.

Considerando los puntos estacionarios obtenidos, se generó el modelo canónico (ecuación 3), el cual muestra que los valores propios al ser ambos positivos, que garantizan la minimización del proceso de hidrólisis alcalina para RM_c

$$y = 74.7 + 0.0230w_1^2 + 0.1061w_2^2 + 0.4560w_3^2 \quad (3)$$

En las figuras 4, 5 y 6, se muestra el análisis de superficie de respuesta para RM_p, y notando el comportamiento de las combinaciones de efectos, donde en niveles medios de tiempo (38 h - 42 h), concentración de H₂O₂ (7.8% - 8.5%) y a niveles altos de RLS (15 g: mL - 19 g: mL), se encuentra el menor porcentaje de lignina, obteniendo un contenido de aproximadamente 9.07%.

Con base en el modelo de segundo orden generado (ecuación 2), se determinaron los puntos estacionarios del proceso de hidrólisis, donde se representa la minimización del porcentaje de lignina, siendo un tiempo de 38.7 h, una concentración de H₂O₂ de 8.2% y una RLS de 18.4 g: mL, con un porcentaje de lignina de 9.07% y una remoción del 36% respecto a lignina original presente en la materia prima

A partir de los puntos estacionarios obtenidos, se pudo generar el modelo canónico (ecuación. 4), en el que se muestra que los valores propios, al resultar positivos, generan la minimización del proceso de hidrólisis alcalina para RM_p.

$$y = 80.5 + 0.0248w_1^2 + 0.0703w_2^2 + 0.2664w_3^2 \quad (4)$$

Kawakubo (2010) realizó dos pretratamientos sobre materiales lignocelulósicos, empleando dos diferentes porcentajes de NaOH (3% y 5%) y generando porcentajes en el contenido de lignina de 23.7% y 12.1%, respectivamente, alcanzando en este estudio, respecto a los RM_C, una remoción superior al 66% a lo trabajado con el 3% de NaOH, y 33.73% respecto al 5% de concentración, lo que incrementa sustancialmente la eficiencia del proceso.

Jaramillo (2017) realizó un estudio en el que se determinó el efecto de pretratamientos químicos sobre la composición química y cristalinidad en los materiales lignocelulósicos, donde se empleó madera de cedro como materia prima, obteniendo una remoción de 46.7% de lignina y utilizando una hidrólisis ácida; después, una hidrólisis alcalina mediante el uso de

peróxido de hidrógeno, notando un 1.4 % de remoción respecto a este estudio.

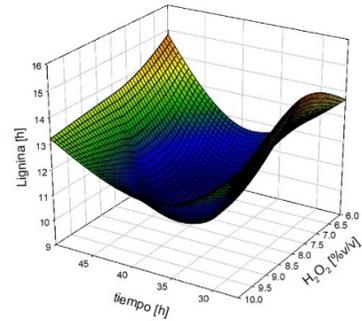


Figura 4. Gráfico de superficie de respuesta tiempo [h] vs H₂O₂ [%v/v].

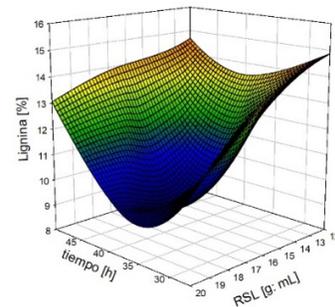


Figura 5. Gráfico de superficie de respuesta tiempo [h] vs RLS [g: mL].

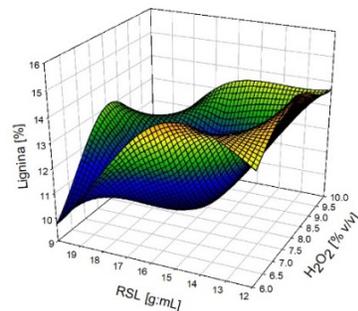


Figura 6. Gráfico de superficie de respuesta H₂O₂ [%v/v] vs RLS [g: mL].

En tanto que, para la RM_P, el pretratamiento generó 10.2% mayor remoción de lignina contra el estudio realizado por Benitez (2018), quien empleó altas concentraciones de H₂O₂ para deslignificar residuos de madera de pino, obteniendo un porcentaje final de lignina del 10.11%. Por su parte, Stoffel (2014) estudió los residuos generados en la industrialización primaria para un fraccionamiento de la biomasa, utilizando pretratamientos previos ácidos y alcalinos, removiendo el 27.5% de lignina, 23.61% menor al obtenido en este estudio.

CONCLUSIONES

A partir de este estudio, se concluye que el diseño de Box-Behnken es una herramienta eficaz en la optimización de las condiciones de hidrólisis alcalina para madera pura de cedro (RM_C) y de pino (RM_P). El modelo matemático de segundo orden para el RM_C estimó un 8.02% de lignina, en tanto que para el RM_P fue del 9.07, lo que corresponde a una remoción del 46% y 36%, respectivamente. Asimismo, cabe apuntar que condiciones muy semejantes de tiempo y concentración de H₂O₂ se requieren para ambos residuos, en tanto que los RM_C emplean una RLS

10.17% menor, esto debido a que la materia prima tiene como característica principal ser muy absorbente, sin embargo, existe un porcentaje menor de aceptación al momento de llevar a cabo la hidrólisis. Además, la eliminación efectiva de la lignina permite garantizar una mayor exposición de celulosa, lo que permitiría, a su vez, una mayor conversión a azúcares fermentables.

BIBLIOGRAFÍA

- Alejos C, Calvo, E. (2015). Biocombustible de primera generación. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 2, pp. 19-30.
- Álvarez, C. (2013). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico. *Economía Informa*, 359, pp. 63-89.
- Benítez J, Sarria-Villa J, Gallo R. (2018). Condiciones óptimas de deslignificación del aserrín de Pinus patula como etapa crucial en la obtención de bioetanol. *Informador Técnico*, 82(2), pp. 160-171
- González, G., García, M. (2013). Obtención de Bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo. Fermentación conjunta de los penta y hexa carbohidratos con *Pichia stipitis*. (Tesis Doctoral). Universidad de Valladolid, España

- González, R. (2017). Alternative uses of sawmill industry waste. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 23(2), 243-260.
- Jaramillo, O. (2013). *Hidrólisis ácida de materiales lignocelulósicos y detoxificación por pervaporación*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia. Manizales Colombia
- Jaramillo, T., Morales, V., Quintero D. (2017). *Evaluación de pretratamientos químicos sobre materiales lignocelulósicos*. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 25(4), pp. 733-743.
- Kawakubo, T., Karita, S., Araki, Y., Watanabe, S., Takada, R., Tanaka, F. (2010). *Analysis of exposed cellulose surfaces in pretreated wood biomass using carbohydrate -Blinding Module (CMB) – Cyan Fluorescent Protein (CFP)*. *Biotechnology and Bioengineering*, 105 (3), pp. 499-508
- Permingeat, H. (2017). Biocombustibles de segunda generación 2020 de Aapresid Sitio web: <https://www.aapresid.org>.
- Sánchez, V. (2018), Tipos de Maderas: Características y Clasificación. *Ecología Verde*, 14, pp. 24-35
- Sifontes, M., Domine, M. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería* 4, pp. 15-46.
- Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Templeton D., Crocker D., (2012). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, laboratory analytical procedure (LAP). *Technical Report NREL/TP-510-42618*.
- Stoffel, R., Felissia, F., Silva, A., Gassa, L., Area, M. (2014). Optimization of sequential alkaline-acid fractionation of pine sawdust for a biorefinery. *Industrial Crops and Products*, 61, pp. 160-168.