

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Ciudad Madero

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



**“FRAGMENTACIÓN DE LA LIGNINA DEL CAFÉ
(*COFFEA ARABICA*) PARA LA OBTENCIÓN DE
COMPUESTOS FENÓLICOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Química

PRESENTA:

Ing. Angélica de María Mendoza Macías

G14073008

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Hugo de Alva Salazar

CO-DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Minerva Ana María Zamudio Aguilar

CIUDAD MADERO, TAMAULIPAS

NOVIEMBRE 2016

Cd. Madero, Tamps; a **11 de Noviembre de 2016.**

OFICIO No.: U1.403/16
AREA: DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS

ING. ANGÉLICA DE MARÍA MENDOZA MACÍAS
NO. DE CONTROL G14073008
PRESENTE

Me es grato comunicarle que después de la revisión realizada por el Jurado designado para su examen de grado de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química, el cual está integrado por los siguientes catedráticos:

PRESIDENTE :	DR. HUGO EDUARDO DE ALVA SALAZAR
SECRETARIO :	DRA. MINERVA ANA MARÍA ZAMUDIO AGUILAR
VOCAL :	DRA. ANA BEATRIZ MORALES CEPEDA
SUPLENTE:	DR. TOMÁS LOZANO RAMÍREZ
DIRECTOR DE TESIS :	DR. HUGO EDUARDO DE ALVA SALAZAR
CO-DIRECTORA DE TESIS:	DRA. MINERVA ANA MARÍA ZAMUDIO AGUILAR

Se acordó autorizar la impresión de su tesis titulada:

**"FRAGMENTACIÓN DE LA LIGNINA DEL CAFÉ (Coffea arábica)
PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS"**

Es muy satisfactorio para la División de Estudios de Posgrado e Investigación compartir con Usted el logro de esta meta.

Espero que continúe con éxito su desarrollo profesional y dedique su experiencia e inteligencia en beneficio de México.

ATENTAMENTE

"POR MI PATRIA Y POR MI BIEN"®


DRA. ADRIANA ISABEL REYES DE LA TORRE
JEFA DE LA DIVISIÓN



S. E. P.
DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN

c.c.p.- Minuta
Archivo

AIRT 'RSR' jar



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



Dedicatorias

Le dedico este trabajo a cada una de las personas que contribuyeron de alguna manera para la culminación exitosa del mismo, y también a los que en algún momento no creyeron en mí, no me apoyaron y hasta pusieron piedras en el camino.... Pero finalmente pude lograrlo.

Agradecimientos

Primeramente a Dios por haberme dado la oportunidad de estar aquí y de vivir esta experiencia tan enriquecedora en el ámbito personal y profesional.

A mis padres Raúl Sergio Mendoza Garcilazo y Angélica Macías de Mendoza, por su invaluable e incondicional apoyo durante todo este proceso. Gracias por inculcarme los valores para ser una persona de bien, y sobre todo gracias por todo su amor y su cariño.

A mis hermanos Raúl Sergio y Luis Fernando, por su apoyo y cariño, los quiero mucho.

A mi futuro compañero para toda la vida, Omar Alejandro González, por tu gran amor, cariño, paciencia, y sin duda por escucharme y apoyarme en todo momento. Sin ti no lo hubiera logrado. Te amo mucho.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo para poder cumplir una de mis metas profesionales: obtener una maestría.

Al cuerpo docente y de apoyo de la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Ciudad Madero; en especial por su apoyo, sus enseñanzas y su seguimiento a mi director de tesis y co-directora de tesis, el Dr. Hugo de Alva y la Dra. Minerva Zamudio, respectivamente. Así mismo, a la Dra. Ana Beatriz Morales, la Dra. Estefanía Ángeles y la Dra. Nancy Díaz por su colaboración para el desarrollo de la maestría. Y no pueden faltar mis compañeros de generación el Ing. Luis Maclesh e Ing. Marcos Estrada; gracias por sus consejos, su confianza y su cariño.

A mis compañeros y cuerpo docente del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Monterrey, en especial al Dr. Roberto Parra, la Dra. Magdalena Rostro, el Dr. José Rodríguez y el Dr. Diego Esquivel por la oportunidad que me brindaron para el desarrollo de la parte experimental y por su cálido y amable recibimiento en su equipo de trabajo. Me llevo mucho aprendizaje de su parte. Mención especial al Dr. Diego por nuestra

amistad de casi 10 años y te agradezco todo tu invaluable apoyo porque gracias a ti pude realizar la estancia nacional y terminar de forma exitosa mi tesis.

A la Dra. Beatriz Moreno del Instituto Tecnológico de Nuevo León, gracias por su cálido y amable recibimiento cuando lo necesité. Sin duda es una excelente persona y agradezco su apoyo y sus enseñanzas. Finalmente, agradezco al Dr. Luis Francisco Ramos de Valle del Centro de Investigación en Química Aplicada por responder mis dudas y por su apoyo y contribución al desarrollo de mi proyecto.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO	5
1.1 Biorefinería.....	5
1.1.1 Concepto de biorefinería.....	5
1.2 Materias primas en la biorefinería.....	7
1.2.1 Biomasa residual.....	8
1.2.1.1 Biomasa residual para obtención de lignina.....	9
1.2.1.2 Café (<i>Coffea arabica</i>).....	10
1.3 Productos de las biorefinerías.....	11
1.3.1 Bioproductos.....	12
1.3.1.1 Bioproductos basados en lignina.....	12
1.4 Biorefinería de la biomasa lignocelulósica.....	12
1.5 Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica.....	13
1.5.1 Componentes estructurales.....	15
1.5.1.1 Celulosa.....	15
1.5.1.2 Hemicelulosa.....	16
1.5.1.3 Lignina.....	18
1.6 Pretratamientos de biomasa lignocelulósica para fraccionamiento de lignina.....	24
1.6.1 Pretratamiento alcalino de fraccionamiento de lignina con antraquinona.....	28
1.7 Métodos de fragmentación de lignina.....	28
1.7.1 Fragmentación por hidrólisis térmica.....	28

1.7.1.1 Rompimiento del enlace éter β -O-4.....	30
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA.....	31
2.1 Materiales.....	31
2.2 Obtención de la lignina.....	32
2.2.1 Caracterización de la materia prima de residuos de café (<i>Coffea arabica</i>).....	32
2.2.1.1 Preparación de la muestra del material vegetal (Tappi T-257).....	33
2.2.1.2 Determinación de humedad del material vegetal (Tappi T-412-OM-11).....	33
2.2.2 Método de reacción de pulpeo alcalino como pretratamiento para el fraccionamiento de lignina	35
2.2.3 Separación y purificación de la lignina.....	37
2.2.3.1 Cálculo de concentración de lignina presente en el licor negro por el método de centrifugación.....	39
2.3 Fragmentación de la lignina.....	40
2.3.1 Reacción de hidrólisis térmica alcalina.....	40
2.3.1.1 Diseño de experimentos.....	41
2.3.2 Separación y purificación de compuestos fenólicos, cenizas y lignina residual.....	42
2.4 Caracterización de la lignina y del aceite fenólico.....	45
2.4.1 Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).....	46
2.4.2 Cromatografía de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas.....	47
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
3.1 Caracterización de la materia prima de residuos de café (<i>Coffea arabica</i>).....	51
3.1.1 Humedad (Tappi T-412 OM-11).....	51
3.2 Rendimiento de lignina obtenida.....	52
3.3 Rendimientos de aceite fenólico, cenizas y lignina residual.....	54
3.4 Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).....	71
3.5 Cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS).....	78
3.5.1 Identificación de compuestos fenólicos.....	83
3.5.2 Cuantificación de compuestos fenólicos.....	122

3.5.2.1 Modelo matemático.....	125
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES.....	130
BIBLIOGRAFÍA.....	135

Índice de figuras

	PÁGINA
CAPÍTULO 1	
Figura 1.1 Procesamiento térmico y bioquímico de la biomasa lignocelulósica.....	6
Figura 1.2 Imagen ilustrativa de la planta <i>Coffea arabica</i>	11
Figura 1.3 Esquema de biorefinería basada en biomasa lignocelulósica.....	13
Figura 1.4 Diagrama ilustrativo de la distribución de los compuestos lignocelulósicos en la pared celular de las plantas.....	14
Figura 1.5 Componentes y estructura de la fibra de celulosa.....	16
Figura 1.6 a) Estructura de O-acetil-(4-O-metil-glucorono)xilano de la madera, b) Estructura de O-acetil-galactoglucomanano, c) Estructura de xilano.....	17
Figura 1.7 Ejemplo de estructura química de la lignina.....	18
Figura 1.8 Esquema de la ruta de biosíntesis de la lignina en la pared celular.....	19
Figura 1.9 Unidades y monómeros básicos de la lignina.....	20
Figura 1.10 Esquema representativo de diferentes procesos de transformación de la lignina.....	21
Figura 1.11 Principales rupturas de enlaces en la lignina durante su despolimerización y fragmentación en monómeros de tipo aromático.....	22
Figura 1.12 Esquema de procesos termoquímicos para la fragmentación de la lignina y sus productos potenciales.....	23
Figura 1.13 Ejemplos de compuestos fenólicos resultantes de la fragmentación por hidrólisis térmica de la lignina. (1) Fenol, (2) 4-Metilcatecol, (3) Catecol, (4) p-Cresol, (5) m-Cresol, (6) o-Cresol.....	24
Figura 1.14 Esquema de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para el fraccionamiento de lignina.....	25
Figura 1.15 Fragmento de lignina con enlace éter β -O-4.....	30
CAPÍTULO 2	
Figura 2.1 Secuencia de estándares TAPPI para análisis en caracterización química de la materia prima en la industria de la pulpa y papel.....	32

Figura 2.2 Material vegetal de residuos de café (<i>Coffea arabica</i>)	33
Figura 2.3 Muestra seca de residuos de café.....	34
Figura 2.4 Reacción de obtención de lignina en reactor Parr 5100.....	36
Figura 2.5 Licor negro obtenido a partir de la reacción de obtención de lignina de los residuos de café	37
Figura 2.6 Secuencia de metodología para la obtención de la lignina.....	38
Figura 2.7 Proceso de separación y purificación de la lignina del café.....	39
Figura 2.8 Secuencia de metodología para la fragmentación de la lignina.....	43
Figura 2.9 Proceso de separación y purificación de aceite fenólico.....	44
Figura 2.10 Proceso de separación de cenizas y lignina residual	45
Figura 2.11 Espectrómetro FTIR marca Thermo Scientific y modelo Nicolet iS10.....	46
Figura 2.12 Soluciones de compuestos fenólicos comerciales para la curva de Calibración.....	48
Figura 2.13 Secado y concentración de muestras de aceite fenólico mediante flujo de nitrógeno con el equipo Reacti Therm III de Thermo Scientific.....	49
Figura 2.14 Cromatógrafo de gases marca Agilent 6890 Series acoplado a un espectrómetro de masas marca Agilent 5973 Network.....	50

CAPÍTULO 3

Figura 3.1 Lignina residual y cenizas de cada muestra a 160°C y 60 y 120 min.....	57
Figura 3.2 a) Mezcla de lignina residual y cenizas y b) cenizas de cada muestra a 200 °C y 60 y 120 min.....	58
Figura 3.3 a) Muestras de mezcla de lignina residual y cenizas y b) cenizas de cada muestra a 225 °C y 60 y 120 min.....	59
Figura 3.4 Muestras de aceite fenólico a 160 y 200 °C.....	59
Figura 3.5 Porcentaje de rendimiento de los subproductos de la fragmentación de la lignina a 200°C.....	63
Figura 3.6 Porcentaje de rendimiento de los subproductos de la fragmentación de la lignina a 200 °C.....	64
Figura 3.7 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de la temperatura y tiempo en la respuesta de lignina residual.....	65

Figura 3.8 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de la temperatura y tiempo en la respuesta de cenizas.....	66
Figura 3.9 Porcentaje de rendimiento de los subproductos de la fragmentación de la lignina a 225 °C.....	68
Figura 3.10 Predicción de rendimiento de aceite fenólico vs Temperatura y Tiempo. mediante gráfica de contorno.....	70
Figura 3.11 Espectro FTIR de una muestra de lignina obtenida a partir de residuos del café (<i>Coffea arabica</i>).....	71
Figura 3.12 Espectro FTIR de una muestra de aceite fenólico a 160 °C y 120 min.....	72
Figura 3.13 Espectro FTIR de una muestra de aceite fenólico a 160 °C y 60 min.....	73
Figura 3.14 Espectro FTIR de una muestra de aceite fenólico a 200 °C y 120 min.....	74
Figura 3.15 Espectro FTIR de una muestra de aceite fenólico a 200 °C y 60 min.....	75
Figura 3.16 Espectro FTIR de una muestra de aceite fenólico a 225 °C y 120 min.....	76
Figura 3.17 Espectro FTIR de una muestra de aceite fenólico a 225 °C y 60 min.....	77
Figura 3.18 Cromatograma de los compuestos fenólicos comerciales en solución de acetato de etilo a 100 ppm.....	78
Figura 3.19 Curva de calibración del Fenol estándar a 5 concentraciones.....	80
Figura 3.20 Curva de calibración del m-cresol estándar a 5 concentraciones.....	80
Figura 3.21 Curva de calibración del siringol estándar a 5 concentraciones.....	81
Figura 3.22 Curva de calibración del guayacol estándar a 5 concentraciones.....	81
Figura 3.23 Curva de calibración del catecol estándar a 5 concentraciones.....	82
Figura 3.24 Curva de calibración del 4-metilcatecol estándar a 5 concentraciones.....	82
Figura 3.25 Cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 120 min.....	84
Figura 3.26 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 120 min, en pico de Fenol a 8.563 min.....	85
Figura 3.27 Comparación entre los espectros de masas de fenol y del pico a 8.563 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 120 min.....	86
Figura 3.28 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 120 min, en pico de Siringol a 18.974 min.....	87

Figura 3.29 Comparación entre los espectros de masas de siringol y del pico a 18.974 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 120 min.....	88
Figura 3.30 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 120 min, en pico de Vainillina a 20.214 min.....	89
Figura 3.31 Comparación entre los espectros de masas de Vainillina y del pico a 20.214 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 120 min.....	90
Figura 3.32 Cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 60 min.....	91
Figura 3.33 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 60 min, en pico de Catecol a 14.88 min.....	92
Figura 3.34 Comparación entre los espectros de masas de Catecol y del pico a 14.88 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 60 min.....	93
Figura 3.35 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 60 min, en pico de Acetovainillina a 22.42 min.....	94
Figura 3.36 Comparación entre los espectros de masas de Acetovainillina y del pico a 22.42 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 60 min.....	95
Figura 3.37 Cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 120 min.....	96
Figura 3.38 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 120 min, en pico de Fenol a 8.59 min.....	97
Figura 3.39 Comparación entre los espectros de masas de Fenol y del pico a 8.59 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 120 min.....	98
Figura 3.40 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 120 min, en pico de Guayacol a 11.67 min.....	99
Figura 3.41 Comparación entre los espectros de masas de Guayacol y del pico a 11.67 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la	

lignina a 200 °C y 120 min.....	100
Figura 3.42 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 120 min, en pico de Acetovainillina a 22.43 min.....	101
Figura 3.43 Comparación entre los espectros de masas de Acetovainillina y del pico a 22.43 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 120 min.....	102
Figura 3.44 Cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 60 min.....	103
Figura 3.45 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 60 min, en pico de Siringol a 18.97 min.....	104
Figura 3.46 Comparación entre los espectros de masas de Siringol y del pico a 18.97 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 60 min.....	105
Figura 3.47 Cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 120 min.....	106
Figura 3.48 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 120 min, en pico de Fenol a 8.61 min.....	107
Figura 3.49 Comparación entre los espectros de masas de Fenol y del pico a 8.61 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 120 min.....	108
Figura 3.50 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 120 min, en pico de Guayacol a 11.68 min.....	109
Figura 3.51 Comparación entre los espectros de masas de Guayacol y del pico a 11.68 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 120 min.....	110
Figura 3.52 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 120 min, en pico de Siringol a 18.99 min.....	111
Figura 3.53 Comparación entre los espectros de masas de Siringol y del pico a 18.99 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 120 min.....	112
Figura 3.54 Cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a	

225 °C y 60 min.....	113
Figura 3.55 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de lignina a 225 °C y 60 min, en pico de Fenol a 8.67 min.....	114
Figura 3.56 Comparación entre los espectros de masas de Fenol y del pico a 8.67 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 60 min.....	115
Figura 3.57 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 60 min, en pico de Guayacol a 11.71 min.....	116
Figura 3.58 Comparación entre los espectros de masas de Guayacol y del pico a 11.71 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 60 min.....	117
Figura 3.59 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 60 min, en pico de Siringol a 18.97 min.....	118
Figura 3.60 Comparación entre los espectros de masas de Siringol y del pico a 19.10 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 60 min.....	119
Figura 3.61 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de la temperatura y tiempo en la respuesta de Fenol.....	126
Figura 3.62 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de la temperatura y tiempo en la respuesta de Guayacol.....	127
Figura 3.63 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de la temperatura y tiempo en la respuesta de Siringol.....	128

Índice de tablas

PÁGINA

CAPÍTULO 1

Tabla 1.1 Biomasa residual procedente de los sectores primario, secundario y terciario.....	9
Tabla 1.2 Porcentaje de lignina a partir de material libre de extracto por extracción Soxhlet, usando como materia prima cinco muestras de plantas.....	10
Tabla 1.3 Principales aplicaciones de los polímeros presentes en plantas.....	11
Tabla 1.4 Pretratamientos químicos (libres de sulfuro) de biomasa lignocelulósica.....	27

CAPÍTULO 2

Tabla 2.1 Variables del método de hidrólisis térmica para fragmentar la lignina.....	41
Tabla 2.2 Diseño de experimentos de las condiciones de hidrólisis térmica para la fragmentación de la lignina.....	42
Tabla 2.3 Condiciones de preparación de soluciones de 10 ml a diferentes concentraciones para la curva de calibración en GC-MS.....	47

CAPÍTULO 3

Tabla 3.1 Porcentaje de humedad y sequedad en los residuos de café (<i>Coffea arabica</i>).....	52
Tabla 3.2 Resultados de rendimiento de lignina de cada tubo por el método de centrifugación.....	53
Tabla 3.3 Cantidad de cenizas y lignina residual (en gramos) de las 18 muestras a 160, 200 y 225 °C, y a 60 y 120 min.....	55
Tabla 3.4 Porcentaje de rendimiento de cenizas y lignina residual de las 18 muestras a 160, 200 y 225 °C, y a 60 y 120 min.....	56
Tabla 3.5 Promedio de porcentaje de rendimiento de cenizas y lignina residual (en gramos) a 160, 200 y 225 °C, y a 60 y 120 min.....	56
Tabla 3.6 Cantidad de aceite fenólico (en mililitros) de las 18 muestras a 160, 200 y 225 °C, y a 60 y 120 min.....	60
Tabla 3.7 Peso de aceite fenólico (en gramos) de las 18 muestras a 160, 200 y 225	

°C, y a 60 y 120 min.....	61
Tabla 3.8 Porcentaje de rendimiento de aceite fenólico de las 18 muestras a 160, 200 y 225 °C, y a 60 y 120 min.....	61
Tabla 3.9 Promedio de porcentaje de rendimiento de cenizas y lignina residual a 160, 200 y 225 °C, y a 60 y 120 min.....	62
Tabla 3.10 Promedio de porcentaje de rendimiento de aceite fenólico a 160, 200 y 225 °C, y a 60 y 120 min.....	62
Tabla 3.11 Respuesta (Abundancia) de las muestras de compuestos fenólicos estándar a diferentes concentraciones.....	79
Tabla 3.12 Ejemplos y estructura de algunos compuestos químicos con estructura fenólica encontrados en las muestras de aceite fenólico.....	121
Tabla 3.13 Resultados de cuantificación de los compuestos fenólicos de interés encontrados en cada tipo de muestra de aceite fenólico.....	123

RESUMEN

La búsqueda de nuevos biocombustibles y biomateriales es actualmente una alternativa importante para sustituir los derivados del petróleo y una manera para obtener polímeros biodegradables y así reducir los problemas de contaminación. La biomasa lignocelulósica (lignina, celulosa y hemicelulosa) constituye una materia prima prometedora para su transformación en biomateriales a través de un proceso de biorefinería.

Teniendo esto en cuenta, se propone un proceso de biorefinería a escala de laboratorio para la obtención de compuestos fenólicos y tener una base experimental para su potencial uso en la producción de productos de alto valor agregado, incluyendo polímeros biodegradables. Se consideró biomasa residual agrícola como candidato interesante para ser utilizado como materia prima debido a su abundancia, su bajo precio y su potencial uso como material reciclado con fines ecológicos. En este sentido, los residuos de café se utilizan como materia prima en el estudio desarrollado.

El proceso de biorefinería propuesto se compone de obtención, fragmentación y caracterización de la lignina y los compuestos fenólicos. La obtención de lignina se establece de acuerdo con el método actual de pulpeo alcalino, que utiliza la hidrólisis para la ruptura de la biomasa lignocelulósica y es un pretratamiento para el fraccionamiento de la lignina. Después de la reacción, se utiliza un método de purificación para obtener la lignina pura. La fragmentación de lignina se propone por hidrólisis térmica alcalina, con la sosa cáustica como el principal producto químico para la fragmentación. Tres diferentes temperaturas (160 °C, 200 °C y 225 °C) y en dos tiempos diferentes (60 y 120 min) se utilizan como parte del diseño experimental para conocer cuál de estas condiciones tiene los mejores resultados de rendimiento.

Finalmente, después de un proceso de purificación y separación, se obtiene un aceite con los compuestos fenólicos. La caracterización se realiza mediante espectroscopia FTIR y GC-MS para identificar los grupos funcionales y confirmar la presencia de los compuestos fenólicos de interés mediante su identificación y cuantificación.

ABSTRACT

The search for new biofuels and biomaterials is currently an important alternative to substitute oil derivatives and a way to obtain biodegradable polymers to reduce pollution. Lignocellulosic biomass (lignin, cellulose and hemicellulose) constitutes a promising raw material for its transformation in biomaterials through a biorefinery process.

Having this in mind, a lab-scale biorefinery process is proposed to obtain phenolic compounds and to use the results as an experimental basis for their potential use in production of high added value products, including biodegradable polymers. Residual biomass was considered as an interesting candidate to be used as raw material because of its abundance, low cost and its potential use for recycled material with ecological purposes. In this sense, coffee residues (*Coffea arabica*) are used as raw material in this study.

The proposed biorefinery process is composed of lignin extraction, lignin fragmentation and characterization of lignin and phenolic compounds. Lignin extraction is established according to the actual method of alkaline pulping, which uses hydrolysis for the breaking of the lignocellulosic biomass and it's a pretreatment for lignin fractionation. After the reaction, a purification process is applied to obtain pure lignin. Lignin fragmentation is established according to the method of alkaline thermal hydrolysis, with the use of caustic soda as the main chemical product for the fragmentation. Three different temperatures (160 °C, 200 °C and 225 °C) and two different times (60 and 120 minutes) are used as part of the experimental design to know which of these conditions have the best yield results.

Finally, after a purification and separation process, an oil with the phenolic compounds is obtained. For the characterization, the following equipment will be used: FTIR spectroscopy and GC-MS. The first one is to identify the functional groups, and the second is to confirm the presence of the phenolic compounds of interest through their identification and quantification.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos químicos derivados del petróleo son necesarios en numerosos procesos industriales. Sin embargo, el modelo de desarrollo social actualmente predominante a nivel mundial, en lo que a la utilización de los recursos naturales se refiere, resulta insostenible por estar basado primordialmente en la utilización de combustibles fósiles, que además, llevan asociados problemas como el cambio climático derivado de la liberación de dióxido de carbono a la atmósfera y el desarrollo de una cultura de consumo asentada en la explotación de dichos recursos no renovables. [1]

Para construir la economía mundial en una base sostenible, se necesita encontrar un reemplazo a los combustibles fósiles mediante la exploración de nuevos métodos para la conversión de la abundante y renovable biomasa en biocombustibles y productos químicos de alto valor agregado. [1]

En este sentido, la biomasa lignocelulósica, y en particular la de elevada capacidad de producción, se revela como una fuente de materias primas ubicua y sostenible, cada vez más necesaria para reemplazar a los químicos derivados del petróleo. Las tres fracciones químicas principales constituyentes del material lignocelulósico: celulosa, hemicelulosa y lignina, por si solos o sus derivados, permiten obtener productos de mayor valor añadido y en multitud de campos con un esquema similar a la refinería del petróleo. [2]

De la fracción polifenólica o lignina, existe el uso tradicional como combustible que se aplica en el sector de la pasta celulósica y el papel y que supone una valorización energética de la fracción residual. Sin embargo, cobran cada vez más auge las posibilidades de uso de la lignina en el sector de materiales (tableros), derivados de esteroides con aplicaciones en farmacia o alimentación funcional, antioxidantes, como dispersante en mezclas de cemento y yeso, como emulsificador y como agente quelante para remover metales pesados de efluentes industriales. [2]

La lignina es la fuente más abundante de compuestos aromáticos en la naturaleza y puede generar una gran cantidad de reactivos químicos o adhesivos sin la necesidad de utilizar el petróleo. Este es el caso de las resinas de fenol-formaldehído, en el que el fenol puede ser reemplazado por lignina, el cual es más fácilmente disponible, y es menos tóxico y menos costoso que el fenol que proviene de los derivados del petróleo. Sin embargo, la estructura aromática de la lignina debiera ser mayormente explotada para producir compuestos de bajo peso molecular y que éstos puedan ser utilizados como materia prima para convertirlos en productos químicos. [3]

Como la lignina se basa en una estructura polifenólica, construida a partir de tres unidades fenilpropánicas (Alcohol sinapílico, alcohol coniferílico y alcohol p-cumarílico), resulta de suma utilidad el desarrollo de un proceso que permita la despolimerización de la lignina para romper su estructura y así obtener compuestos con estructura fenólica. De esta manera, la lignina puede ser una fuente natural y renovable para la obtención de compuestos fenólicos a través de un proceso de transformación integral, conocido como biorefinería. [4]

El camino hacia un desarrollo sostenible y la renovación de los recursos, pasa por la búsqueda/utilización de nuevas fuentes de recursos y productos químicos y de consumo donde la biomasa forestal lignocelulósica y en particular la de alta capacidad de producción, se revela como una fuente “necesaria” de materias primas dada su ubicuidad, disponibilidad y carácter “poco contaminante”. Su aprovechamiento completo permitiría la disposición de una tremenda variedad de productos químicos, cuyo desarrollo tecnológico precisa de la integración de todas las etapas, desde el cultivo y recolección hasta las etapas de fraccionamiento y conversión a diferentes productos. [5]

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1. Biorefinería

1.1.1. Concepto de biorefinería

El concepto de biorefinería implica utilizar integralmente la biomasa lignocelulósica para la producción de biocombustibles, celulosa, hemicelulosas, lignina y productos derivados, siendo la primordial finalidad el reemplazar los combustibles fósiles. [6]

La situación actual indica que la demanda de alimentos, energía, movilidad, materiales químicos y otros, se incrementará en un futuro cercano. Actualmente del 80 al 90% de las fuentes fósiles son empleadas para producción de energía y transportación, entendiéndose de esta forma la necesidad de innovar tecnología y procesos que permitan el uso adecuado de los lignocelulósicos, bajo el concepto de la biorefinería, cuyo auge ha venido a darse por lo anterior comentado. [6]

El uso efectivo de la biomasa, principalmente materiales lignocelulósicos, implica la investigación, innovación e implementación de biorefinerías multiproceso. Siendo necesario identificar dos ideas importantes: la primera es establecer una cadena de valor, donde en cada eslabón de la cadena se identifiquen y aislen los compuestos de valor agregado mientras que la biomasa remanente sea después convertida a un sustrato universal de donde puedan obtenerse otros compuestos, y la segunda, implica una cadena de procesos integrados, siguiendo de forma análoga a la industria petroquímica, donde el sustrato es primero convertido a bloques de compuestos donde otros compuestos químicos son obtenidos. Algunos de los procesos termoquímicos y bioquímicos del material lignocelulósico, se observan en la figura 1.1. [7]

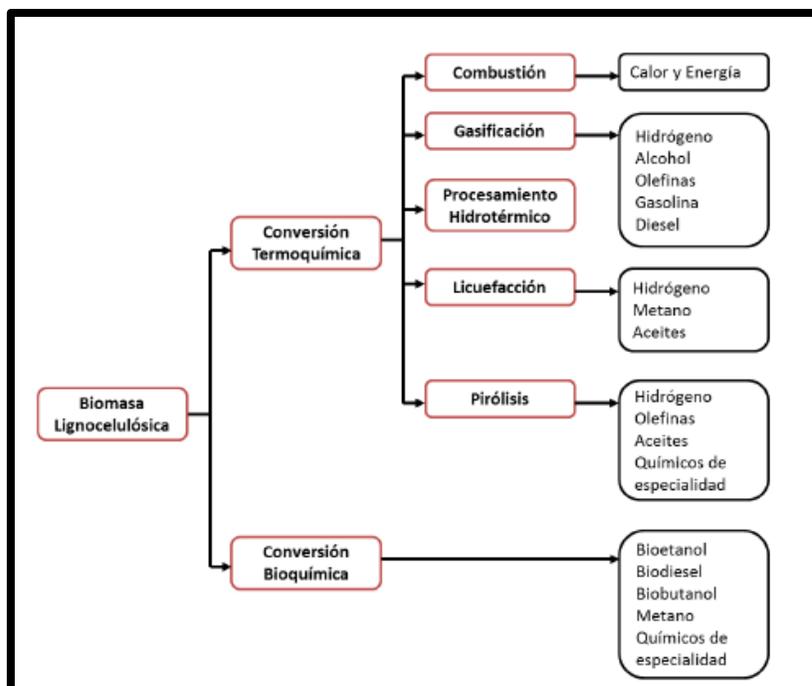


Figura 1.1 Procesamiento térmico y bioquímico de la biomasa lignocelulósica [7]

Sin embargo, las aplicaciones futuras de la biomasa estarán basadas en una única instalación, denominada biorefinería integrada, donde se aprovecharán todas las fracciones y los subproductos de la biomasa para producir una gran variedad de productos que incluyen energía (electricidad, calor), biocombustibles, sustancias químicas y biomateriales. De este modo aumentará la rentabilidad de la utilización de la biomasa y se logrará una mayor flexibilidad frente a posibles fluctuaciones de mercado y a los cambios en las necesidades de los consumidores. [8]

Dado que el término de biorefinería engloba diversos sectores industriales (transporte, químico, energético, agrícola y forestal) resulta complicado establecer una única definición. A continuación se enumeran las principales definiciones proporcionadas por diferentes organizaciones implicadas en este sector:

- La Agencia Internacional de la Energía (International Energy Agency, IEA) define la biorefinería como la instalación donde se generan, de forma sostenible, un amplio espectro de productos de interés comercial a partir de la biomasa. [9]
- El Laboratorio Nacional de Energías Renovables de Estados Unidos (National Renewable Energy Laboratory), propone una definición de biorefinería análoga a las refinерías de petróleo: instalaciones con el equipamiento necesario para integrar los procesos de conversión de biomasa en biocombustibles, energía y co-productos de valor añadido. [10]

Actualmente, el concepto de biorefinería está aún en su infancia. Solamente existen biorefinerías muy primarias que procesan un determinado tipo de biomasa (aceite, caña de azúcar, maíz, etc) a un determinado tipo de producto (biodiesel, bioetanol, etc). Una biorefinería madura sería una instalación muy flexible en cuanto a tipo de materia prima y a productos obtenidos en función de la oferta y la demanda (tal y como sucede en una refinería convencional petroquímica). [11]

1.2. Materias primas en la biorefinería

Todas las definiciones de biorefinería comparten el uso de la biomasa como materia prima. De manera general, la biomasa se define como toda aquella materia orgánica, de procedencia vegetal o animal, que ha tenido su origen inmediato a través de un proceso biológico. [12]

Dentro del contexto energético, se emplea el término de biomasa como un tipo de energía renovable basado en el uso de la materia orgánica formada por vía biológica o productos derivados (biocombustibles) de diversa naturaleza (sólidos, líquidos o gaseosos), que pueden emplearse en sustitución de los combustibles tradicionales en transporte, producción de calor y electricidad, y como materia prima para la industria química [12]

En los últimos años ha existido una tendencia al uso más eficiente de nuevos recursos forestales y agrícolas de alta capacidad de producción de biomasa, y de los residuos

agroindustriales. En el caso de estos últimos, son materiales de bajo costo pero de los que se pueden obtener productos finales de alto valor agregado. [13]

La biomasa es también una de las grandes opciones entre las estrategias que tratan de reducir el cambio climático. Se destacan múltiples ventajas del uso energético, y de la obtención de productos químicos a partir de biomasa, relacionadas con aspectos del medio ambiente, de desarrollo sustentable y fuentes de energía renovables, diversificación energética, mejora en la gestión forestal y recuperación de suelos. [13]

Con la aparición del concepto de biorefinería integrada, la biomasa además de utilizarse en el sector energético, agrícola y forestal, amplía su uso hasta el sector químico. Por tanto, la industria química juega un papel esencial en la obtención de gran variedad de bioproductos de valor agregado. Se debería redefinir el concepto de biomasa como toda materia orgánica de origen renovable que puede ser empleada con fines industriales. [14]

La energía contenida en la biomasa procede en última instancia de la energía solar fijada por los vegetales y algunos microorganismos mediante la fotosíntesis, y posteriormente acumulada en los enlaces de las moléculas orgánicas constituyentes de la biomasa. Esta energía es transferida a los animales a través de las cadenas tróficas y es liberada al medio ambiente mediante procesos de oxidación de forma rápida como sucede en la combustión, o más lentamente como los que se produce en la descomposición de los materiales biológicos. [14]

1.2.1 Biomasa residual

La biomasa de origen residual es la que se genera en las actividades de producción y transformación en los sectores agrícola, forestal e industrial. Estos materiales son considerados residuos, puesto que carecen de valor económico en el contexto en el que se generan, ya sea en las actividades desarrolladas dentro del sector primario (residuos agrícolas, ganaderos y forestales), secundario (residuos que se generan en las industrias transformadoras de las materias primas primarias) o terciario (residuos producidos por el consumo humano, como la

fracción orgánica de los residuos urbanos y aguas residuales) tal como se muestra en la tabla 1.1. [15]

Tabla 1.1 Biomasa residual procedente de los sectores primario, secundario y terciario
[15]

Sector	Biomasa agrícola	Biomasa forestal
Primaria (Agraria)	Cultivos de uso específico no alimentario	Madera de bosques uso específico
	Residuos primarios de cultivos alimentarios	Madera derivada de operaciones de limpieza y mantenimiento de montes
	Hierbas y pastos	Residuos derivados de la explotación maderera
Secundaria (Transformación)	Residuos de industrias agroalimentarias	Residuos de industrias de primera y segunda transformación de la madera
	Residuos de explotaciones ganaderas	Residuos de industrias de pasta de papel y papeleras
Terciaria (Urbana)	Residuos sólidos urbanos (fracción orgánica)	Residuos urbanos de madera
	Fangos de depuradoras de aguas residuales	Residuos urbanos celulósicos

1.2.1.1 Biomasa residual para obtención de lignina

Moreno [16] realizó un estudio utilizando 5 tipos de biomasa residual agrícola (plantas) para determinar en cuál de ellas se obtiene mayor % de rendimiento de la lignina. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.2. Se aprecia que la planta que mayor % de lignina tiene es el café, específicamente los residuos, con un 45.39%. El método de obtención de lignina utilizado para este estudio fue el método de obtención por extracción Soxhlet. Entre las 5 plantas utilizadas como muestra, se observa que dos de ellas son desechos; es decir, que la gente se deshace de ellos una vez consumida la parte de interés de la planta. Estas dos plantas son la corona de piña y los residuos de café. Otro objetivo del estudio fue precisamente aprovechar esas plantas que se consideran desechos y darles un uso para obtener lignina y así utilizar ésta para diversas aplicaciones de interés.

Tabla 1.2 Porcentaje de lignina a partir de material libre de extracto por Extracción Soxhlet, usando como materia prima cinco muestras de biomasa residual agrícola. [16]

Materia prima	Peso de la muestra inicial (gramos)	Peso del crisol solo	Peso del crisol con muestra	Peso de la Muestra	Peso después de calcinar	Peso de ceniza	% de Lignina
Corona de piña	2	44.5412	45.2833	0.7421	44.665	0.1238	30.915
Residuo de café	2	55.859	56.778	0.919	55.8708	0.0118	45.36
Henequén	2	55.857	56.6335	0.7765	55.9831	0.1261	32.52
Candelilla Verde	2	49.1649	49.658	0.4931	49.1752	0.0103	24.14
Tule	2	49.1465	49.6548	0.5083	49.1499	0.0034	25.245

1.2.1.2 Café (*Coffea arabica*)

La biomasa residual del café es el principal subproducto de la agroindustria cafetera. La industria cafetalera produce este producto en grandes cantidades y sus costos son muy bajos o nulos; además, genera en ocasiones problemas para su gestión, por lo que su aprovechamiento se convertiría en dar un valor agregado al beneficio del café antes de su eliminación final. Se sabe que por cada dos toneladas de la especie *Coffea arabica* se produce también una tonelada de biomasa residual de café (en peso seco). A nivel mundial se producen más de 7,000,000 de TM de café por año. [17]

La especie *Coffea arabica* proporciona un café suave y aromático. Originaria de la antigua Abisinia, ahora Etiopía, es la especie más apreciada y antigua que se conoce, desde mediados del siglo XVIII. Su área de cultivo se localiza en zonas intertropicales a una altura de hasta 2000 metros sobre el nivel del mar, y nunca por debajo de los 500 metros. Actualmente representa al mayor porcentaje de la producción del café, por encima del 60%, y produce variedades de café apreciadísimas como Moka, Bourbon, Maragogipe, Nacional o Brasilla. El fruto tiene forma ovalada y su maduración dura de 7 a 9 meses. El café Arábica se cultiva en toda Latinoamérica, en África Central y Oriental, en India y, en cierta medida, en Indonesia. En la figura 1.2 se muestra una imagen de la planta del café *Coffea arabica*. [18]



Figura 1.2 Imagen ilustrativa de la planta *Coffea arabica* [18]

1.3 Productos de las biorefinerías

No obstante que son muchos los productos que pueden obtenerse en una biorefinería, en términos generales pueden agruparse en dos categorías: la bioenergía en cualquiera de sus aplicaciones (térmica, eléctrica y mecánica), y los bioproductos, derivados de los componentes mayoritarios de la biomasa (carbohidratos, lípidos, proteínas y metabolitos). Las principales aplicaciones de los polímeros presentes en plantas se muestran en la tabla 1.3 [19].

Tabla 1.3. Principales aplicaciones de los polímeros presentes en plantas [19]

Polímero	Fuente principal	Aplicaciones
Almidón	Tubérculos, granos de cereal	Industria papelera Aditivo conservador de alimentos Etanol combustible
Celulosa	Biomasa lignocelulósica	Fabricación de papel Síntesis de fibras artificiales y plásticos (acetato de celulosa) Agentes espesantes y gelatinizantes
Lignina	Biomasa lignocelulósica	Estabilizadores de emulsiones Resinas Dimetilsulfóxido, Vainillina, Xilitol

1.3.1 Bioproductos

Una cantidad de bioproductos muy grande se obtienen de las biorefinerías. Se usa el término “plataforma tecnológica de biorefinería” y a partir de este término se conocen los productos que obtienen del fraccionamiento integral. Algunos productos de alto valor son los productos de la lignina. [19]

1.3.1.1 Bioproductos basados en lignina

A partir de la lignina se obtienen productos como los siguientes: Dispersantes para cemento, formulaciones para tratamiento de aguas y para colorantes textiles, así como estabilizadores de emulsiones, resinas, refuerzo de hule, polimezclas (PVC, polietileno, polipropileno, poliestireno, poliuretano, etc), fuentes de energía y materia prima para la elaboración de compuestos químicos (vainillina, ácido húmico, endulzante xilitol, dimetilsulfóxido para disolventes y reactivos químicos, etanol). Otras aplicaciones que se han estudiado y que aún no se han explotado comercialmente en forma masiva son la fabricación de polímeros biodegradables. [19]

La hidrólisis de la lignina a altas presiones y temperaturas producen compuestos de bajo peso molecular, estos compuestos representan una variedad de productos químicos de alto valor añadido; siendo los más importantes un grupo de compuestos fenólicos, entre los que destacan: vainillina, cresoles, fenoles, catecoles, guayacol, etc. [19]

1.4 Biorefinería de biomasa lignocelulósica

En la figura 1.3 se aprecia un esquema de biorefinería basada en biomasa lignocelulósica, en donde involucra los pasos para aprovechar cada componente de la biomasa en la fabricación de productos de valor agregado. La biomasa es fraccionada en tres componentes, los cuales son la celulosa, hemicelulosa y lignina. [19]

La celulosa es el principal polímero natural, cuyas cadenas se encuentran altamente ordenadas y rodeadas en una matriz por la hemicelulosa y la lignina. La hemicelulosa está constituida principalmente de azúcares, que son fácilmente obtenidos por medio de hidrólisis ácida. Por su

parte, la lignina es un polímero aromático que forma parte de los tejidos de sostén de los vegetales. [20]

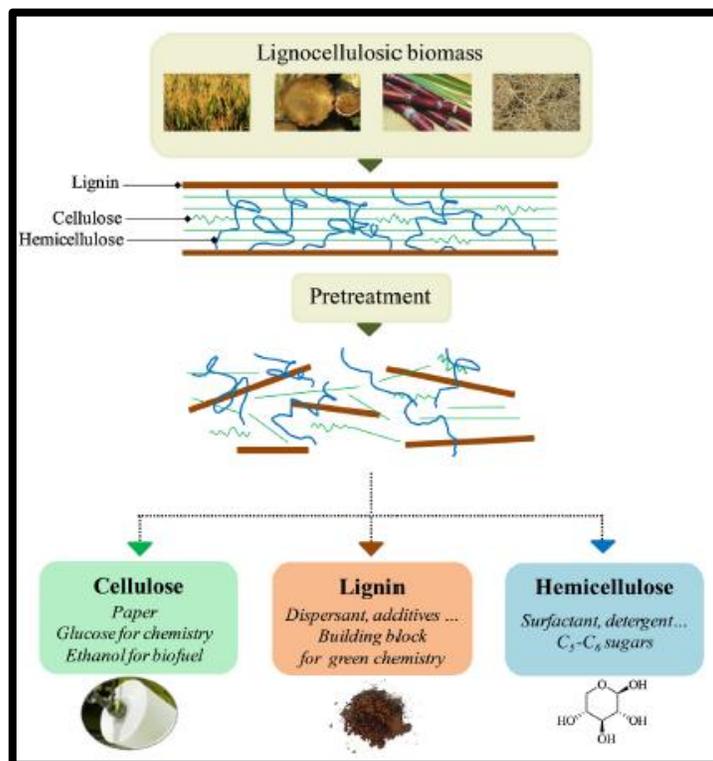


Figura 1.3 Esquema de biorefinería basada en biomasa lignocelulósica. [19]

1.5 Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica

Los lignocelulósicos son la fuente más abundante de biomasa sin uso particular y su disposición no implica un impacto al entorno. Se encuentran en la pared celular de las plantas y de forma general, se componen en un 40 – 50% de celulosa, 25 - 30% de hemicelulosas y 15 – 20% de lignina y otros compuestos extraíbles. [21]

En la figura 1.4 se presenta de forma ilustrativa la organización estructural de la pared celular y la distribución de la biomasa lignocelulósica.

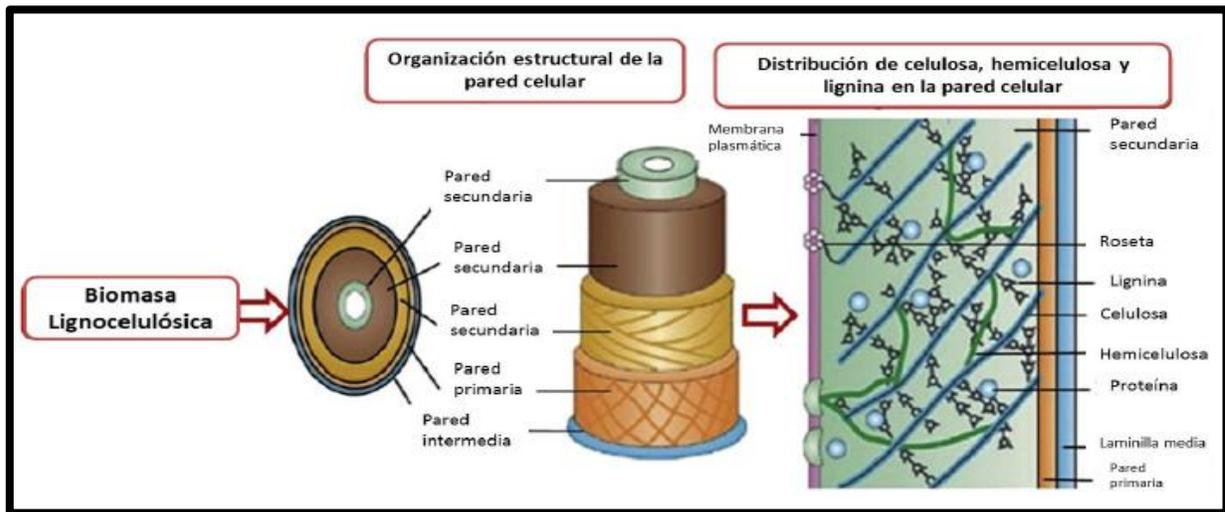


Figura 1.4 Diagrama ilustrativo de la distribución de los compuestos lignocelulósicos en la pared celular de las plantas. [21]

La celulosa es un polímero lineal, que presenta cadenas laterales alternadas, de glucosas unidas mediante enlaces α -(1-4)-glucosídicos. Las hemicelulosas son ramificaciones de heteropolímeros compuestos por D-xilosa, L-arabinidosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa y D-ácido glucorónico. La lignina, en cambio, es un polímero sintetizado a partir de unidades fenilpropánicas. Otras características de la lignina es que es un polímero aromático, complejo y amorfo, que se encuentra en la pared celular de las plantas, principalmente en la corteza de los árboles. Después de la celulosa, la lignina se considera como el material orgánico de origen natural más abundante en el planeta. El contenido en masa de la misma depende del origen de la especie vegetal. [22]

Las cadenas de celulosa son empaquetadas en microfibrillas que son estabilizadas a su vez por puentes de hidrógeno. Dichas fibrillas son unidas entre sí por las hemicelulosas y polímeros amorfos de diversos azúcares así como por pectina o incluso, lignina. Las moléculas individuales de las mencionadas fibrillas que se presentan en la celulosa cristalina, son tan ajustadas que incluso ni pequeñas moléculas como el agua pueden entrar al complejo formado. Algunas partes de las microfibrillas tienen regiones poco ordenadas o cristalinas,

relacionándose a una región amorfa. El alto peso molecular y su estructura terciaria, hacen a la celulosa natural insoluble en agua. [22]

En general, las paredes celulares se dividen como primaria (PP) y secundaria (PS) La distribución de celulosa, hemicelulosas y lignina varía considerablemente entre estas capas. La pared secundaria se compone por PS1, PS2 y PS3 donde PS2 es usualmente más delgada que las otras y contiene una mayor proporción de celulosa. La laminilla media compuesta, que une dos células adyacentes, está casi por completo formada por lignina. [22]

1.5.1 Componentes estructurales

1.5.1.1 Celulosa

El término “celulosa” se utilizó por primera vez en 1839 por el químico francés Payen para denominar la fracción aislada a partir de madera por tratamiento con ácido nítrico. La celulosa es la principal componente de las paredes celulares de los árboles y otras plantas. Es un biopolímero lineal constituido por unidades de anhidroglucopiranosas conectados por enlaces β -1,4-glicosídicos. El acoplamiento de cadenas de celulosa adyacentes por enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals dan lugar a un alineamiento paralelo de la molécula y a una estructura cristalina, resultando en una baja accesibilidad para enzimas. [23]

La celulosa es el componente mayoritario de los materiales lignocelulósicos. Representa la base estructural de las células vegetales, por lo que es la sustancia natural más importante, tanto por su abundancia como por su aprovechamiento tecnológico. Actualmente es la base de muchos productos de interés industrial (papel, fibras, aditivos, etc). La celulosa con fórmula química $(C_6H_{10}O_5)_n$ es un homopolímero lineal constituido por unidades de β -glucosa. Estas moléculas se pueden hidrolizar con dificultad en medios catalizados por ácido. Entre las principales propiedades fisicoquímicas de la celulosa, se encuentran el índice o grado de polimerización, la cristalinidad y la porosidad. [23]

La celulosa en la biomasa lignocelulósica está organizada en microfibras, las cuales miden entre 3 y 6 nm de diámetro y contienen hasta 36 cadenas de glucanos con miles de residuos de glucosa. Como se observa en la figura 1.5, la cadena de celulosa es alargada y las unidades de glucosa están dispuestas en un solo plano, debido a la presencia del anillo glicosídico y a su conformación. [24]

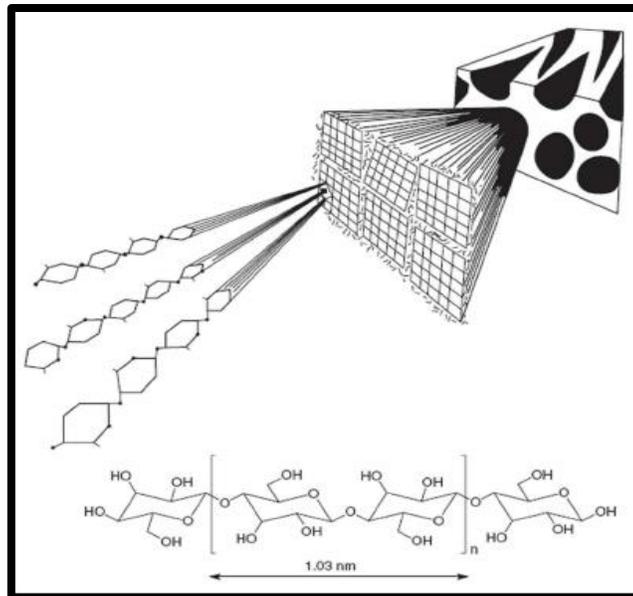


Figura 1.5 Componentes y estructura de la fibra de celulosa [24]

1.5.1.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa, por el otro lado, es un grupo de polisacáridos encontrados en la pared celular primaria y en la pared celular secundaria, siendo el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. Se define como material soluble alcalino después de la remoción de sustancias pépticas, y tiene un mucho menor grado de polimerización (100-200 U) comparado con el de la celulosa (10,000-14,000). Los principales componentes de azúcares son d-xilosa, d-manosa, d-glucosa, d-galactosa, l-arabinosa, d-ácido glucorónico, 4-O-metil-d-ácido glucorónico, d-ácido galacturónico, y en menor cantidad el l-ramnosa, l-fucosa y varios azúcares O-metilados. [25]

Las hemicelulosas se clasifican en cuatro grupos: Xilanos (Unidades enlazadas de β -1,4-D-xilosa), arabinanos (Unidades enlazadas de α -1,5-L-arabinosa), galactanos (Unidades enlazadas de β -1,3-D-galactosa) y mananos (Unidades enlazadas de β -1,4-D-manosa). Los xilanos son las principales hemicelulosas en la madera y también son predominantes en los cereales, abarcando el 30% del material de la pared celular. En la figura 1.6 se muestran las estructuras de cada grupo de hemicelulosas. [25]

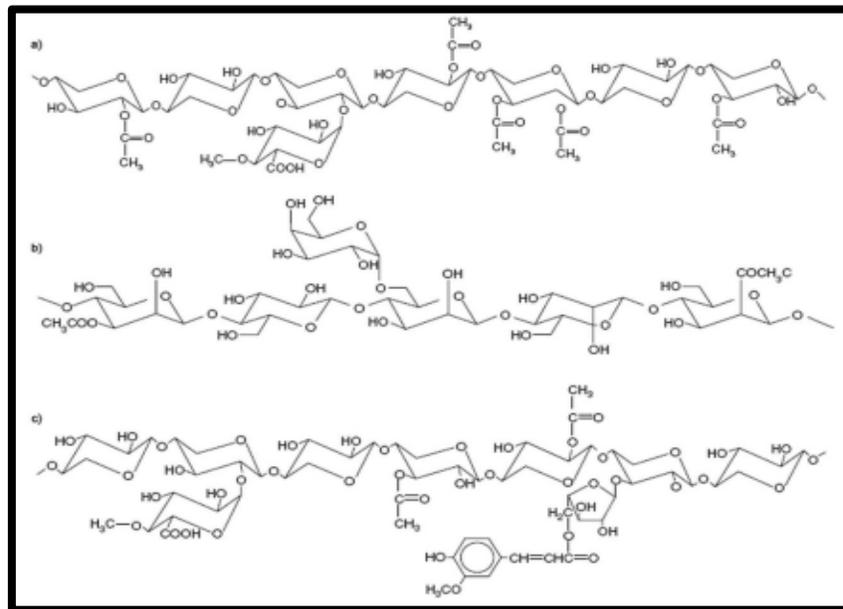


Figura 1.6 a) Estructura de O-acetil-(4-O-metil-glucurono)xilano de la madera, b) Estructura de O-acetil-galactoglucomanano, c) Estructura de xilano [25]

Otras diferencias que presentan las hemicelulosas con respecto a la celulosa son la presencia de ramificaciones (la celulosa es un polímero lineal), la heterogeneidad (las hemicelulosas son heteropolímeros formados por distintos azúcares que pueden presentar sustituyentes, mientras que la celulosa es un homopolímero que está compuesto únicamente por glucosa) y la falta de cristalinidad (la hemicelulosa presenta una estructura amorfa, a diferencia de la celulosa que posee una cristalinidad que se encuentra en función de la gran cantidad de los puentes de hidrógeno. [25]

1.5.1.3 Lignina

La lignina es un biopolímero amorfo, aromático, tridimensional y altamente ramificado con una gran variedad de grupos funcionales que proporcionan centros activos para interacciones químicas y biológicas. La lignina disponible en el mercado procede de una serie de procesos, mayoritariamente de la obtención de papel, lo cual provoca que en su caracterización puedan aparecer grupos funcionales distintos a los nativos. Los principales grupos funcionales en la lignina incluyen los hidroxilos fenólicos, hidroxilos alifáticos, metoxilos, carbonilos, carboxilos y sulfonatos. En la figura 1.7 se muestra un ejemplo de estructura de lignina. [26]

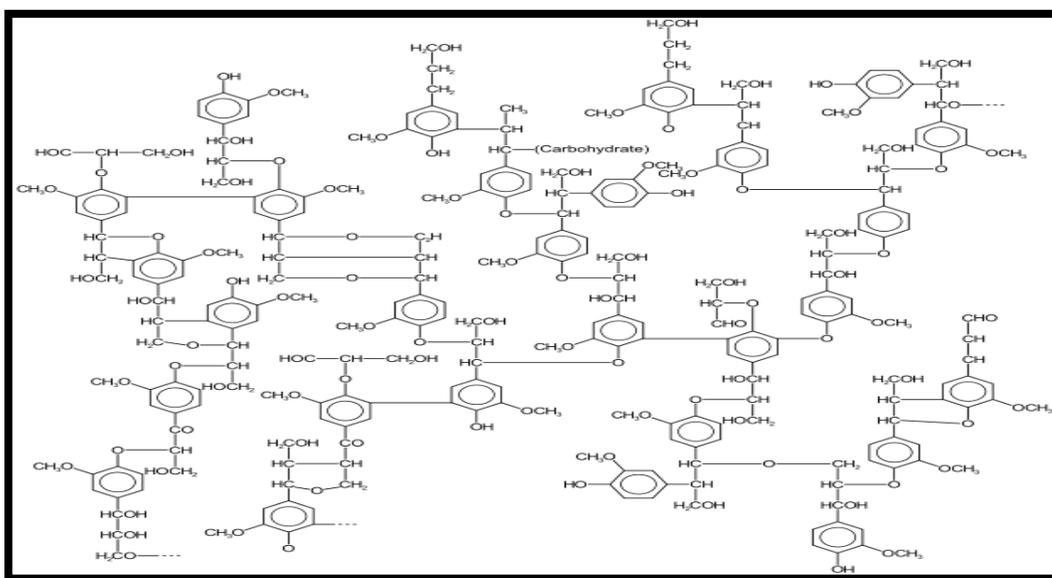


Figura 1.7 Ejemplo de estructura química de la lignina [27]

La lignina cumple funciones estructurales y de transporte, al rellenar los espacios del esqueleto de la planta formado por la celulosa y hemicelulosa, también le brinda soporte mecánico a la célula e hidrofobicidad a la pared celular, siendo éste último un prerequisite para un eficiente transporte de agua y nutrientes. Algunas otras propiedades observadas de la lignina son su alta resistencia al ataque químico, su actividad antimicrobiana y antimicótica, capacidad antioxidante, absorción de radiación UV e inclusive han sido estudiadas sus propiedades retardadoras de llama. [26]

En la figura 1.8, se observa la ruta de biosíntesis de la lignina en la pared celular de las plantas. Ésta comienza a partir de la fenilalanina, siendo las primeras reacciones compartidas con la ruta de los fenilpropanoides. Los productos de la biosíntesis son los monómeros precursores de la lignina, siendo 3 los principales y más abundantes: alcohol coniferílico, alcohol sinapílico y alcohol *p*-cumarílico. Posteriormente, comienza la etapa de polimerización para llegar a la lignina, la cual es catalizada por enzimas. Primeramente se inicia con el proceso de deshidrogenación, el cual genera resonancia por radical libre, y al azar se da lugar al acoplamiento oxidativo radical-radical de los monómeros precursores. Finalmente, después de irse acoplando dichos monómeros, se genera el polímero de la lignina. Como este acoplamiento es al azar y no hay restricciones en el número de monómeros que se van juntando, la estructura de la lignina no está bien definida. [27]

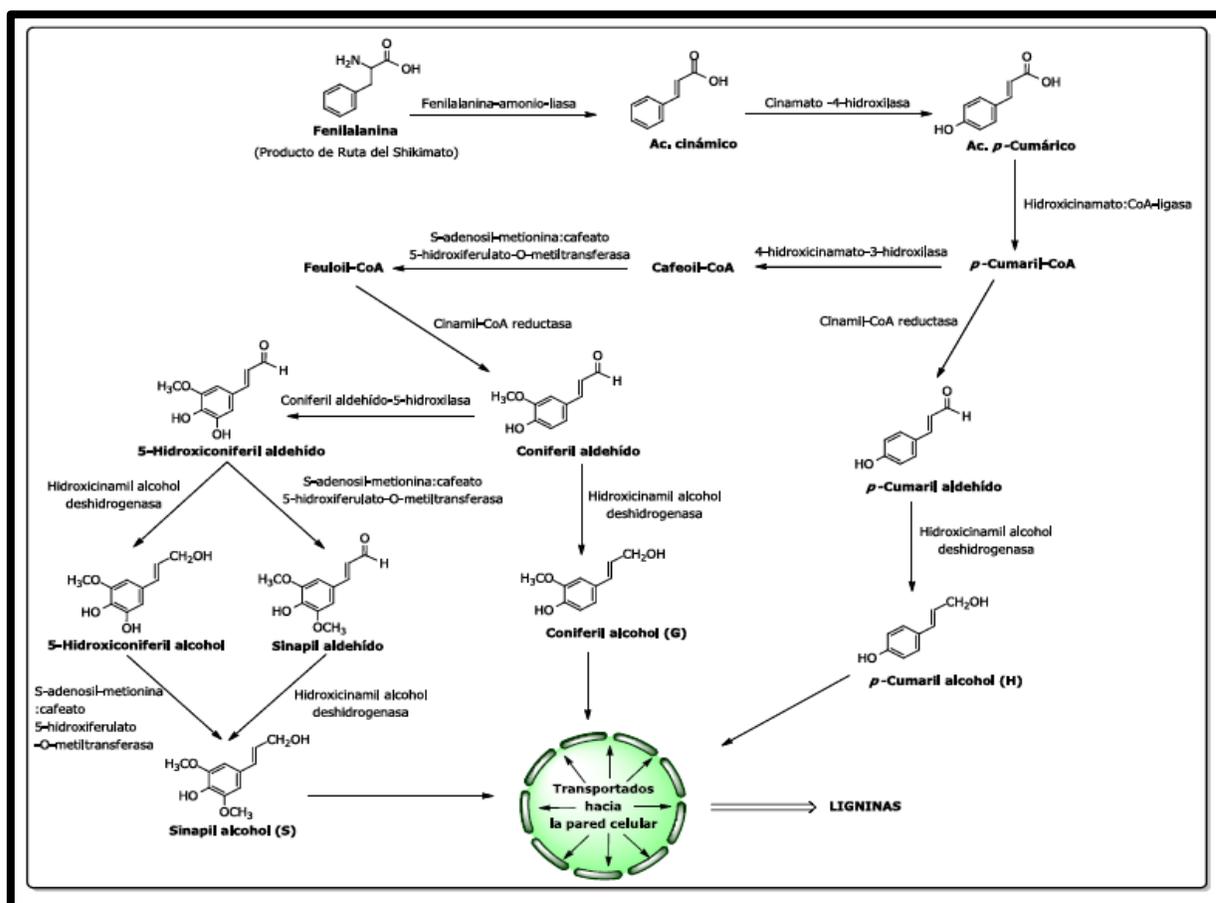


Figura 1.8 Esquema de la ruta de biosíntesis de la lignina en la pared celular. [28]

Existen sensibles diferencias entre la lignina procedente de coníferas y la procedente de frondosas. La primera contiene unidades guayacilpropano, siendo el monómero básico el alcohol coniferílico. La segunda contiene junto a las unidades guayacilpropano otras de siringilpropano, en proporciones que varían desde 4:1 hasta 2:1, siendo los alcoholes coniferílico y sinapílico los monómeros básicos. Estas estructuras sirven para definir el modelo básico de distintos tipos de ligninas basándose en lo que se conoce como la fórmula C9, correspondiente a los seis carbonos del anillo aromático y los 3 de la cadena alifática. [28]

En la figura 1.9 se representan los monómeros básicos de la lignina, teniendo en común el esqueleto fenilpropanico; la diferencia entre ellos son los sustituyentes presentes en el anillo aromático (radical p-hidroxifenilo si sólo tiene un -OH, radical guayacilo si tiene un -OH y un -OCH₃, y radical siringilo si tiene un -OH y dos -OCH₃). Estas estructuras están ligadas con varios enlaces tipo éter (α -O-4, β -O-4, 4-O-5) y carbono-carbono; son muy complejas y presentan una gran heterogeneidad. Ésta se explica por las variaciones en la composición de la lignina, su tamaño, frecuencia de los enlaces presentes y sus grupos funcionales. La heterogeneidad depende de la especie de la planta del que se obtiene la lignina, el proceso de su separación del material lignocelulósico, y el método empleado para su recuperación del licor negro. [28]

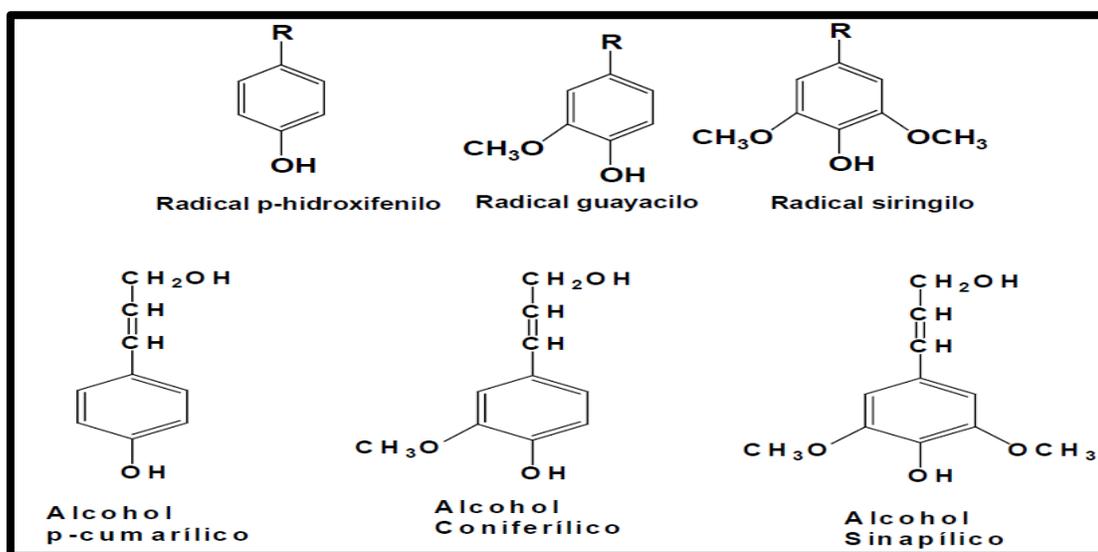


Figura 1.9 Unidades y monómeros básicos de la lignina [28]

En la Figura 1.10 se presenta un resumen de las transformaciones a las cuales es sometida la lignina, además de la hidrólisis, con el objetivo de producir compuestos de mayor valor agregado. [28]

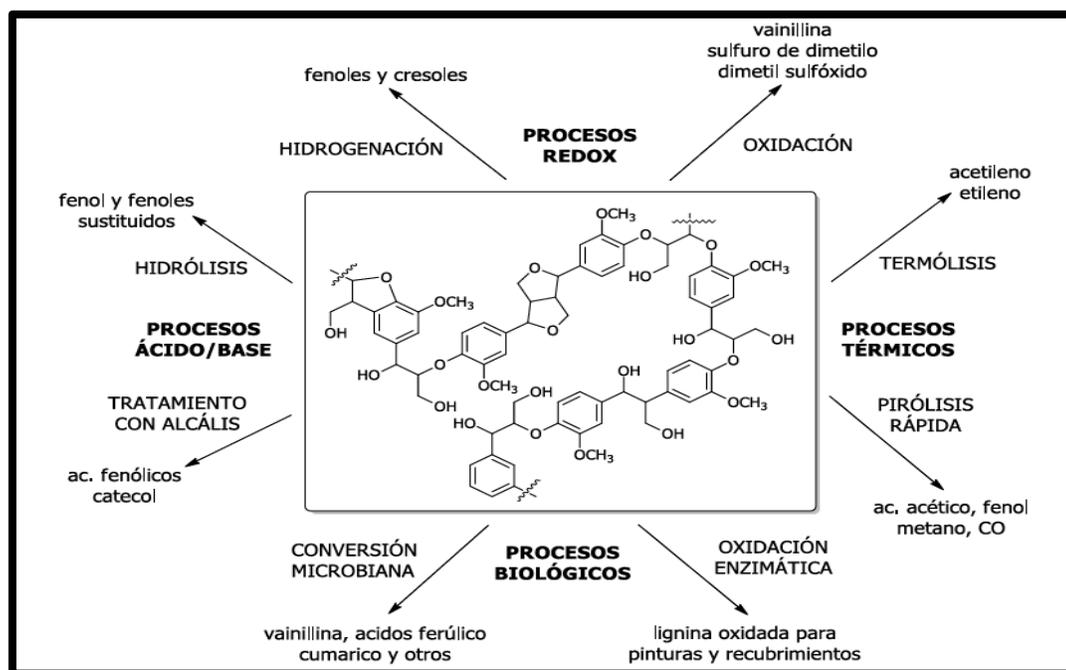


Figura 1.10 Esquema representativo de diferentes procesos de transformación de la lignina [28]

La lignina también representa una fuente renovable y potencialmente valiosa para la obtención de compuestos químicos fundamentalmente de tipo aromáticos. Por lo tanto, hay un interés en los métodos químicos y biológicos de degradación de lignina que podrían aprovecharse tanto para la descomposición de la lignocelulosa y producir biocombustibles, como para generar productos químicos aromáticos; y por lo tanto, formar la base de una biorefinería. [28]

Los enlaces tipo éter, que son los más importantes, conectan los diferentes monómeros en la estructura de la lignina y además desempeñan un papel fundamental en el mecanismo de ruptura durante la fragmentación. Los enlaces éter más comunes encontrados en la lignina son del tipo α -O-4 y β -O-4, siendo éste último el tipo de enlace que más se encuentra en la estructura de la lignina y por lo tanto, es el enlace principal donde se llevan a cabo las

rupturas. El enlace β -O-4 se rompe heterolíticamente vía la formación de un derivado de fenolato de sodio y un carbocatión conocido como intermediario, el cual es neutralizado por un ión hidróxido. Los cationes de sodio catalizan la reacción formando aductos catiónicos con la lignina y polarizan el enlace éter. El carbocatión del siringilo es más estable que el guayacilo debido a que tiene más sustituyentes metoxi. En la Figura 1.11 se observan los tipos de enlaces éter que se rompen durante la fragmentación de la lignina. [28]

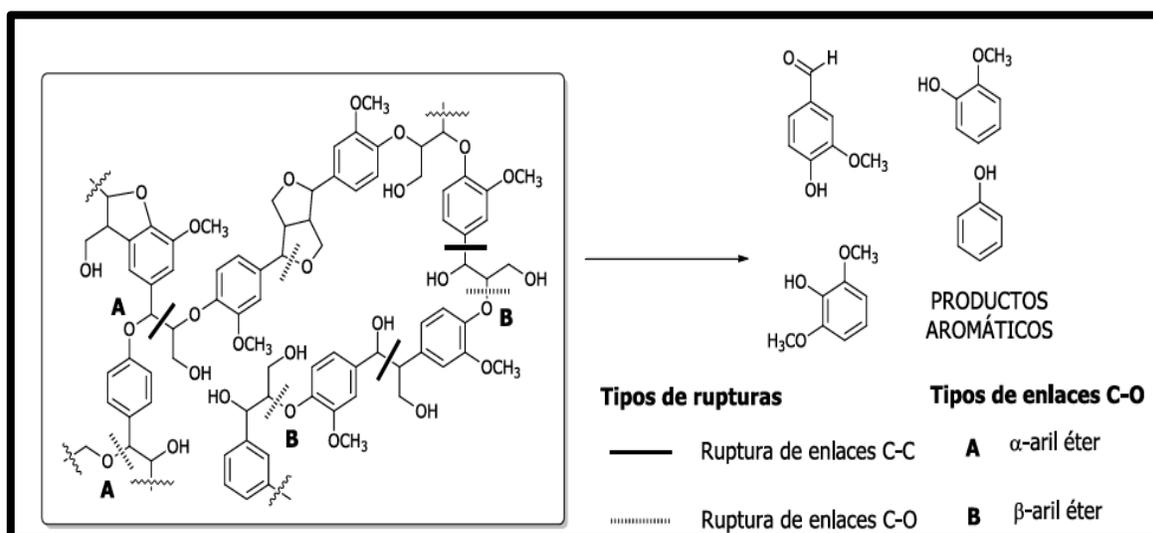


Figura 1.11 Principales rupturas de enlaces en la lignina durante su despolimerización y fragmentación en monómeros de tipo aromático [28]

Como alternativa a los procesos biológicos también se ha prestado atención al desarrollo de procesos químicos para la fragmentación de la lignina. Existe una clasificación esquemática de distintos procesos térmicos y termoquímicos a los cuales puede someterse la lignina, así como también los productos potenciales que se obtienen en cada caso. La hidrólisis térmica es el método más sencillo y económico para obtener compuestos fenólicos, entre ellos los fenoles, catecoles, cresoles, etc, y aplicarlos para la fabricación de productos químicos de interés. [28]

En la figura 1.12 se muestra el esquema de procesos termoquímicos como métodos para fragmentar la lignina.

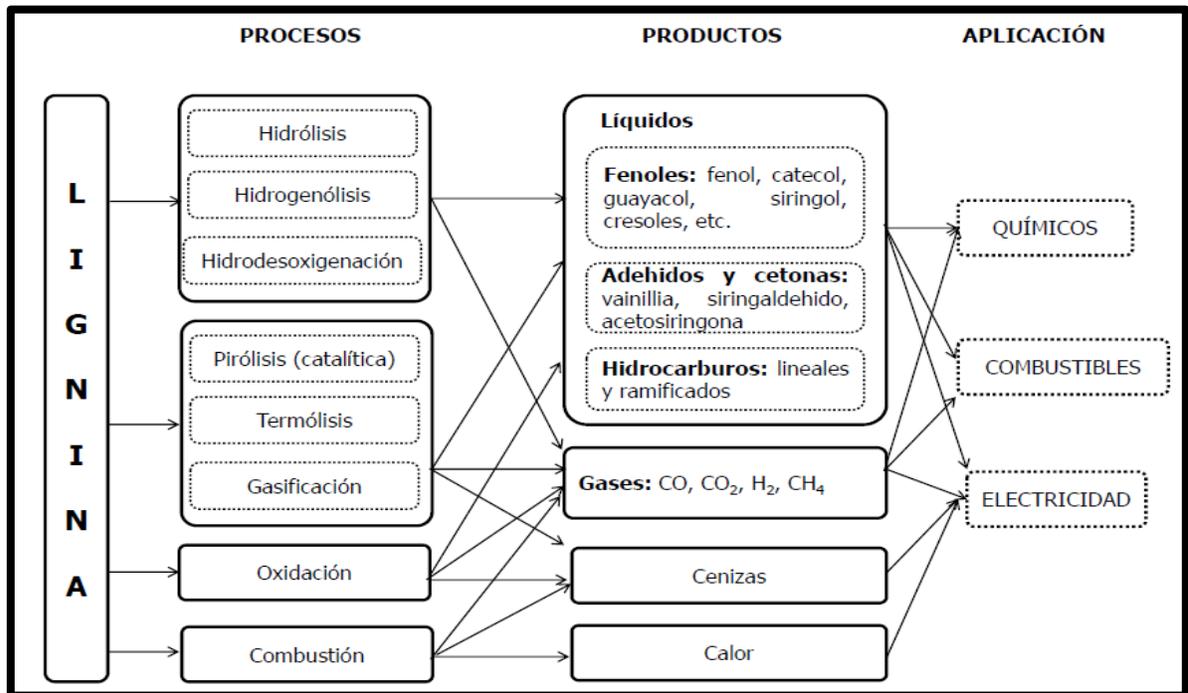


Figura 1.12 Esquema de procesos termoquímicos para la fragmentación de la lignina y sus productos potenciales. [28]

En la figura 1.13 se muestran las estructuras de los principales compuestos fenólicos que se obtienen a partir de la fragmentación de la lignina por hidrólisis térmica [28].

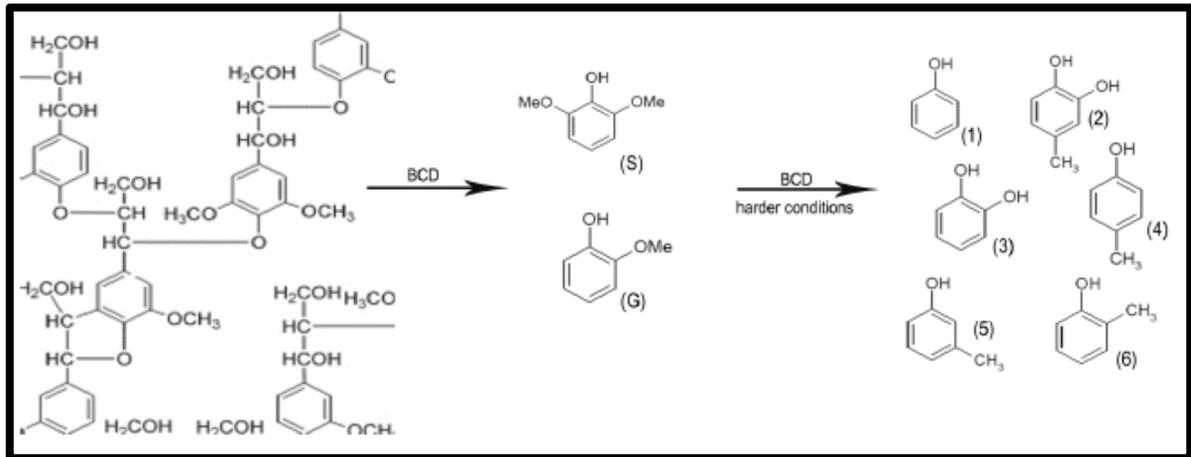


Figura 1.13 Ejemplos de compuestos fenólicos resultantes de la fragmentación por hidrólisis térmica de la lignina. (1) Fenol, (2) 4-Metilcatecol, (3) Catecol, (4) p-Cresol, (5) m-Cresol, (6) o-Cresol. [29]

1.6 Pretratamiento de biomasa lignocelulósica para fraccionamiento de lignina

La lignina es uno de los principales componentes de la biomasa lignocelulósica. El objetivo del pretratamiento del material lignocelulósico para el fraccionamiento de la lignina (deslignificación) es fraccionar la estructura de la pared celular para la separación de cada componente (celulosa, hemicelulosa y lignina). La obtención de lignina del material lignocelulósico se realiza bajo condiciones donde la lignina es degradada progresivamente a fragmentos de bajo peso molecular, resultando en cambios de sus propiedades fisicoquímicas. Sin importar el origen de la lignina, el método extractivo tendrá una fuerte influencia en la composición y propiedades de la lignina extraída. [30]

En la figura 1.14 se muestra el esquema ilustrativo del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para el fraccionamiento de la lignina.

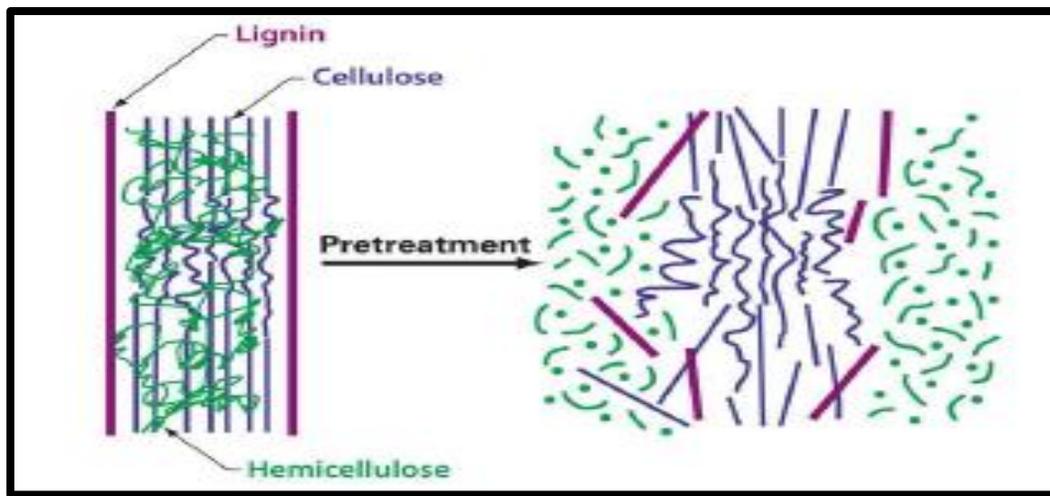


Figura 1.14 Esquema de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para el fraccionamiento de lignina [30]

Para que el pretratamiento sea efectivo, se necesitan los siguientes requerimientos dependiendo en el uso final de cada componente, incluyendo:

- Minimización de los productos de degradación de la hemicelulosa
- Limitación de la formación de productos que inhiben la fermentación de etanol
- Reducción del uso de agua/energía y disminución de contaminación del aire y agua.
- Capital y costos operativos
- Reducción de las cantidades de químicos requeridos para el pretratamiento

Las técnicas de pretratamiento que cumplen con los requerimientos anteriores se clasifican en tres grupos: procesos físicos (pulpeo mecánico), tratamientos químicos y métodos biológicos. En algunos casos, diferentes tratamientos son combinados para incrementar los rendimientos finales. [30]

Los procesos físicos incluyen piedra de molienda y pulpeo mecánico. Estos procesos están basados en la desfibración del material lignocelulósico para obtener fibras simples y grupos de

fibras, y la fibrilación incluye la conversión de fibras a elementos fibrilares. Los requerimientos energéticos para los pretratamientos físicos son dependientes del tamaño final de partícula y la reducción en la cristalinidad del material lignocelulósico. Sin embargo, los procesos físicos son costosos y por ende no son utilizados en procesos a gran escala. [30]

Los pretratamientos biológicos emplean la degradación de la madera a través de microorganismos, incluyendo los hongos de putrefacción blancos, café y suaves, así como las bacterias para modificar la composición química y/o la estructura de la biomasa lignocelulósica y así la biomasa modificada sea más factible a la digestión enzimática. Sin embargo, entre sus desventajas se encuentran la baja velocidad del proceso de pretratamiento, y requiere de un control cuidadoso de las condiciones de crecimiento y una gran cantidad de espacio para llevar a cabo el tratamiento. En adición, la mayoría de los microorganismos lignolíticos también solubilizan y consumen celulosa y hemicelulosa. Finalmente, los pretratamientos biológicos implican retos técnicos y económicos, por lo que comercialmente son menos atractivos. [30]

Entre los pretratamientos químicos que se han desarrollado, se encuentran las tecnologías libres de sulfuro. En la tabla 1.4 se hace un compendio de este tipo de pretratamientos químicos, en el que se observan sus ventajas y desventajas. [31]

Tabla 1.4 Pretratamientos químicos (libres de sulfuro) de biomasa lignocelulósica [31]

Pretratamiento	Ventajas	Desventajas
Alcalino	-Remoción eficiente de lignina -Baja formación de inhibidores	-Alto costo de catalizador alcalino -Alteración de la estructura de la lignina
Ácido	-Alto rendimiento de glucosa -Solubilización de la hemicelulosa	-Altos costos de ácidos y necesidad de recuperación -Altos costos de equipos resistentes a la corrosión -Formación de inhibidores
Líquidos iónicos (Solventes verdes)	-Hidrólisis de lignina y hemicelulosa -Condiciones de baja temperatura -Disolución de varios tipos de biomasa	-Alto costo del solvente -Necesidad de recuperar y reciclar el solvente
Vapor	-Costo accesible -Transformación de la lignina y solubilización de la hemicelulosa -Alto rendimiento de glucosa y hemicelulosa en dos pasos del proceso	-Degradación parcial de la hemicelulosa -Generación de compuestos tóxicos -El catalizador ácido necesita hacer eficiente el proceso con material con alto contenido de lignina.
Agua caliente	-Separación de hemicelulosa pura del resto de la materia prima -No se necesita catalizador -Hidrólisis de la hemicelulosa	-Se requiere una gran cantidad de agua y energía
Organosolv	-Celulosa accesible a las enzimas -Solubilización de la hemicelulosa -Lignina pura de bajo peso molecular	-Reactor de alta presión -Necesidad de recuperar y reciclar el solvente
Fluido supercrítico	-Baja degradación de azúcares -Costo accesible	-Requerimientos de alta presión -La lignina y la hemicelulosa no resultan afectadas.

1.6.1 Pretratamiento alcalino de fraccionamiento de lignina con antraquinona

Las quinonas han demostrado un comportamiento positivo respecto a la mejora de la velocidad de deslignificación y su rendimiento. El Mansouri [32] trabajó con 300 aditivos para el pulpeo alcalino. Mientras que algunos muestran efectos iguales o mejores que la antraquinona, la mejor relación costo/utilidad de la antraquinona hace que ésta sea la única dentro de la familia de productos que haya adquirido una aceptación comercial.

Las dos propiedades que definen la antraquinona son su capacidad de aceleración del fraccionamiento alcalino de lignina y de estabilización de los carbohidratos con la preservación del rendimiento. La antraquinona tiene atributos clave para conseguir ser un catalizador redox apropiado para las reacciones que se producen durante el proceso de cocción. Es estable a altas temperaturas (punto de fusión: 282-285 °C) y en presencia de una fuerte carga de álcali caliente. La antraquinona es inocua y no tiene ningún efecto medioambiental adverso. Además tiene un costo relativamente bajo. Por estas razones la antraquinona ha tenido éxito como agente deslignificador. [32]

1.7 Métodos de fragmentación de lignina

1.7.1 Fragmentación por hidrólisis térmica

Muchos investigadores han prestado atención a un método para la despolimerización de lignina, mediante el cual se intentan romper por hidrólisis (y en presencia de un catalizador ácido y/o básico en la mayoría de los casos) los principales enlaces C-O presentes en la lignina. Se han estudiado ampliamente diversos parámetros que influyen en el proceso de hidrólisis de lignina, entre ellos: las transformaciones termoquímicas de la lignina, determinando la estabilidad térmica de los diferentes enlaces que presenta la lignina (intramoleculares e intermoleculares); la solubilidad de la lignina en el sistema de reacción como otro factor que influye en el rendimiento de este proceso, por lo que han sido estudiados diversos parámetros reológicos para diferentes mezclas de lignina determinando los efectos en la solubilidad; y finalmente se ha realizado un estudio sobre los cambios morfológicos experimentados por la lignina durante el proceso de hidrólisis. [33]

Una de las metodologías más utilizadas para la fragmentación de lignina es el tratamiento de hidrólisis en presencia de bases y catalizadores básicos. Como resultado de este proceso de fragmentación por hidrólisis catalizada por bases, se obtiene una mezcla compleja de compuestos (variedad de pesos moleculares), que requiere ser separada de manera eficiente para que el proceso de fragmentación sea mejor aprovechado. En este sentido, se reporta un estudio detallado con procedimientos para separar los principales monómeros generados durante este proceso, mediante la combinación de técnicas como, extracción líquido-líquido, destilación, cromatografía y cristalización. [33]

La hidrólisis térmica de lignina en presencia de catalizadores básicos homogéneos (siendo el más común, hidróxido de sodio) se ha reportado en diversas condiciones de reacción, determinándose que la formación de monómeros es directamente proporcional a la concentración del catalizador y que los mejores rendimientos se obtienen a monómeros de origen fenólico como el siringol, 4-metilcatecol, catecol, guayacol, fenol, cresol. [33]

Los dos alcances más frecuentes para el tratamiento de hidrólisis térmica de la lignina documentados en la literatura son la fragmentación o despolimerización en agua supercrítica y la hidrólisis térmica alcalina debajo de las condiciones supercríticas. Recientemente, un proceso de conversión de lignina a un componente mezclador para la gasolina ha sido explorado. Consiste de dos etapas: la fragmentación catalizada por una base y la etapa de hidroprocesamiento. Conversiones de lignina hasta 92% han sido reportadas, pero el procedimiento implica la extracción del líquido filtrado y el sólido retenido después de una filtración, una acidificación y precipitación. La fracción de aceite obtenido de la extracción de la fase acuosa rica en compuestos fenólicos ha dado como resultado un rendimiento de 22%.

El sólido retenido contiene principalmente oligómeros. La limitación de la conversión de la lignina se atribuye a la polimerización de los productos altamente reactivos de la fragmentación para formar compuestos de mayor peso molecular, cenizas y lignina residual. Un análisis CHN de este material muestra una composición química diferente (5.2% de carbono mayor que la lignina original) y un rendimiento de 2% adicional de aceite fenólico

cuando se trata de nuevo bajo las mismas condiciones del material original. Las temperaturas en las que se ha trabajado para aumentar la conversión de lignina y obtener mayor rendimiento de fragmentos de lignina se encuentran en un rango de 300-450 °C. [33]

1.7.1.1 Rompimiento del enlace éter β -O-4

Recientes investigaciones en las rutas de reacción de la fragmentación de la lignina han dado diferentes conclusiones. Una investigación de la reactividad de los enlaces fenoxi en la lignina demostró que en el rango de temperatura de 200 a 400 °C, los enlaces entre los compuestos aromáticos se rompen, siendo el más débil el enlace éter β -O-4, tal como se muestra en la figura 1.15. Sin embargo, la descomposición química se vuelve más compleja conforme aumenta la temperatura, ya que ocurren reacciones secundarias y la recombinación de radicales centrados en carbonos dan lugar a la formación de nuevos enlaces carbono-carbono y por ende se forman cenizas. [34]

Durante el proceso de obtención de lignina, los grupos hidroxilo desprotonados en la posición del enlace éter β -O-4 sirven como nucleófilos para desplazar el sustituyente aroxi vecino y formar un anillo de óxido de etileno. Posteriormente, el óxido de etileno se abre por la adición de ion hidróxido, formando un grupo glicol. [34]

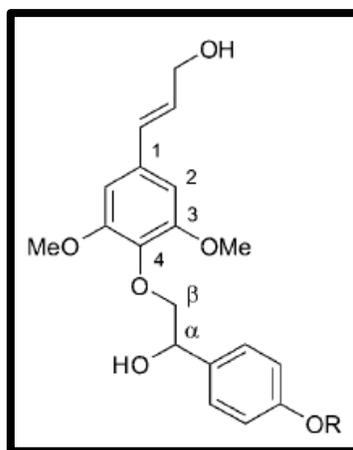


Figura 1.15 Fragmento de lignina con enlace éter β -O-4. [34]

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

2.1 Materiales

a) Materiales utilizados en la obtención de la lignina

- Residuos de café (*Coffea arabica*) obtenidos del Centro de Investigación en Petroquímica Secundaria (CIPS) del Instituto Tecnológico de Ciudad Madero y del Departamento de Bioprocesos Ambientales, ubicado en el edificio CEDES del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Monterrey.
- Agua destilada (H_2O), peso molecular: 18 g/mol
- Solución acuosa (37.5% p/p) de Hidróxido de Sodio (NaOH, Marca: CTS Scientific), peso molecular de 40.01 g/mol
- Antraquinona ($C_{14}H_8O_2$, Marca: Sigma Aldrich) con una pureza del 97%
- Solución acuosa (30% p/p) de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4 , marca: J.T. Baker), con un peso molecular de 98.08 g/mol

b) Materiales utilizados en la fragmentación de la lignina

- Tetrahidrofurano (Marca: Sigma Aldrich) con 99% de pureza.
- Agua (H_2O), peso molecular: 18 g/mol
- Ácido clorhídrico (HCl, marca: J.T. Baker, 37%) con 99% de pureza.
- Solución acuosa (4% p/p) de Hidróxido de Sodio (NaOH, Marca: CTS Scientific), peso molecular de 40.01 g/mol
- Acetato de Etilo (Marca: CTR Scientific)

c) Materiales utilizados en la caracterización del aceite fenólico

- Fenol para biología molecular (Marca: Sigma Aldrich), peso molecular: 94.11 g/mol
- Catecol con 99% de pureza (Marca: Sigma Aldrich), peso molecular: 110.11 g/mol
- Guayacol como indicador de oxidación (Marca: Sigma Aldrich), peso molecular: 124.14 g/mol

- Siringol con 99% de pureza (2,6-dimetoxifenol, marca: Sigma Aldrich), peso molecular: 154.16 g/mol
- 4-metilcatecol con 95% de pureza (Marca: Sigma Aldrich), con peso molecular: 124.14 g/mol
- M-cresol con 99% de pureza (Marca: Sigma Aldrich), peso molecular: 108.14 g/mol.
- Acetato de Etilo (Marca: CTR Scientific)

2.2 Obtención de la lignina

2.2.1 Caracterización de la materia prima de residuos de café (*Coffea arabica*)

La Asociación Técnica de la Industria de la Pulpa y el Papel (TAPPI) [20] publica artículos, estándares y libros relacionados con la industria de la pulpa, el papel y empaquetado. Entre los estándares que maneja, se ubican los métodos gravimétricos para análisis en caracterización química de la materia prima en la industria de la pulpa y papel, entre ésta se encuentra la lignina. Estos estándares ayudarán a preparar la materia prima de residuos de café (*Coffea arabica*) para la obtención de la lignina, así como determinar el % de humedad antes de la reacción de obtención, el % de lignina y otros compuestos resultantes. Los estándares están secuenciados de acuerdo a la Figura 2.1.

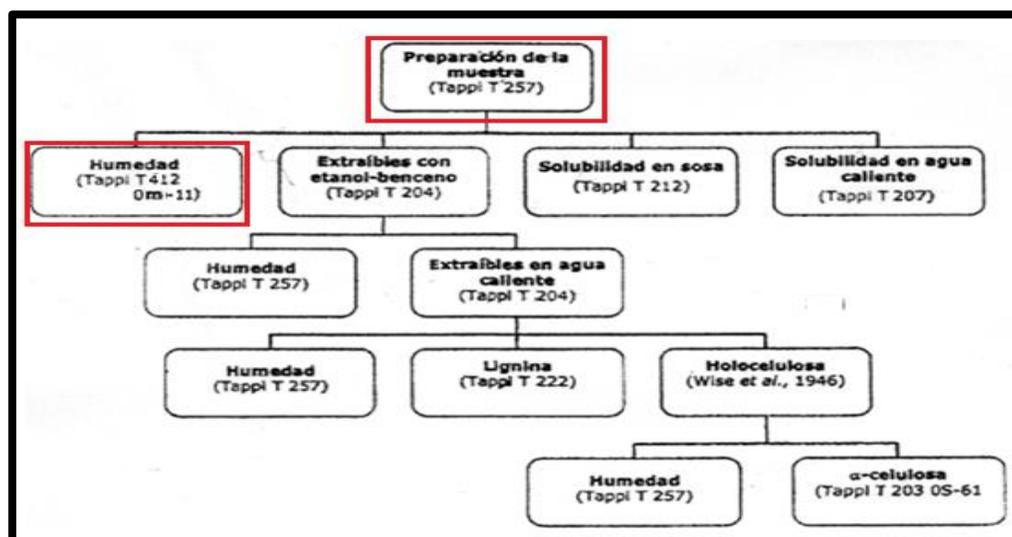


Figura 2.1 Secuencia de estándares TAPPI para análisis en caracterización química de la materia prima en la industria de la pulpa y papel. [35]

2.2.1.1 Preparación de la muestra del material vegetal (Tappi T-257-cm 02)

1. Se recolectó el material vegetal (los residuos de café son los desechos en forma de trazas sólidas pastosas que quedan en el filtro después de prepararse la bebida de café).
2. Se lavó el material vegetal con agua destilada.
3. Se secó el material vegetal a temperatura ambiente durante 24 horas.
4. Se trituro y tamizó el material vegetal utilizando un Tamiz Malla 40 (0.420 mm).
5. Se empaquetó y etiquetó el material vegetal tamizado en bolsas selladas para evitar cualquier alteración de la muestra.



Figura 2.2 Material vegetal de residuos de café (*Coffea arabica*)

2.2.1.2 Determinación de la humedad del material vegetal (Tappi T-412-OM-11)

Los materiales lignocelulósicos son higroscópicos y dependiendo del tipo de material y de las condiciones ambientales pueden tener un grado de humedad muy diferente, que normalmente varía entre un 5 y un 50% de su peso.

En la figura 2.3 se muestran los vasos de precipitado con el contenido de muestra de residuos de café listos para ser pesados.



Figura 2.3 Muestra seca de residuos de café

De acuerdo a la norma Tappi T-412, el modo de operar consistió en lo siguiente:

1. Se pesaron aproximadamente 2 gramos de muestra de material vegetal en un vaso de precipitado a peso constante.
2. Se secó la muestra al introducir el vaso en la estufa a 105 °C durante 24 horas. De esta manera se eliminó el agua del material lignocelulósico para poder cuantificar el porcentaje de biomasa.
3. Se calculó el porcentaje de humedad total de la muestra de material vegetal (para referir los datos de cálculo constante, todas las operaciones se deben realizar en base seca; es decir, libre de humedad) utilizando la ecuación 2.1.
4. Se elaboró el procedimiento anterior por duplicado para corroborar resultados, en especial en el paso del peso del vaso y la muestra.

$$H = \left(\frac{PRMH - PRMS}{PRMH - PRS} \right) * 100 \dots\dots\dots \text{Ecuación 2.1}$$

Donde:

H = Porcentaje de humedad de la muestra

PRMH = Peso en gramos del vaso seco con la muestra húmeda inicial.

PRS = Peso en gramos del vaso seco a peso constante.

PRMS = Peso en gramos del recipiente con la muestra seca.

5. Se calculó el valor del porcentaje de sequedad, referido en base seca, a partir de la ecuación 2.2.

$$S = 100 - H \dots\dots\dots \text{Ecuación 2.2}$$

Donde:

S = Porcentaje de sequedad de la muestra

H= Porcentaje de humedad de la muestra

2.2.2 Método de reacción de pulpeo alcalino como pretratamiento para el fraccionamiento de lignina [16]

1. Para conocer la cantidad de agua a añadir al reactor, se utilizó el hidromódulo de relación 1:14 (14 ml de agua por cada gramo seco de materia). Una vez realizado este cálculo, se conoce la cantidad de agua que se añade a la vasija del reactor junto con la muestra de residuo de café.
2. Para determinar la cantidad de muestra de residuos de café a añadir al reactor, se usaron en base seca 50 gr de muestra, se sumó el porcentaje de humedad obtenido en el paso 1. El resultado es la cantidad de muestra húmeda en gramos que se añade a la vasija del reactor.
3. Se agregaron 0.05 g de Antraquinona como catalizador.
4. Se calculó la cantidad de solución de NaOH (37.5 p/p) a agregar mediante el software de simulación desarrollado, en base a la introducción de los datos de peso húmedo, hidrómodulo y las condiciones de operación de las variables de tiempo y temperatura.

5. Se cerró herméticamente el reactor y se encendieron los controladores de temperatura y presión. Una vez que llegó la temperatura a 125°C, se mantuvo durante 60 minutos el desarrollo de la reacción. En la figura 2.4 se muestra el reactor utilizado.
6. Después de transcurrir los 60 min a 125 °C, se apagó el reactor, se liberó la presión y se esperó a que se enfriara.
7. Se abrió el reactor y se filtró el contenido de la vasija utilizando un colador, se recuperó el líquido en un recipiente, el sólido se queda dentro del colador y se lavó hasta que el agua no tuviera coloración.



Figura 2.4 Reacción de obtención de lignina en Reactor Prendo RAP-2000

8. Se almacenó a temperatura ambiente el líquido filtrado en un recipiente (licor negro) y se muestra en la figura 2.5.



Figura 2.5 Licor negro obtenido a partir de la reacción de obtención de lignina de los residuos de café

2.2.3 Separación y purificación de la lignina

1. Se pasó el licor negro (obtenido en el método de reacción de pulpeo alcalino) a través de un embudo de Buchner con papel filtro y se llevó a cabo la filtración al vacío. Se recuperó el líquido filtrado en un recipiente.
2. Se llevó a cabo la precipitación de la lignina mediante la acidificación, mezclando el líquido filtrado en agitación constante con volúmenes de H_2SO_4 al 30% p/p hasta alcanzar un pH igual a 2.
3. Se centrifugó la muestra acidificada a 3500 rpm durante 15-20 minutos.
4. Se secó el sólido recuperado de la centrifugación durante 24 hr a 50 °C.

En la figura 2.6, se muestra el diagrama de flujo la secuencia completa de la metodología del proceso de obtención de lignina, explicado en el punto 2.2.

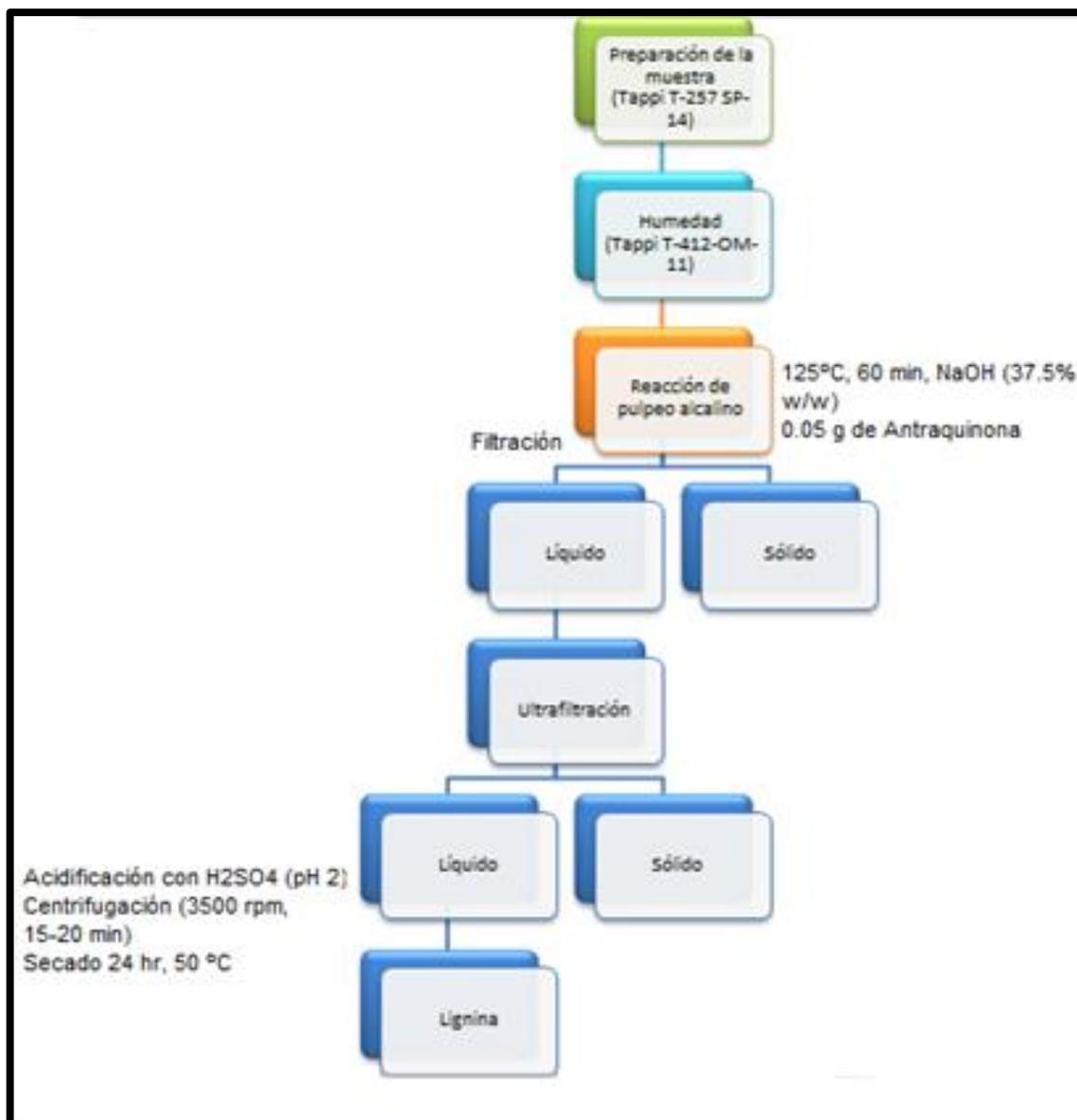


Figura 2.6 Secuencia de metodología para la obtención de la lignina. [16]

En la figura 2.7, se presenta de forma ilustrativa la secuencia del proceso de separación y purificación de la lignina.

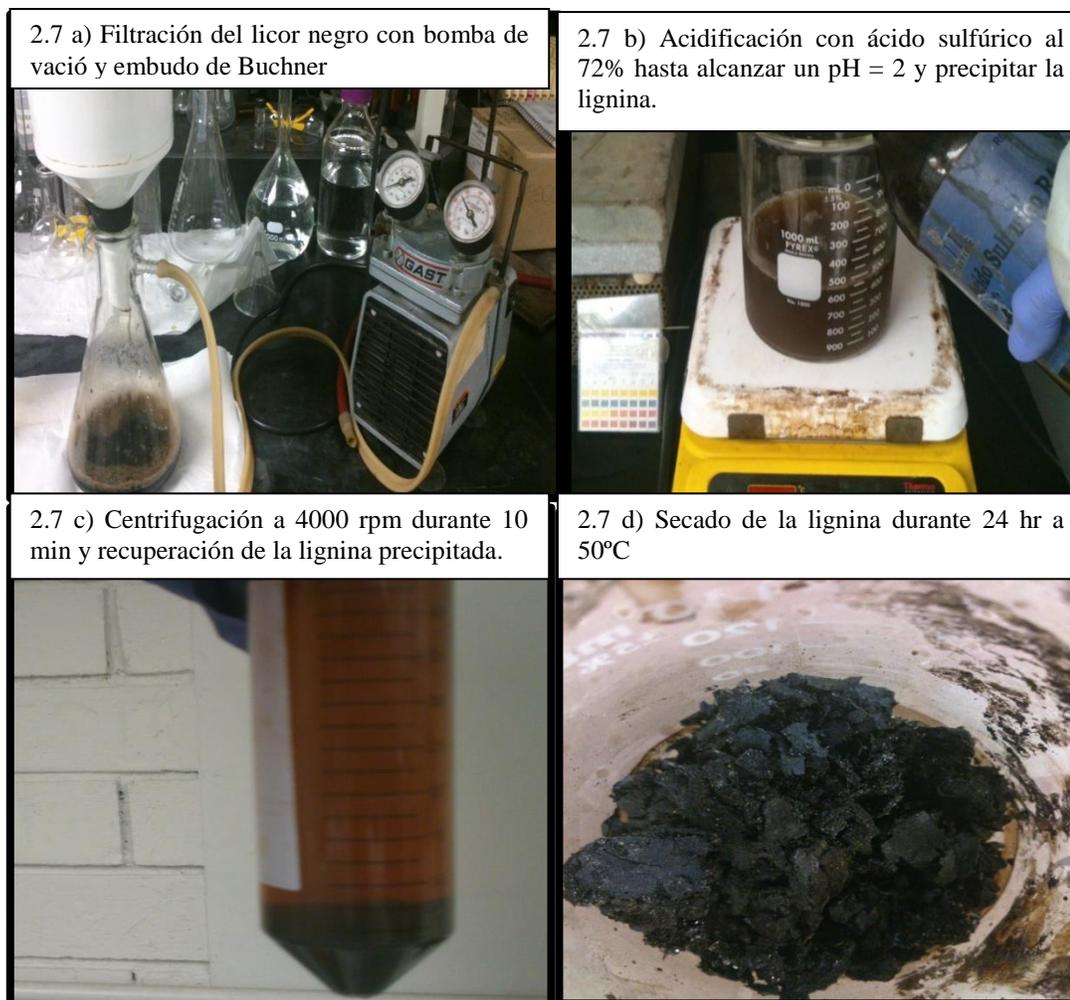


Figura 2.7 Proceso de separación y purificación de la lignina del café

2.2.3.1 Cálculo de concentración de lignina presente en el licor negro por el método de centrifugación

1. Se pesaron 2 tubos de centrifugado vacíos previamente secados una noche antes a 50°C.

2. Se introdujeron 8 ml de licor negro a cada tubo de centrifugado y se centrifugaron a 3500 rpm durante 20 min.
3. Se retiró el líquido sobrenadante.
4. Se secaron los 2 tubos de centrifugado con el sólido que se precipitó durante 24 hr a 50 °C.
5. Se pesaron los 2 tubos de centrifugado con las muestras sólidas.
6. El resultado se obtuvo utilizando la ecuación 2.3.

$$\% \text{ lignina} = \left(\frac{M_f - M_i}{V} \right) * 100 \dots\dots \text{Ecuación 2.3}$$

Donde:

M_f es el peso del tubo de centrifugado seco + lignina (g).

M_i es el peso del tubo de centrifugado (g).

V es la fracción de volumen líquido (ml).

2.3 Fragmentación de la lignina

2.3.1 Reacción de hidrólisis térmica alcalina

1. Se agregaron 15 gr de muestra de lignina a la vasija del reactor utilizado en el proceso de fraccionamiento de lignina mediante la reacción de pulpeo alcalino mencionado en el punto 2.2.2.
2. Para conocer la cantidad de agua a añadir al reactor, se utilizó el hidromódulo de relación 1:20 (20 ml de agua por cada gramo seco de lignina). Una vez realizado este cálculo, se conoció la cantidad de agua que se le añade a la vasija del reactor junto con la muestra.
3. Se agregó la cantidad de solución de NaOH (4% p/p) referente al peso de la muestra de lignina a la vasija del reactor.

4. Se cerró herméticamente el reactor y se encendieron los controladores para que comenzara a subir la temperatura. Se siguió el diseño de experimentos que se explica en el punto 2.3.1.1 para determinar las condiciones de tiempo y temperatura en las que se llevó a cabo cada reacción (se llevaron a cabo varias reacciones de acuerdo al diseño de experimentos).
5. Después de llegar a la temperatura de reacción, se dejó transcurrir el tiempo establecido y posteriormente se apagó el reactor, se liberó la presión y se esperó a que se enfriara.
6. Se abrió el reactor y se depositó la muestra obtenida en un recipiente. La muestra obtenida es una mezcla de compuestos fenólicos, cenizas y lignina residual.

2.3.1.1 Diseño de experimentos

Las variables de operación más influyentes en el método de hidrólisis térmica son la temperatura y el tiempo de operación. En la tabla 2.1 se observa el diseño de experimentos que se utilizó para determinar las condiciones óptimas de fragmentación de la lignina y más eficientes para la obtención de compuestos fenólicos. Se operó a 3 temperaturas y 2 tiempos diferentes, con un hidromódulo de 1:20 (20 ml de agua por cada gramo de lignina), con una carga de 15 gr de lignina y con 4% p/p de solución de NaOH. La hidrólisis térmica se llevó a cabo en el reactor marca Prendo modelo RAP-2000 de acero al carbón y con capacidad de 2 litros, calentamiento externo mediante una parrilla y manómetro de 1000 psi. [3] [17]

Tabla 2.1 Variables del método de hidrólisis térmica para fragmentar la lignina [17]

	-1	0	+1
Tiempo (min)	60	-	120
Temperatura (°C)	160	200	225

Los valores de -1, 0 y +1 mostrados en la tabla anterior nos indican los valores mínimo, central y máximo, respectivamente. Una vez conocidas las variables de las condiciones de operación del método de hidrólisis térmica para la fragmentación de la lignina, el diseño de experimentos quedaría de acuerdo a la Tabla 2.2, donde se puede observar que son 6

experimentos los que se llevaron a cabo, ya que son 3 temperaturas y 2 tiempos ($3 \times 2 = 6$ experimentos), los cuales se combinaron para llevar a cabo cada experimento combinando cada temperatura con los 2 tiempos. [17]

Tabla 2.2 Diseño de experimentos de las condiciones de hidrólisis térmica para la fragmentación de la lignina. [17]

# de experimento	Tiempo (min)		Temperatura (°C)	
	X_t	X_T	X_t	X_T
1	60	-1	160	-1
2	120	+1	160	-1
3	60	-1	200	0
4	120	+1	200	0
5	60	-1	225	+1
6	120	+1	225	+1

2.3.2 Separación y purificación de compuestos fenólicos, cenizas y lignina residual [3]

1. Se acidificó la muestra agregándole HCl (37%) hasta alcanzar pH 1-2. Esto provocó la aparición de un sólido.
2. Se filtró la muestra acidificada para separar el sólido y el líquido.
3. Se realizó una extracción líquido-líquido a la muestra líquida utilizando como solvente el acetato de etilo para separar los compuestos fenólicos.
4. Se juntaron todos los extractos obtenidos y se realizó una evaporación al vacío para que se evaporara el solvente y se obtuvo el aceite con los compuestos fenólicos.
5. Se procedió a separar las cenizas y la lignina de la muestra sólida. Para ello, se solubilizó con tetrahidrofurano la muestra sólida previamente obtenida y se filtró por gravedad. Las cenizas se quedaron retenidas en el filtro y el líquido filtrado es la solución de lignina residual con tetrahidrofurano.
6. Se realizó una evaporación al vacío para retirar el solvente de tetrahidrofurano y recuperar la lignina residual.

- Se determinó el rendimiento de los tres productos (aceite con compuestos fenólicos, cenizas y lignina residual) con métodos gravimétricos, referidos al peso inicial de lignina.

En la figura 2.8, se muestra en forma de diagrama de flujo la secuencia completa de la metodología del proceso de fragmentación de lignina, explicado en el punto 2.3.

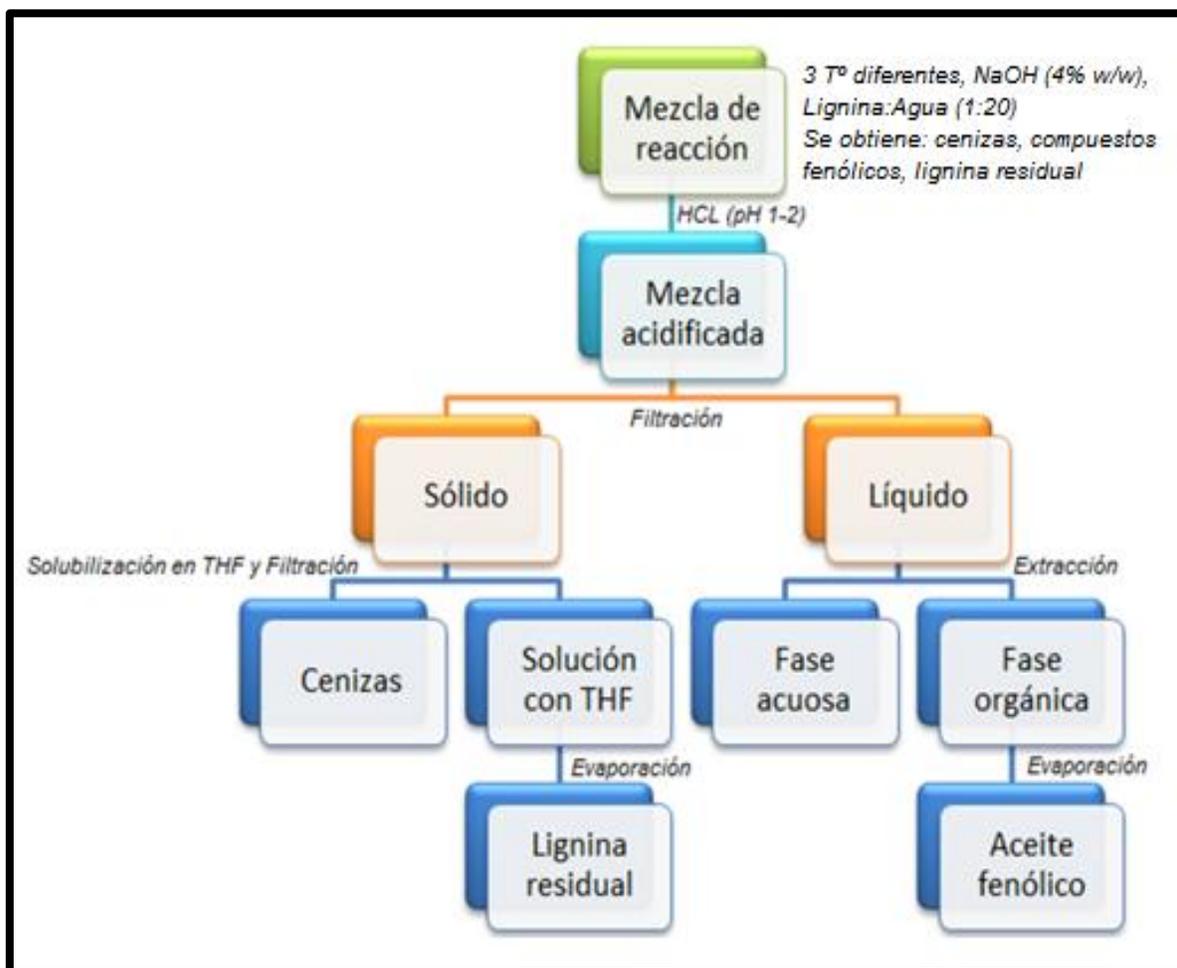


Figura 2.8 Secuencia de metodología para la fragmentación de la lignina. [3]

En la figura 2.9 se muestran las imágenes de los pasos del proceso de separación y purificación de aceite fenólico.

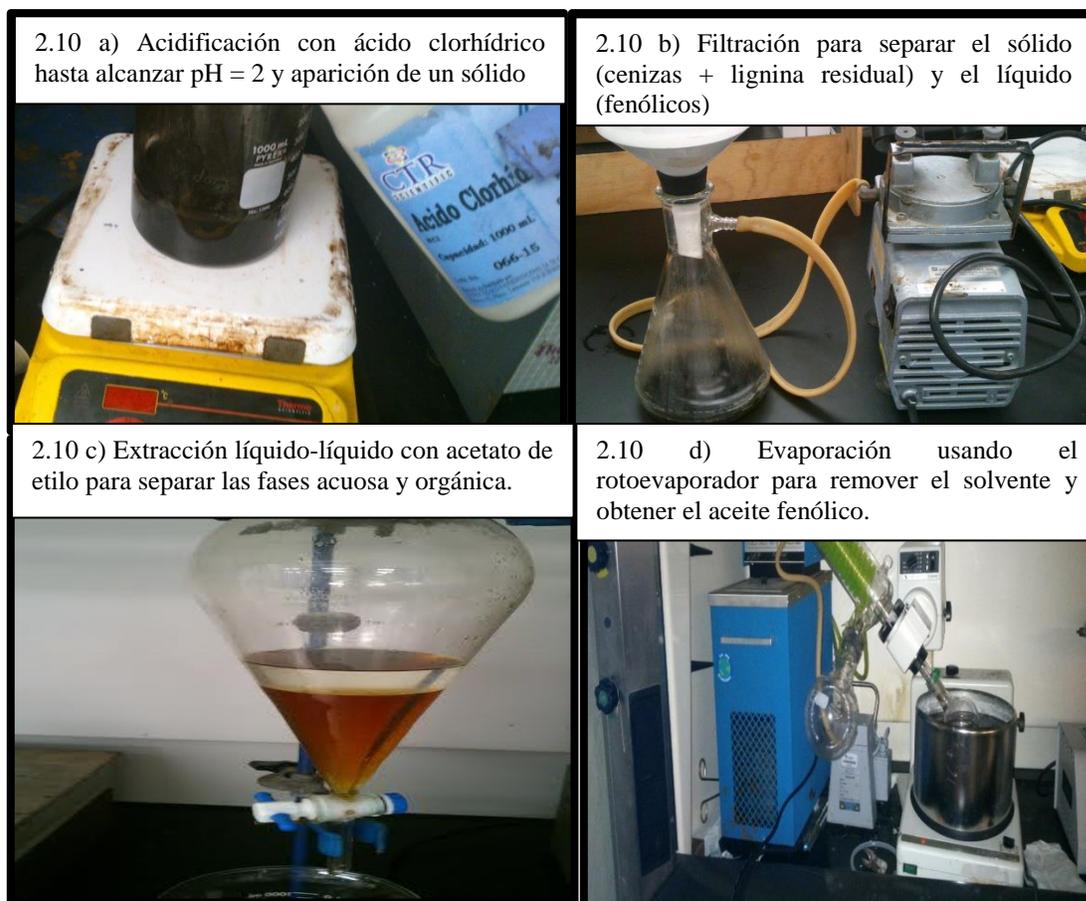


Figura 2.9 Proceso de separación y purificación de aceite fenólico

En la Figura 2.10 se explica en forma ilustrativa con fotografías el proceso de separación de cenizas y lignina residual, paso por paso.

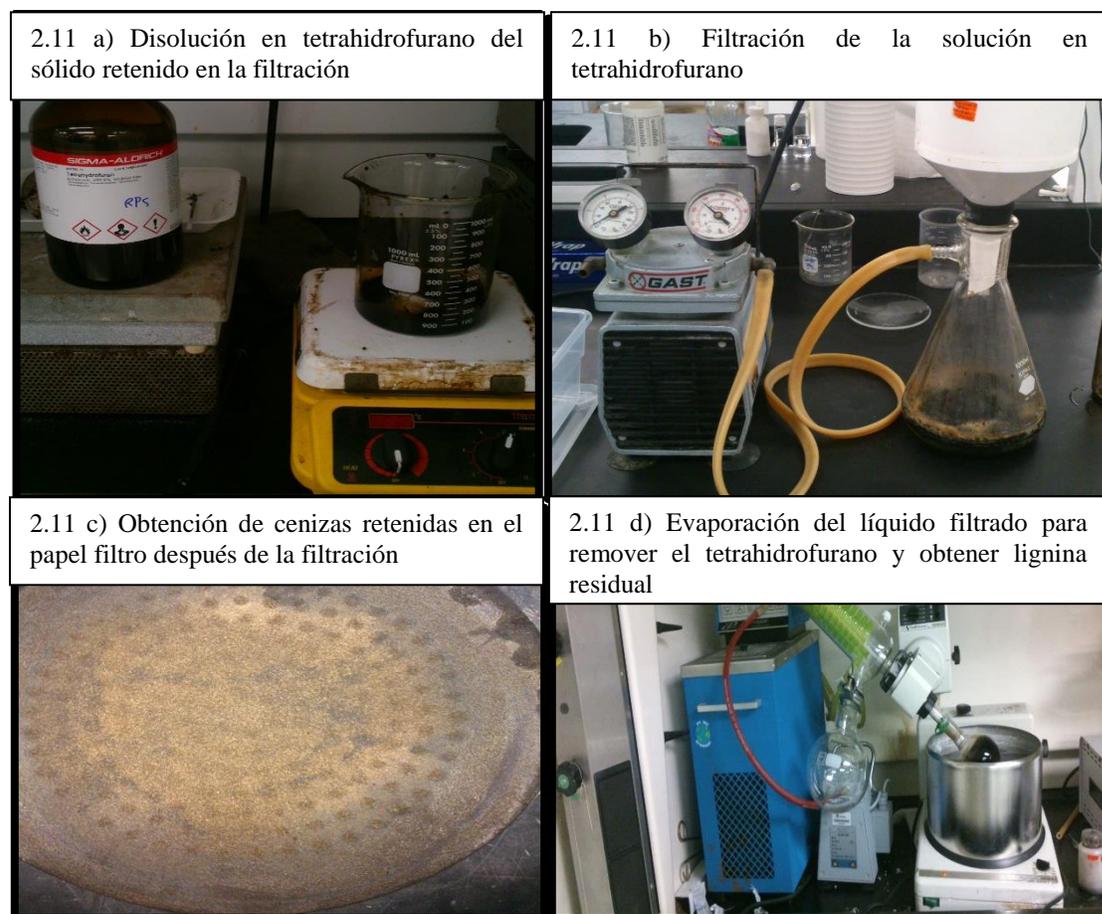


Figura 2.10 Proceso de separación de cenizas y lignina residual

2.4 Caracterización de la lignina y del aceite fenólico

Para cualificar y cuantificar los compuestos fenólicos presentes en el aceite fenólico, se utilizó la técnica de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS). Para corroborar que efectivamente se obtuvo lignina después del método del fraccionamiento y de la separación y purificación, y para verificar la existencia de los compuestos fenólicos de interés, se utilizó la técnica de espectroscopía FTIR.

2.4.1 Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

La lignina obtenida en el método de obtención, así como los compuestos fenólicos obtenidos en el método de fragmentación, se caracterizaron primeramente a través del método de espectroscopía FTIR, con un ATR acoplado al espectrómetro. Es recomendable preparar las muestras a través de una molienda con mortero y pistilo para que las muestras tengan la consistencia de un polvo fino, y así facilitar la caracterización con el ATR acoplado. Los espectros obtenidos se ajustaron para eliminar los ruidos. Con los espectros se determinó la presencia de lignina en las muestras mediante la observación de los grupos funcionales que conforman la estructura de la lignina, así como la determinación de presencia de los compuestos fenólicos de interés. El espectro de transmitancia se llevó a cabo bajo 20 escaneos en un rango de longitud de onda desde 4000 hasta 600 cm^{-1} . [36]

El equipo que se utilizó se muestra en la figura 2.11, el cual es de la marca Thermo Scientific, modelo Nicolet iS10, con ATR de selenuro de zinc. La ubicación del equipo es en el Centro de Investigación del Instituto Tecnológico de Nuevo León, en Apodaca, Nuevo León.



Figura 2.11 Espectrómetro FTIR marca Thermo Scientific y modelo Nicolet iS10

2.4.2 Cromatografía de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas

Esta técnica combina la capacidad de separación que presenta la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas. Esta combinación permite analizar e identificar los compuestos en mezclas complejas con un alto grado de efectividad. [37]

Primeramente, se preparó la muestra de los compuestos fenólicos estándar. Debido a que interesan el fenol, el m-cresol, el catecol, el guayacol, el 4-metilcatecol y el siringol, se contó con estos 6 compuestos obtenidos de manera comercial, entonces primero se aplicó el método de cromatografía con los blancos; es decir, con los 6 compuestos comerciales para realizar la curva de calibración. La muestra se preparó mediante la elaboración de una solución de los 6 compuestos fenólicos estándar de 1000 ppm. Para ello, se agregaron 0.01 g de cada compuesto fenólico en 5 ml de acetato de etilo, se agitó la solución para que queden bien solubilizados los compuestos, y se aforó la solución a 10 ml de acetato de etilo.

Posteriormente, para la elaboración de la curva de calibración, se prepararon soluciones de volumen de 10 ml con las siguientes concentraciones: 10, 20, 30, 50, 100 y 120 ppm. Para ello, se realizaron diluciones de la solución de 1000 ppm.

En la tabla 2.3 se indican las condiciones de preparación de cada solución.

Tabla 2.3 Condiciones de preparación de soluciones de 10 ml a diferentes concentraciones para la curva de calibración en GC-MS

Concentración de las soluciones (ppm)	Cantidad a añadir de solución estándar de 1000 ppm (ml)	Cantidad a añadir de acetato de etilo (ml)
10	0.1	9.9
20	0.2	9.8
30	0.3	9.7
50	0.5	9.5
100	1	9
120	1.2	8.8

En la figura 2.12 se muestran las soluciones preparadas.



Figura 2.12 Soluciones de compuestos fenólicos comerciales para la curva de calibración

Después, se procede a pesar 18 viales de 10 ml, y una vez conocidos los pesos de los viales vacíos, se traspasan las muestras de aceite fenólico a estos viales y se pesan para conocer su peso antes de concentrarlas. Posteriormente, se procedió a concentrar las muestras de aceite fenólico para prepararlas para el análisis en el GC-MS y así determinar de forma cuantitativa y cualitativa los compuestos presentes en la muestra, a través del análisis de los tiempos de retención.

La concentración o secado de las muestras de aceite fenólico se realizó mediante la aplicación directa de flujo de nitrógeno a las muestras.

Para esto, tal como se muestra en la figura 2.13 se utilizó el equipo Thermo Scientific Reacti Therm III, el cual ayudó a transferir el flujo de nitrógeno a varias muestras al mismo tiempo.



Figura 2.13 Secado y concentración de muestras de aceite fenólico mediante flujo de nitrógeno con el equipo Reacti Therm III de Thermo Scientific.

Una vez concentradas las muestras, se pesaron para conocer su peso después de la concentración y así determinar la diferencia en peso antes y después de secarlas y conocer la cantidad de sólidos que se retuvieron y la cantidad de solvente que se evaporó. Estos datos de los pesos ayudarán para la cuantificación de los compuestos fenólicos que se encuentren en el análisis en el GC-MS.

Las muestras de aceite fenólico concentradas se aforaron a 1 ml del solvente de acetato de etilo, se agitaron bien para que la muestra concentrada se solubilice en el solvente y se trasvasaron a los viales exclusivos para uso en el equipo GC-MS, con capacidad de 1.5 ml. Lo mismo se hace para las muestras para la curva de calibración; se toma 1 ml de cada solución de compuestos fenólicos comerciales a las 6 diferentes concentraciones y se coloca en los mismos viales exclusivos para el GC-MS.

Finalmente, se procede a la caracterización en el GC-MS de las soluciones a diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos comerciales y de las muestras de aceite fenólico

para así obtener la curva de calibración y también para poder determinar las concentraciones de los compuestos fenólicos de interés en las muestras de aceite fenólico. La corrida del análisis comenzó con una temperatura de la columna de 45 °C que se mantuvo durante 1 min; posteriormente se subió la temperatura a 200 °C con una rampa de 5 °C/min que se mantuvo durante 1 minuto y la corrida fue de 33 min. Enseguida, se aplicó una segunda rampa de 10 °C/min hasta alcanzar la temperatura de 310 °C que se mantuvo durante 3 minutos y la corrida fue de 47 min. La temperatura del inyector fue de 280 °C y la temperatura de la fuente de ionización y el cuadrupolo fue de 230 y 150 °C, respectivamente. El gas acarreador es de helio, con un flujo de 1.0 ml/ min.

El equipo de cromatografía de gases que se utilizó es de la marca Agilent 6890 Series, y el espectrómetro de masas es Agilent 5973 Network. La columna que se utilizó es HP-5MS (5% difenil – 95% metilpolisiloxano) de 30 m * 0.25 mm * 0.25 µm. Este equipo se encuentra en el Laboratorio del Centro del Agua, ubicado en el sótano 2 del edificio CEDES del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, en la ciudad de Monterrey, Nuevo León.

En la figura 2.14 se muestra el equipo en forma ilustrativa.



Figura 2.14 Cromatógrafo de gases marca Agilent 6890 Series acoplado a un espectrómetro de masas marca Agilent 5973 Network

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de la materia prima de residuos de café (*Coffea arabica*)

3.1.1. Humedad (Tappi T-412 OM-11)

Con la ecuación 3.1 se calculó el valor del porcentaje de humedad para los residuos de café (*Coffea arabica*) un día después de sacarlos de la cafetera y dejarlos reposando a temperatura ambiente. Estos resultados se muestran en la tabla 3.1. El peso seco es importante en cálculos posteriores donde las operaciones se deben de realizar en base seca (libre de humedad).

$$H = \left(\frac{PRMH - PRMS}{PRMH - PRS} \right) * 100 \dots\dots Ecuación 3.1$$

Donde:

H = Porcentaje de humedad de la muestra

PRMH = Peso en gramos del vaso seco con la muestra húmeda inicial.

PRS = Peso en gramos del vaso seco a peso constante.

PRMS = Peso en gramos del recipiente con la muestra seca.

De acuerdo a la ecuación 3.2 el porcentaje de sequedad de los residuos de café (*Coffea arabica*) fue calculado un día después de sacarlos de la cafetera y dejarlos reposando a temperatura ambiente. Los valores de porcentaje de humedad y sequedad en las pruebas posteriores fueron calculados con estas dos ecuaciones.

$$S = 100 - H \dots\dots Ecuación 3.2$$

Donde:

S = Porcentaje de sequedad de la muestra

H= Porcentaje de humedad de la muestra

En la tabla 3.1 se presentan los resultados del porcentaje de humedad y sequedad obtenidos a partir de los residuos de café (*Coffea arabica*).

Tabla 3.1 Porcentaje de humedad y sequedad en los residuos de café (*Coffea arabica*)

Muestra	Peso del vaso (g)	Peso del vaso + muestra húmeda (g)	Peso del vaso + muestra seca (g)	% Humedad	% Sequedad
Residuos de café (<i>Coffea arabica</i>)	66.24	68.26	67.08	58.42	41.58
	66.27	68.27	67.11	58.00	42.00
			Promedio	58.21	41.79

Los residuos del café (*Coffea arabica*) poseen en promedio un 58.21% de humedad, por lo tanto el 41.79% de peso de los residuos del café es materia seca útil. En vista que se trata de un material higroscópico que en su uso se le agrega agua, el resultado es coherente, además de que la celulosa y la hemicelulosa son las responsables de absorber el agua en los materiales lignocelulósicos. Sin embargo, hay otras plantas como el tule, que por ser de origen acuático, absorben mucha más humedad que los residuos de café.

3.2. Rendimiento de lignina obtenida

Para calcular la concentración de la lignina, dos métodos fueron utilizados y los resultados de ambos fueron corroborados para compararlos y observar si dieron igual o no. El primer método fue el de centrifugación, el cual fue establecido en el capítulo 2, en el subtema 2.2.3.1, utilizando la ecuación 3.3, la cual es la siguiente:

$$\% \text{ lignina} = \left(\frac{M_f - M_i}{V} \right) * 100 \dots\dots \text{Ecuación 3.3}$$

Donde:

Mf es el peso del tubo de centrifugado seco + lignina (g).

Mi es el peso del tubo de centrifugado (g).

V es la fracción de volumen líquido (ml).

Dos tubos de centrifugado (con capacidad de 15 ml) fueron previamente secados un día antes a 50°C. Posteriormente, 8 ml de licor negro fueron agregados a cada tubo, y la centrifugación se llevó a cabo a 3500 rpm durante 20 min. El líquido sobrenadante fue retirado, y los tubos con la lignina precipitada fueron secados a 24 hr a 50°C. Los tubos después del secado se pesaron. Para finalizar, con la ecuación 2.3 se realizó el cálculo en cada tubo para determinar el porcentaje de concentración de lignina.

A continuación, en la tabla 3.2, se muestran los resultados obtenidos de cada tubo:

Tabla 3.2 Resultados de rendimiento de lignina de cada tubo por el método de centrifugación

Número de tubo	Mi (g)	Mf (g)	V (ml)	% lignina
1	6.79	8.67	8	23.5
2	6.72	8.52	8	22.5

El segundo método fue mediante el cálculo del porcentaje de rendimiento por una regla de tres, una vez conocida la determinación de los gramos de lignina obtenidos después de llevarse a cabo el procedimiento de obtención, separación y purificación de lignina, explicado en el capítulo 2, en los subtemas 2.2.2 y 2.2.3. La determinación de los gramos de lignina se hizo a partir de 2000 ml de licor negro. El total de gramos de lignina obtenidos a partir de 2000 ml de licor negro, fue de 45 gr en promedio.

Entonces, si se sabe que por cada 50 gr en base seca de residuos de café, se obtiene en promedio 500 ml de licor negro, por ende, por cada 200 gr en base seca de residuos de café, se

obtienen 2000 ml de licor negro, y por cada 2000 ml de licor negro, se obtienen 45 gr de lignina en promedio.

Finalmente, haciendo el cálculo de la regla de tres, el cual queda de la siguiente manera:

$$\frac{200 \text{ gr en base seca de residuos de café}}{100 \%} \rightarrow \frac{45 \text{ gr de lignina}}{X (\%)}$$

Da como resultado que el porcentaje de rendimiento de la lignina correspondiente a 200 gr en base seca de residuos de café como muestra y 2000 ml de licor negro es igual a 22.5%

Se aprecia que al realizar la comparación entre los dos métodos, ambos resultados fueron semejantes, por lo que queda comprobado que el resultado es el correcto. Así mismo, Kline y colaboradores [21] reporta que la concentración de lignina en el material lignocelulósico se encuentra en el rango de 15-25%, dependiendo del tipo de planta y la parte de la planta. Es así que se confirma que el resultado obtenido de 22.5% de concentración de lignina es el adecuado, ya que se encuentra dentro del rango reportado en la literatura.

3.3 Rendimientos de aceite fenólico, cenizas y lignina residual

Los subproductos obtenidos de cada reacción de fragmentación de la lignina son los siguientes: aceite fenólico, cenizas y lignina residual. Se realizó el proceso de separación y purificación para poder obtener estos productos de forma separada y así poder determinar sus rendimientos referidos al peso inicial de la lignina utilizada para la fragmentación (15 gr).

Las cenizas son un producto indeseable que se queda retenido en el papel filtro después del proceso de filtración del sólido solubilizado con tetrahidrofurano. Por lo tanto, para poder determinar su rendimiento, se pesó primeramente el papel filtro nuevo, y posteriormente se procedió a pesar el papel filtro con el contenido de cenizas después de la filtración. Se realizó la resta correspondiente de estos dos pesos y se obtuvo el resultado en gramos del peso de las cenizas. Este procedimiento se hizo en todas las muestras.

La lignina residual representa la lignina que no se alcanzó a fragmentar durante la reacción, por lo que la determinación de su rendimiento ayuda a determinar la eficiencia de la reacción, cuyo objetivo es fragmentar la mayor cantidad de lignina inicial.

La lignina residual se obtuvo después de la evaporación del tetrahidrofurano en el rotoevaporador. Como la lignina residual se quedó depositado dentro del matraz bola, se pesó primeramente el matraz bola vacío, y posteriormente se pesó el matraz bola con la lignina residual. Se realizó la resta correspondiente de estos dos pesos y se obtuvo el resultado en gramos del peso de la lignina residual. Este procedimiento se hizo en todas las muestras.

A continuación, en la Tabla 3.3 se muestran los resultados en gramos de la cantidad de cenizas y lignina residual de cada muestra a su respectiva temperatura y tiempo.

Tabla 3.3 Cantidad de cenizas y lignina residual (en gramos) de las 18 muestras a 160, 200 y 225 °C, y a 60 y 120 min

Peso (en gramos)	Cenizas						Lignina residual					
	160 °C		200°C		225 °C		160 °C		200 °C		225 °C	
	60 min	120 min	60 min	120 min	60 min	120 min	60 min	120 min	60 min	120 min	60 min	120 min
Muestra 1	1.89	1.30	1.38	0.84	1.86	3.04	8.58	2.13	13.1	4.81	9.52	3.61
Muestra 2	1.30	1.19	0.59	1.59	2.42	1.29	9.59	2.3	5.23	6.32	9.66	7.2
Muestra 3	1.15	2.49	0.44	2.1	2.01	3.15	10.54	3.2	10.16	2.4	7.58	7.25

Posteriormente, se dividen los pesos anteriores entre los 15 g de lignina inicial, y se multiplica por 100 para obtener el porcentaje de rendimiento de cada muestra de cenizas y lignina residual a las condiciones de temperatura y tiempo respectivas.

Estos datos se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4 Porcentaje de rendimiento de cenizas y lignina residual de las 18 muestras a 160, 200 y 225 °C, y a 60 y 120 min

Rendimiento (en %)	Cenizas						Lignina residual					
	160 °C		200°C		225 °C		160 °C		200 °C		225 °C	
	60 min	120 min	60 min	120 min	60 min 120 min	120 min						
Muestra 1	12.6	8.66	9.2	5.6	12.4	20.26	57.2	14.2	87.33	32.06	63.46	24.06
Muestra 2	8.66	7.93	3.93	10.6	16.13	8.6	63.93	15.33	34.86	42.13	64.4	48
Muestra 3	7.66	16.6	2.93	14	13.4	20	70.26	21.33	67.73	16.0	50.53	48.33

Se hizo un promedio de los porcentajes de rendimiento de cada una de las muestras (1,2,3) a su respectiva temperatura y tiempo, ya que los resultados fueron variables en algunos casos y el objetivo es presentar un valor único promedio y representativo del porcentaje de rendimiento de cada subproducto a cada una de las temperaturas y tiempos definidos. Estos resultados se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5 Promedio de porcentaje de rendimiento de cenizas y lignina residual (en gramos) a 160, 200 y 225 °C, y a 60 y 120 min

Rendimiento (en %)	Cenizas						Lignina residual					
	160 °C		200°C		225 °C		160 °C		200 °C		225 °C	
	60 min	120 min	60 min	120 min	60 min 120 min	120 min						
Promedio	9.64	11.06	5.35	10.06	13.97	16.62	63.8	16.95	63.31	30.06	59.46	40.13

En la figura 3.1 se muestra las imágenes de la lignina residual y las cenizas obtenidas de cada muestra a 160 °C junto con sus respectivos tiempos (60 y 120 min).

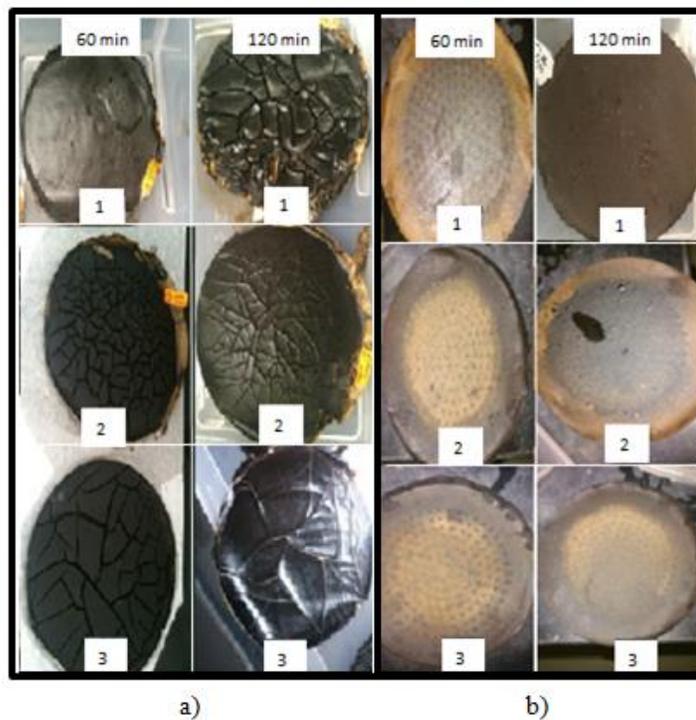


Figura 3.1 a) Mezcla de lignina residual y cenizas y b) cenizas de cada muestra a 160 °C y a 60 y 120 min

En la figura 3.2 se muestra las imágenes de la lignina residual y las cenizas obtenidas de cada muestra a 200 °C junto con sus respectivos tiempos (60 y 120 min).

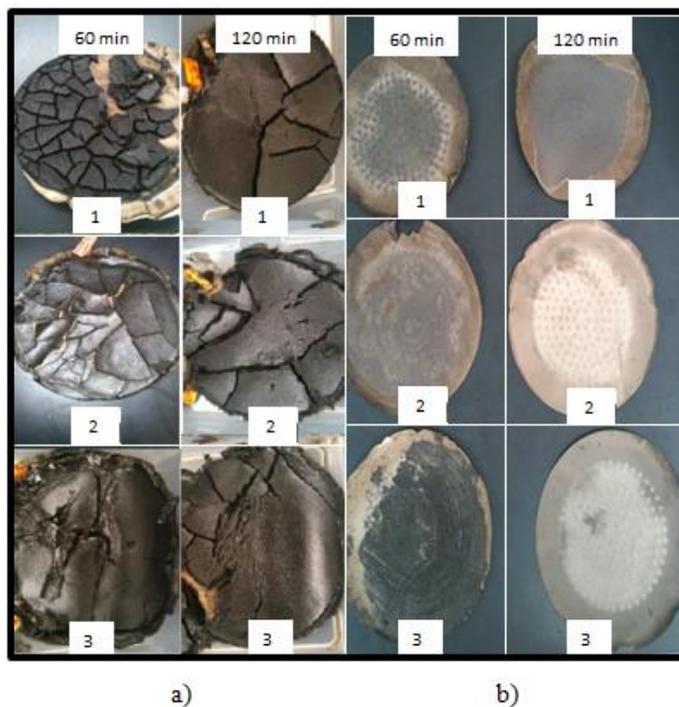


Figura 3.2 a) Mezcla de lignina residual y cenizas y b) cenizas de cada muestra a 200 °C y a 60 y 120 min

En la figura 3.3 se muestra las imágenes de la lignina residual y las cenizas obtenidas de cada muestra a 225 °C junto con sus respectivos tiempos (60 y 120 min).



Figura 3.3 a) Muestras de mezcla de lignina residual y cenizas y b) cenizas de cada muestra a 225 °C y a 60 y 120 min

La figura 3.4 corresponde a la imagen ilustrativa de las muestras de aceite fenólico a 160 y 200°C. Se aprecia que son de un color entre anaranjado y amarillento.



Figura 3.4 Muestras de aceite fenólico a 160 y 200 °C

Una vez obtenidos los promedios del porcentaje de rendimiento de las cenizas y la lignina residual, se procedieron a hacer los mismos cálculos anteriores, pero ahora para obtener el rendimiento del subproducto principal de la reacción de fragmentación de la lignina del café: el aceite fenólico. Para obtener el aceite fenólico, se filtró el líquido fragmentado acidificado, y el líquido filtrado se pasó por una extracción líquido-líquido con acetato de etilo, y finalmente la fase orgánica se evaporó para remover el solvente y obtener el puro aceite fenólico, el cual es un líquido de color ámbar-anaranjado. Se le denomina aceite debido a que su color es similar al del aceite vegetal después de utilizarse en la cocina, y su consistencia es ligeramente viscosa.

A continuación se muestran los resultados de la cantidad de aceite fenólico (en ml) de cada muestra a su respectiva temperatura y tiempo en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6 Cantidad de aceite fenólico (en mililitros) de las 18 muestras a 160, 200 y 225 °C, y a 60 y 120 min

Volumen (en ml)	Aceite fenólico					
	160 °C		200°C		225 °C	
	60 min	120 min	60 min	120 min	60 min	120 min
Muestra 1	4	5	8	5	7	5
Muestra 2	6.2	3	8.4	3	5	6
Muestra 3	5	4	6	4	8	7

Como los datos anteriores se presentan en unidades de volumen (en ml), y para obtener el porcentaje de rendimiento se necesita dividir estos datos entre el peso de la lignina inicial (el cual está en gramos), entonces se procedió a obtener el peso de cada muestra de aceite fenólico, pesando primero el vial vacío, luego se pesó el vial con el aceite, y se hizo la resta correspondiente para obtener el peso del aceite fenólico.

En la Tabla 3.7 se muestran los pesos resultantes de cada muestra de aceite fenólico a las tres temperaturas y dos tiempos.

Tabla 3.7 Peso de aceite fenólico (en gramos) de las 18 muestras a 160, 200 y 225 °C, y a 60 y 120 min

Peso (en gr)	Aceite fenólico					
	160 °C		200°C		225 °C	
	60 min	120 min	60 min	120 min	60 min	120 min
Muestra 1	2.42	2.13	7.85	2.59	3.63	2.18
Muestra 2	3.13	2.11	6.61	2.87	3.22	2.26
Muestra 3	2.69	2.70	5.72	3.20	2.15	2.36

Posteriormente, se dividen los pesos anteriores entre los 15 g de lignina inicial, y se multiplica por 100 para obtener el porcentaje de rendimiento de cada muestra de cenizas y lignina residual a las condiciones de temperatura y tiempo respectivas. Esto se aprecia en la tabla 3.8.

Tabla 3.8 Porcentaje de rendimiento de aceite fenólico de las 18 muestras a 160, 200 y 225 °C, y a 60 y 120 min

Rendimiento (en %)	Aceite fenólico					
	160 °C		200°C		225 °C	
	60 min	120 min	60 min	120 min	60 min	120 min
Muestra 1	16.14	14.22	52.36	17.26	24.20	14.52
Muestra 2	20.88	14.04	44.07	19.12	21.48	15.06
Muestra 3	17.94	18.02	38.14	21.35	14.32	15.71

Finalmente, del aceite fenólico, las cenizas y la lignina residual, se hizo un promedio de los porcentajes de rendimiento de cada una de las muestras (1,2,3) a su respectiva temperatura y tiempo, ya que los resultados fueron variables en algunos casos y el objetivo es presentar un valor único promedio y representativo del porcentaje de rendimiento de cada subproducto a

cada una de las temperaturas y tiempos definidos. Esto se muestra en las tablas 3.9 (cenizas y lignina residual).

Tabla 3.9 Promedio de porcentaje de rendimiento de cenizas y lignina residual a 160, 200 y 225 °C, y a 60 y 120 min

Rendimiento (en %)	Cenizas						Lignina residual					
	160 °C		200°C		225 °C		160 °C		200 °C		225 °C	
	60 min	120 min	60 min	120 min	60 min	120 min	60 min	120 min	60 min	120 min	60 min	120 min
Promedio	9.64	11.06	5.35	10.06	13.97	16.62	63.8	16.95	63.31	30.06	59.46	40.13

En la Tabla 3.10 se indica el promedio de porcentaje de rendimiento (aceite fenólico).

Tabla 3.10 Promedio de porcentaje de rendimiento de aceite fenólico a 160, 200 y 225 °C, y a 60 y 120 min

Rendimiento (en %)	Aceite fenólico					
	160 °C		200°C		225 °C	
	60 min	120 min	60 min	120 min	60 min	120 min
Promedio	18.32	15.42	44.86	19.24	20.00	15.10

En la Figura 3.5, se indica una gráfica con las comparaciones de los porcentajes de rendimiento de cada subproducto a la temperatura de 160 °C y a los dos tiempos establecidos como variables (60 y 120 min).

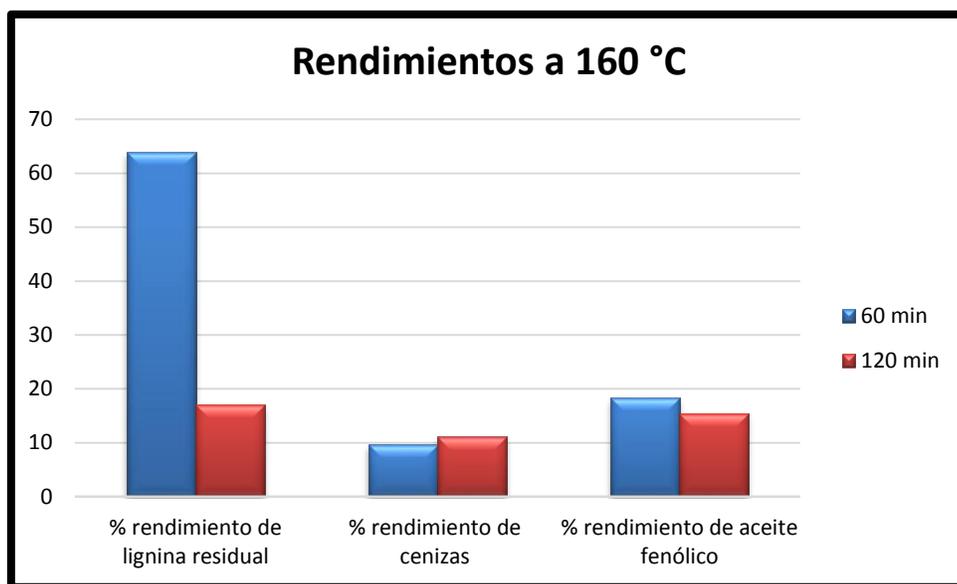


Figura 3.5 Porcentaje de rendimiento de los subproductos de la fragmentación de la lignina a 160 °C

Como se observa en el porcentaje de rendimiento de lignina residual a 60 min, la cantidad es considerablemente alta (63.8 %) con respecto a la cantidad a 120 min (16.96 %). Esto quiere decir que a mayor tiempo de reacción, disminuye la lignina residual, lo cual es bueno, ya que la lignina residual representa la lignina que no se alcanzó a fragmentar en la reacción de hidrólisis térmica alcalina, y el objetivo de la reacción es que se fragmente toda la cantidad de lignina posible que se introdujo al inicio. En cuanto al porcentaje de rendimiento de las cenizas, no se observa una notable diferencia entre los dos tiempos, por lo que la variable tiempo no es representativa para el caso de las cenizas. Cabe recordar que las cenizas son un material no deseado, y los porcentajes de 9.64% y 11.06% para la temperatura de 160 °C son bajos, por lo que esto se considera bueno porque mientras menor sea el rendimiento de cenizas, la reacción de fragmentación se lleva a cabo con menor cantidad de subproducto no deseado.

Para el caso del porcentaje de rendimiento del aceite fenólico, se observa una ligera diferencia con respecto a los dos tiempos. Al aumentar el tiempo de reacción, disminuyó ligeramente el rendimiento de 18.32 % a 15.42 %, lo que indica que el tiempo indicado para trabajar la reacción a la temperatura de 160 °C es de 60 min, porque el objetivo principal es obtener el mayor rendimiento de aceite fenólico posible. Hay que considerar el factor de la gran cantidad de rendimiento de lignina residual que se originó a 60 min, lo que indica que no hay una relación en que la lignina residual afecte el rendimiento del aceite fenólico.

Ahora se procede a analizar la figura 3.6 que corresponde a la gráfica de porcentaje de rendimiento de los subproductos de la fragmentación de la lignina a la segunda temperatura, la de 200 °C.

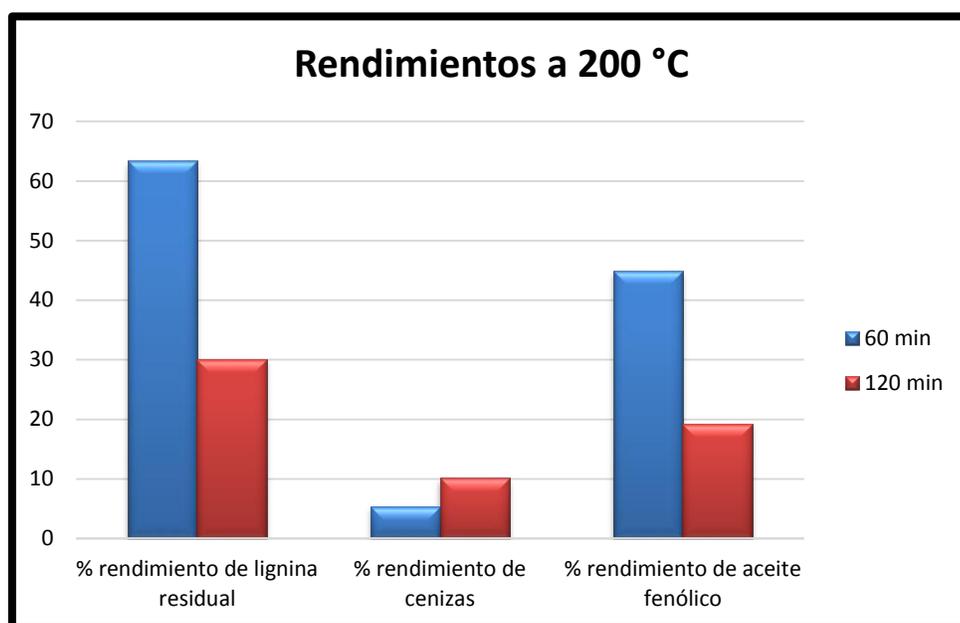


Figura 3.6 Porcentaje de rendimiento de los subproductos de la fragmentación de la lignina a 200 °C

Se aprecia que el rendimiento de la lignina residual a 60 min es considerablemente alto con respecto al de 120 min (63.31 % vs 30.06 %, respectivamente) lo que indica el mismo caso del rendimiento a 160 °C, que a mayor tiempo de reacción, disminuye la lignina residual y lo que interesa es que exista la menor cantidad de lignina residual posible por la razón que la lignina

debe fragmentarse totalmente y lo deseable es no tener lignina residual. Si se compara la lignina residual de ambas temperaturas (160 °C y 200 °C) se observa que el comportamiento es similar, mostrando una semejanza en los porcentajes de rendimiento a 60 min (63.8 % y 63.31 %) y en el caso del tiempo de 120 min, si hay una diferencia (16.95 % y 30.06 %) que indica que a mayor temperatura, mayor porcentaje de rendimiento de lignina residual al tiempo de 120 min. Sin embargo, el porcentaje de rendimiento significativo de lignina residual más alto fue en el tiempo de 60 min, por lo que se llega a la conclusión que la variable del tiempo es la que más influye en el porcentaje de rendimiento de la lignina residual.

Un modelo matemático se elaboró en el software Minitab para comprobar que en efecto el tiempo fue la variable que más influyó en el rendimiento de lignina residual, al incrementarse ésta en el tiempo de 120 min con respecto al tiempo de 60 min. El diagrama de Pareto con la influencia de los factores Temperatura, Tiempo y combinados, se muestra en la Figura 3.7.

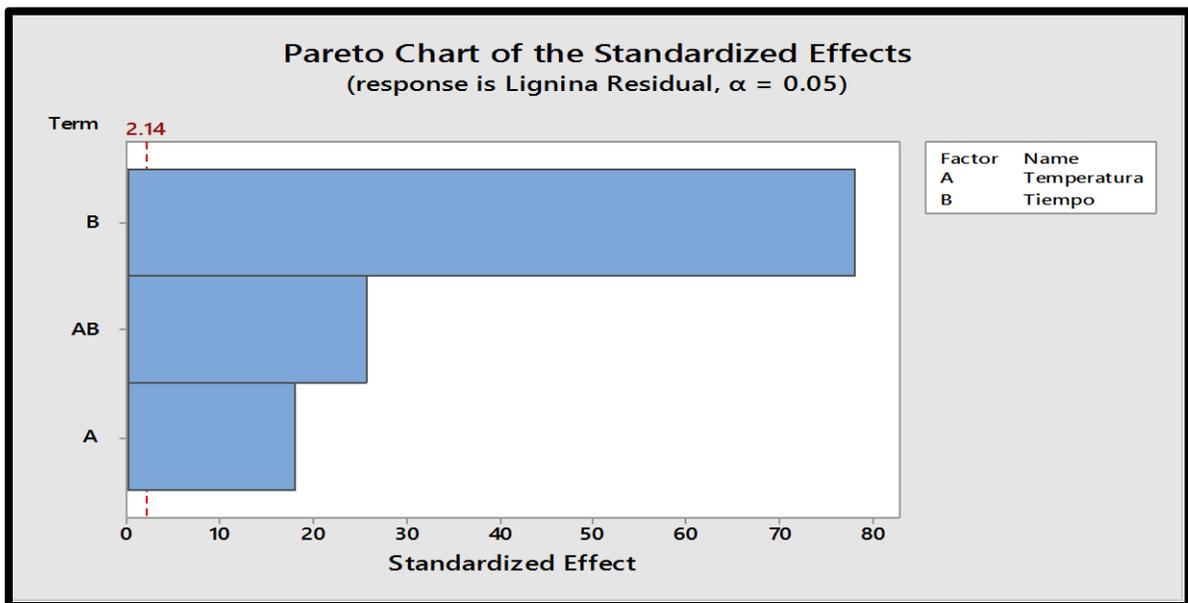


Figura 3.7 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de la temperatura y tiempo en la respuesta de lignina residual

Al analizar el diagrama de Pareto anterior, se comprueba que hay una clara influencia del tiempo sobre el porcentaje de rendimiento promedio de la lignina residual, al indicar la barra

del factor Tiempo como la más grande en comparación con las barras del factor Temperatura y los factores combinados. Este diagrama sirvió como modelo estadístico para comprobar los datos obtenidos del diseño de experimentos en la lignina residual.

Con respecto al porcentaje de rendimiento de las cenizas, se observa que es mayor a los 120 min, pero el valor de 10.06 % representa un rendimiento pequeño, por lo que se corrobora que se cumplió con el objetivo de obtener el menor porcentaje de rendimiento de cenizas posible debido a que es un subproducto no deseado. Al comparar el valor con el rendimiento a la primera temperatura de 160 °C, el cual fue de 11.06 %, se demuestra que la diferencia fue de 1 %, por lo que no hay influencia considerable de la temperatura en el rendimiento de las cenizas.

En la Figura 3.8, de igual manera que en el caso de la lignina residual, se presenta un modelo matemático con Diagrama de Pareto para comprobar estadísticamente que no predominaron ni la temperatura ni el tiempo en la variación del porcentaje promedio de rendimiento de cenizas.

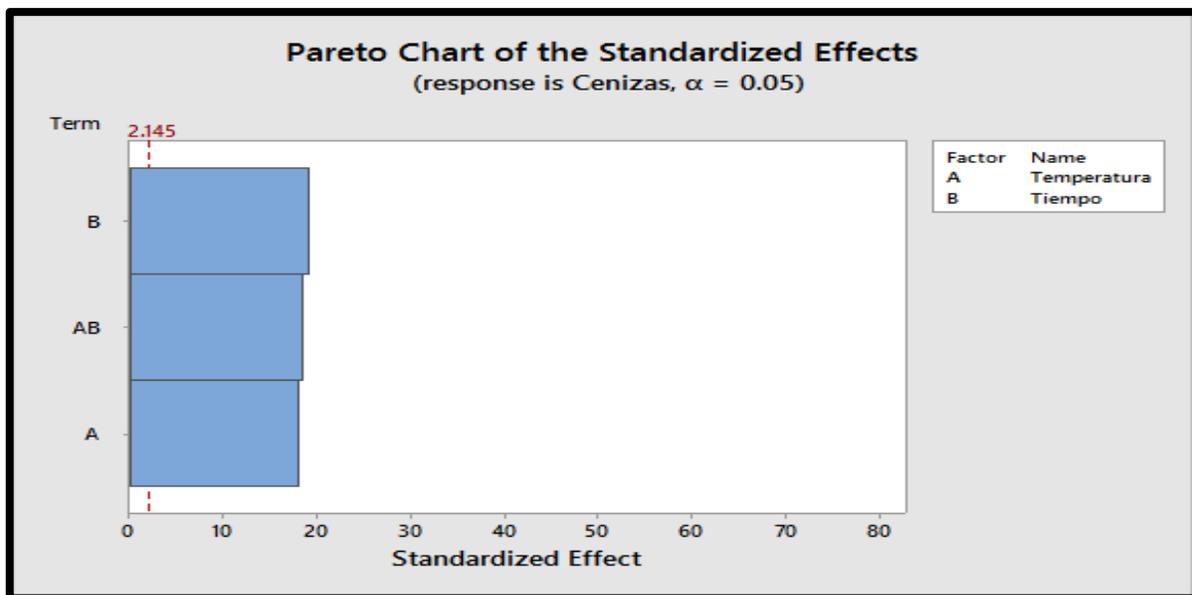


Figura 3.8 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de la temperatura y tiempo en la respuesta de cenizas

Las barras de los factores Temperatura, Tiempo y combinados se aprecian que son prácticamente semejantes, presentando una ligera ventaja la barra del factor Tiempo. Esto se debe a que el porcentaje de rendimiento de las cenizas fue ligeramente mayor en el tiempo de 120 min de las muestras a las tres temperaturas diferentes. Por lo que se corrobora que no hay una influencia significativa de ninguna de las variables.

Para el caso del porcentaje de rendimiento del aceite fenólico, se observa que a los 60 min el valor es de 44.85 %, mientras que al tiempo de 120 min, el valor es de 19.24 %. El valor a los 60 min representó una cantidad alta comparada con el valor a 160°C, por lo que fue un aumento muy considerable, y mientras mayor sea el valor, es mejor porque el principal producto de interés es el aceite fenólico; sin embargo, al aumentar el tiempo, el valor se redujo a la mitad, de 44.85 a 19.24 %.

Como la temperatura de la reacción de fragmentación de la lignina fue más alta, entonces al dejar por más tiempo la reacción a esa temperatura, el rendimiento del aceite fenólico resultó afectado. A mayor temperatura, se observó que hay un mayor porcentaje de rendimiento del aceite fenólico, pero se recomienda trabajar al menor tiempo para obtener el mejor rendimiento.

A continuación, en la Figura 3.9, se muestra la última gráfica de los porcentajes de rendimiento de los subproductos de la reacción de fragmentación de la lignina, a la temperatura más alta (225 °C).

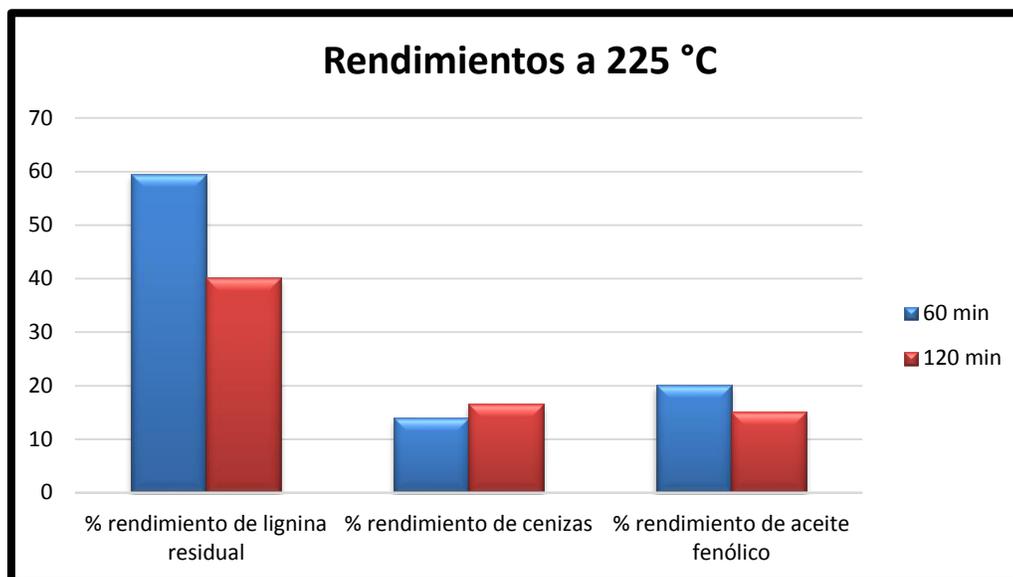


Figura 3.9 Porcentaje de rendimiento de los subproductos de la fragmentación de la lignina a 225 °C

El porcentaje de rendimiento de lignina residual tuvo el mismo comportamiento que en los dos casos anteriores: a mayor tiempo de reacción, menos lignina residual. El valor a 60 min fue muy similar con respecto a las otras temperaturas (59.46 %), aunque a 120 min disminuyó pero en menor cantidad con respecto a los otros dos casos (40.13 %).

El promedio de porcentaje de rendimiento de lignina residual en el rango de 59 - 63 % para las tres temperaturas y el tiempo de 60 min, significa que ese porcentaje de lignina residual no se alcanzó a fragmentar, por lo que el porcentaje restante de 37 - 41 % representa la lignina que sí se fragmentó (del total de los 15 gr iniciales para la reacción) y de esta lignina fragmentada se obtuvo el aceite fenólico. Lo mismo sucede con la lignina residual a las tres temperaturas y 120 min de tiempo, cuyos promedios de porcentaje de rendimiento fueron de 17, 30 y 40 %, y por ende los valores de porcentaje restantes (83, 70 y 60 %) corresponden a la lignina que sí se fragmentó tomando en cuenta los 15 gr iniciales, y de aquí se obtuvo el aceite fenólico, por lo

que a 120 min se fragmentó en mayor cantidad la lignina inicial con respecto al tiempo de 60 min.

El rendimiento de cenizas de los dos tiempos aumentó ligeramente con respecto a las dos temperaturas anteriores (13.97 % a 60 min y 16.62 % a 120 min) pero estos valores permanecen en un nivel recomendable de menor a 20 % para obtener la menor cantidad de este subproducto no deseado. Para el caso del rendimiento de aceite fenólico, se observa una pequeña diferencia entre los dos valores a 60 y 120 min, obteniendo mayor porcentaje de rendimiento a 60 min. Los valores a esta temperatura fueron muy similares a los obtenidos a la menor temperatura (160 °C). Sin embargo, en la temperatura de 200 °C se obtuvo prácticamente el doble de rendimiento en el tiempo más pequeño, por lo que se llega a la conclusión que para obtener un porcentaje de rendimiento considerable de aceite fenólico y un porcentaje aceptable de rendimiento de cenizas, se recomienda trabajar la reacción a 200°C y 60 min. El porcentaje de rendimiento de lignina residual fue similar a ese mismo tiempo en los tres casos de temperatura, pero lo que interesa es el aceite fenólico.

La gráfica de contorno, de acuerdo a lo reportado por Esquivel [38], funciona como una comprobación de la recomendación anteriormente mencionada. En la figura 3.10 se muestra la gráfica de contorno elaborada para representar la Temperatura vs Tiempo en los ejes X y Y, respectivamente.

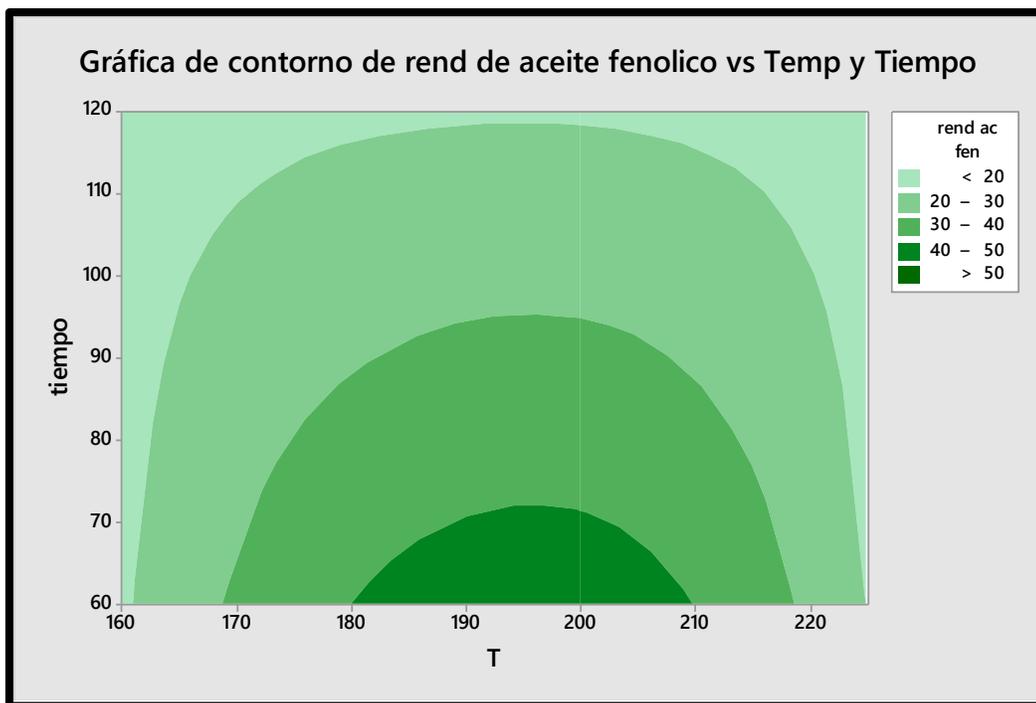


Figura 3.10 Predicción de rendimiento de aceite fenólico vs Temperatura y Tiempo mediante gráfica de contorno

En el interior de la gráfica, se indica el porcentaje de rendimiento de aceite fenólico, en la cual se observa que la zona de color verde con tonalidad más oscura corresponde a la mayor cantidad de porcentaje de rendimiento (40 – 50 %) y se ubica en el rango de temperatura de 180 a 210 °C y en el rango de tiempo de 60 a 70 min. El objetivo principal es realizar una predicción del comportamiento del rendimiento de aceite fenólico con respecto a los datos otorgados de las variables de temperatura y tiempo [38]. Por lo tanto, en esos rangos de temperatura y tiempo es donde mayor porcentaje de rendimiento de aceite fenólico se obtiene de acuerdo a la predicción, por lo que este resultado concuerda con la recomendación de trabajar a 200 °C y 60 min según la experimentación.

3.4 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

El objetivo de realizar una caracterización en el espectrómetro FTIR es la identificación de los grupos funcionales presentes en las muestras de aceite fenólico después de la reacción de la fragmentación, así como en la muestra obtenida después de la reacción de pulpeo alcalino a partir de los residuos del café (*Coffea arabica*) y así poder comprobar la presencia de lignina en la muestra. Sobre los espectros FTIR correspondientes a las muestras de aceite fenólico, se mostrarán uno por muestra, para dar un total de 6 espectros, ya que el diseño de experimentos corresponde a 3 temperaturas y 2 tiempos, dando un total de 6 experimentos; únicamente se realizaron por triplicado para comparar resultados entre sí y corroborar que los experimentos se llevaron a cabo de manera adecuada. Se eligió de cada muestra el espectro FTIR más definido y representativo y son los que se mostrarán a continuación junto con espectro FTIR correspondiente a la muestra de lignina.

La figura 3.11 corresponde a la muestra de lignina directamente obtenida de la reacción de pulpeo alcalino. Entre 3200 y 3400 cm^{-1} , se observa una vibración ancha causada por la presencia del grupo $-\text{OH}$ fenólico. Este grupo corresponde a las moléculas fenólicas presentes en la lignina.

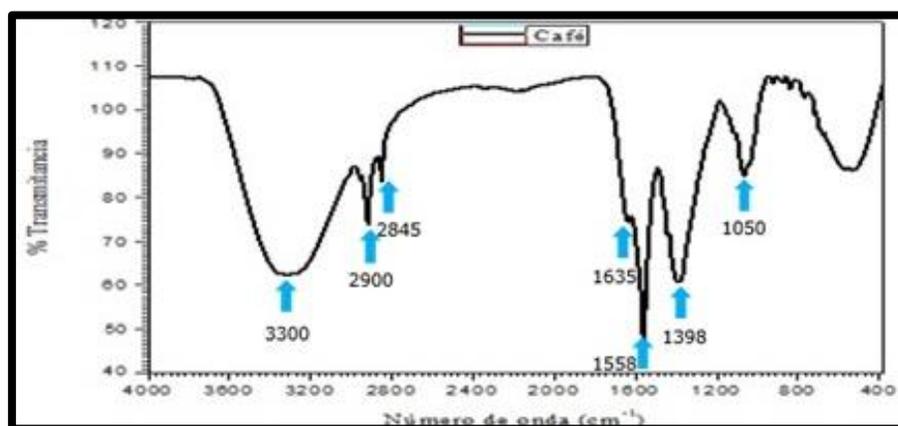


Figura 3.11 Espectro FTIR de una muestra de lignina obtenida a partir de residuos del café (*Coffea arabica*)

El pico de 2900 cm^{-1} indica estiramiento del enlace C-H en grupos metilo, mientras que el pico de 2845 cm^{-1} indica estiramiento del enlace C-H en grupos metilenos. La señal de 1635 cm^{-1} se asocia a una vibración C=O (del anillo aromático). El pico de 1558 cm^{-1} es una vibración típica de C=C con esqueleto fenilpropano presentes en la lignina. El pico de 1398 cm^{-1} es señal de un enlace C-H de un compuesto con radical siringilo, el cual es un compuesto fenólico y monómero precursor de la lignina. En 1050 cm^{-1} se observa una vibración que fue causada por la deformación del enlace C-H del compuesto con radical guayacilo, un compuesto fenólico y monómero precursor de la lignina.

Para los espectros FTIR de las muestras de aceite fenólico, todos los espectros obtuvieron un resultado similar (puesto que son los mismos grupos funcionales porque todas las muestras representativas por muestra por variable de temperatura y variable de tiempo).

La figura 3.12 representa el espectro FTIR de la muestra de aceite fenólico a 160°C y 120 min.

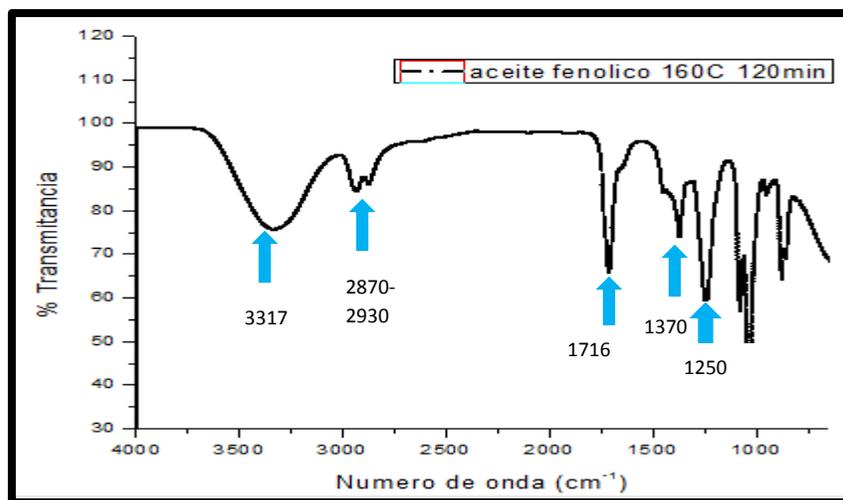


Figura 3.12 Espectro FTIR de una muestra de aceite fenólico a 160°C y 120 min

Se observa a 3317 cm^{-1} la banda característica del grupo $-\text{OH}$ presente en los compuestos de origen fenólico; los dos picos que se encuentran entre 2870 y 2930 cm^{-1} representan estiramientos del enlace C-H en grupos metilo y metilenos.

El pico de 1716 cm^{-1} indica la presencia de enlace $\text{C}=\text{O}$, el cual representa un estiramiento de este enlace en aromáticos o el enlace conjugado. Los picos a 1370 cm^{-1} y 1250 cm^{-1} son referentes a un enlace $\text{C}-\text{O}$, el cual es representativo de ésteres, éteres o ácidos carboxílicos.

La figura 3.13 representa el espectro FTIR de la muestra de aceite fenólico a 160°C y 60 min.

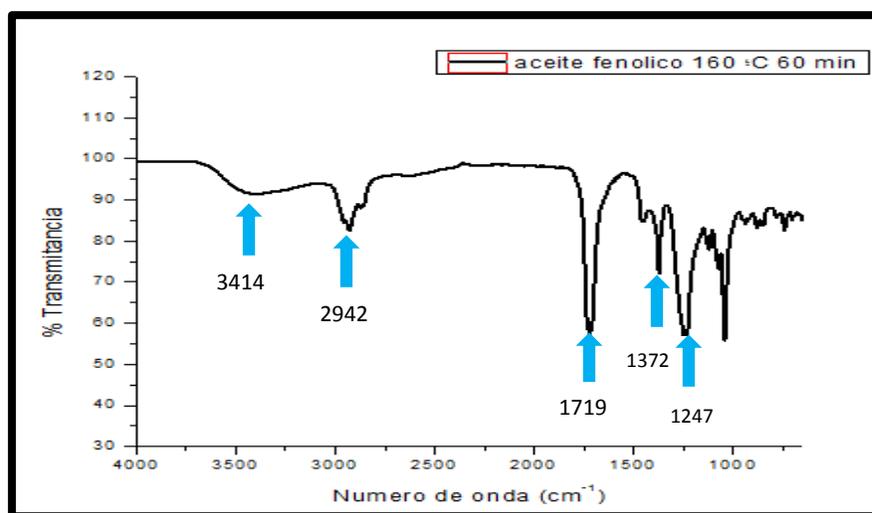


Figura 3.13 Espectro FTIR de una muestra de aceite fenólico a 160°C y 60 min

La banda ubicada a aproximadamente 3414 cm^{-1} es el referente al grupo $-\text{OH}$ presente en los compuestos de origen fenólico. En este caso, se observa que está menos ancho con respecto al espectro anterior; esto es debido a que no se realizó de manera adecuada el barrido de esta muestra en el equipo FTIR, sin embargo aun así se alcanza a apreciar esa banda característica de este tipo de muestra. El pico a 2942 cm^{-1} indica el estiramiento del enlace $\text{C}-\text{H}$ en grupos metilo y metilenos. A 1719 cm^{-1} , se observa un pico relacionado con el estiramiento del enlace $\text{C}=\text{O}$ de anillo aromático. Los picos a 1372 cm^{-1} y 1247 cm^{-1} hacen referencia a absorción CH_3 y a un enlace $\text{C}-\text{O}$ representativo de ésteres, éteres o ácidos carboxílicos, respectivamente.

La figura 3.14 representa el espectro FTIR de la muestra de aceite fenólico a 200°C y 120 min.

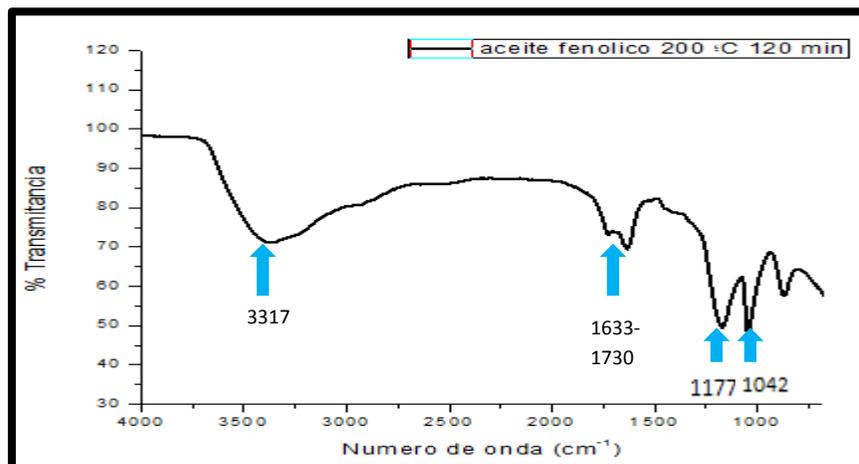


Figura 3.14 Espectro FTIR de una muestra de aceite fenólico a 200 °C y 120 min

A 3317 cm^{-1} se aprecia la banda representativa del grupo -OH , indicando la presencia de compuestos de origen fenólico en la muestra. En el rango de $1633\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$ se muestran dos pequeños picos, los cuales son referentes al estiramiento de alquenos $\text{C}=\text{C}$. El pico que se ubica a 1177 cm^{-1} , indica la presencia de estiramiento del enlace C-O característico de ésteres, éteres o ácidos carboxílicos. El pico a 1042 cm^{-1} corresponde también a un estiramiento del enlace C-O .

En la figura 3.15 se muestra el espectro FTIR de la muestra de aceite fenólico a 200 °C y 60 min.

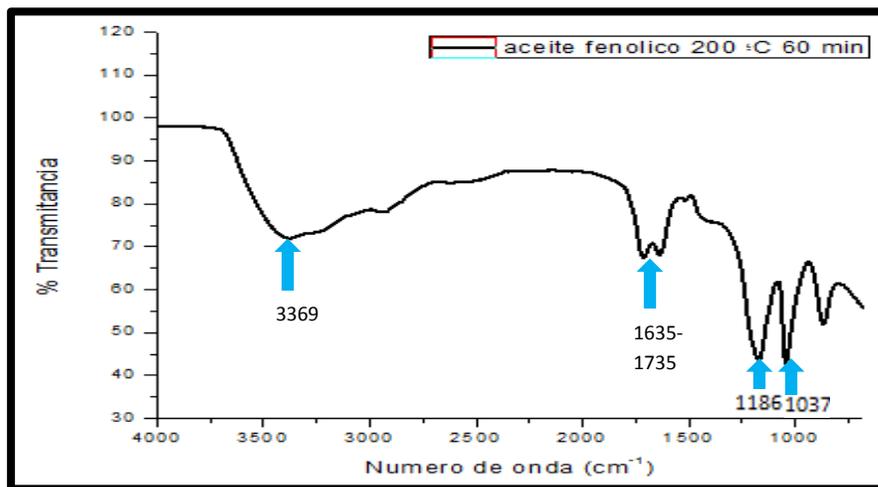


Figura 3.15 Espectro FTIR de una muestra de aceite fenólico a 200 °C y 60 min

Como se puede apreciar comparando el espectro de la figura 3.15 con el espectro anterior de la figura 3.14, ambos son muy similares, notando una pequeña variación en la forma de las bandas ubicadas entre 1630-1730 cm^{-1} . Entonces, la banda a 3369 cm^{-1} es representativa del grupo $-\text{OH}$, indicando la presencia de compuestos de origen fenólico en la muestra. En el rango de 1635-1735 cm^{-1} se muestran dos pequeños picos, los cuales son referentes al estiramiento de alquenos $\text{C}=\text{C}$. El pico que se ubica a 1186 cm^{-1} , indica la presencia de estiramiento del enlace $\text{C}-\text{O}$ característico de ésteres, éteres o ácidos carboxílicos. El pico a 1037 cm^{-1} corresponde también a un estiramiento del enlace $\text{C}-\text{O}$.

La figura 3.16 muestra el espectro FTIR de la muestra de aceite fenólico a 225 °C y 120 min.

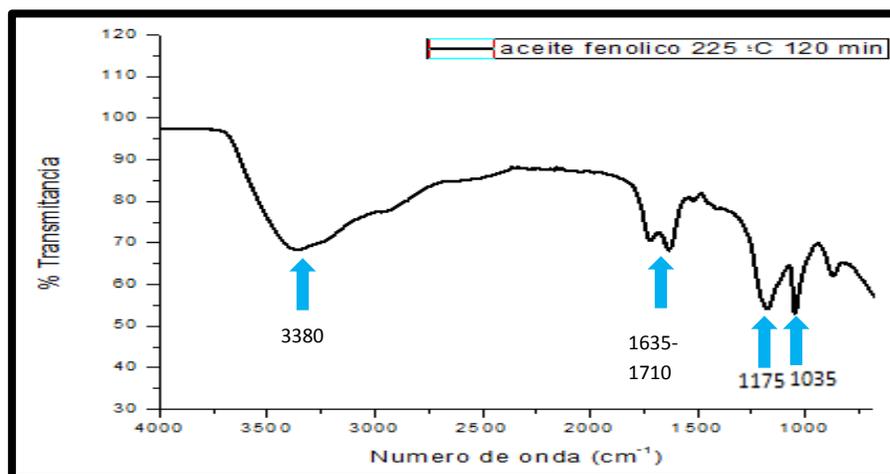


Figura 3.16 Espectro FTIR de una muestra de aceite fenólico a 225 °C y 120 min

La banda ancha a una longitud de onda de 3380 cm^{-1} representa al grupo funcional -OH , que indica la presencia de compuestos de origen fenólico. En el rango de longitud de onda de 1635 a 1710 cm^{-1} , se aprecian dos picos pequeños consecutivos, los cuales denotan que está presente el estiramiento de alquenos C=C . Los picos a 1175 cm^{-1} y 1035 cm^{-1} corresponden al estiramiento del enlace C-O presente en ésteres, éteres o ácidos carboxílicos.

Para finalizar, se muestra en la Figura 3.17 el último espectro FTIR, el cual es el de la muestra de aceite fenólico a 225 °C y 60 min.

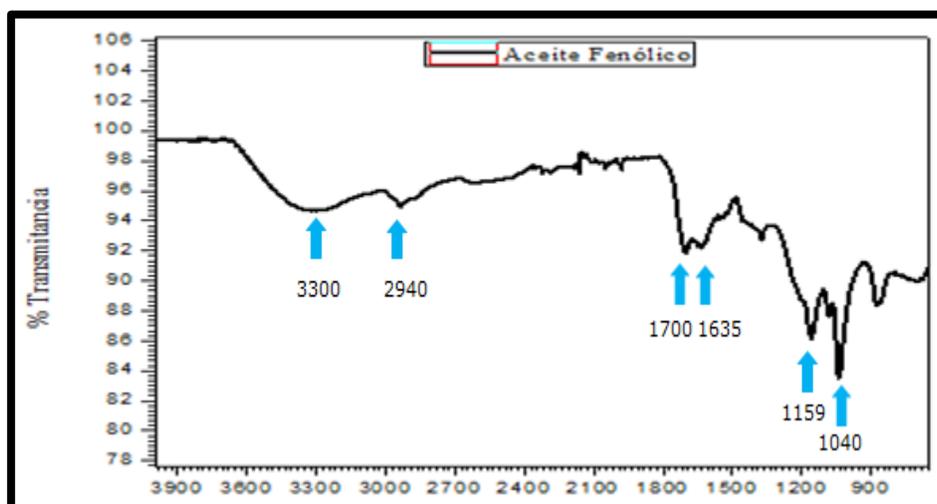


Figura 3.17 Espectro FTIR de una muestra de aceite fenólico a 225 °C y 60 min

En el espectro se aprecia la banda ancha característica del enlace -OH de fenólicos a una longitud de onda de 3300 cm^{-1} . A 2940 cm^{-1} se aprecia un pico pequeño indicativo de un estiramiento del enlace C-H en grupos CH_3 . En los dos picos semejantes que se ubican a 1635 y 1700 cm^{-1} , se aprecia un estiramiento C=C de alquenos. Finalmente, a 1040 y 1150 cm^{-1} , se observan unas bandas que son debido a un estiramiento de enlace C-O .

Al hacer el análisis de todos los espectros FTIR de la lignina y de las muestras de aceite fenólico, se encontraron grupos funcionales semejantes en todos, logrando concluir que efectivamente sí se obtuvo lignina después de la reacción de su obtención, y que efectivamente sí se obtuvieron derivados o fragmentos de la lignina en las muestras de aceite fenólico al concluir la reacción de fragmentación y la posterior separación y purificación.

3.5 Cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS)

En cuanto a la caracterización por Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas, se llevó a cabo la curva de calibración de los compuestos fenólicos comerciales, ya que estos compuestos son los blancos o estándares para comprobar su presencia en las futuras caracterizaciones de las muestras de aceite fenólico de acuerdo a los tiempos de retención. Para las curvas de calibración de cada compuesto fenólico comercial o estándar, se preparó una solución de estos compuestos con acetato de etilo como solvente, a una concentración de 1000 ppm. Posteriormente, de esta solución se hicieron diluciones para obtener muestras a 20, 30, 50, 100 y 120 ppm.

En la figura 3.18 se observa el cromatograma de una solución a 100 ppm de los 6 compuestos fenólicos comerciales que son: fenol, m-cresol, guayacol, catecol, 4-metilcatecol y siringol.

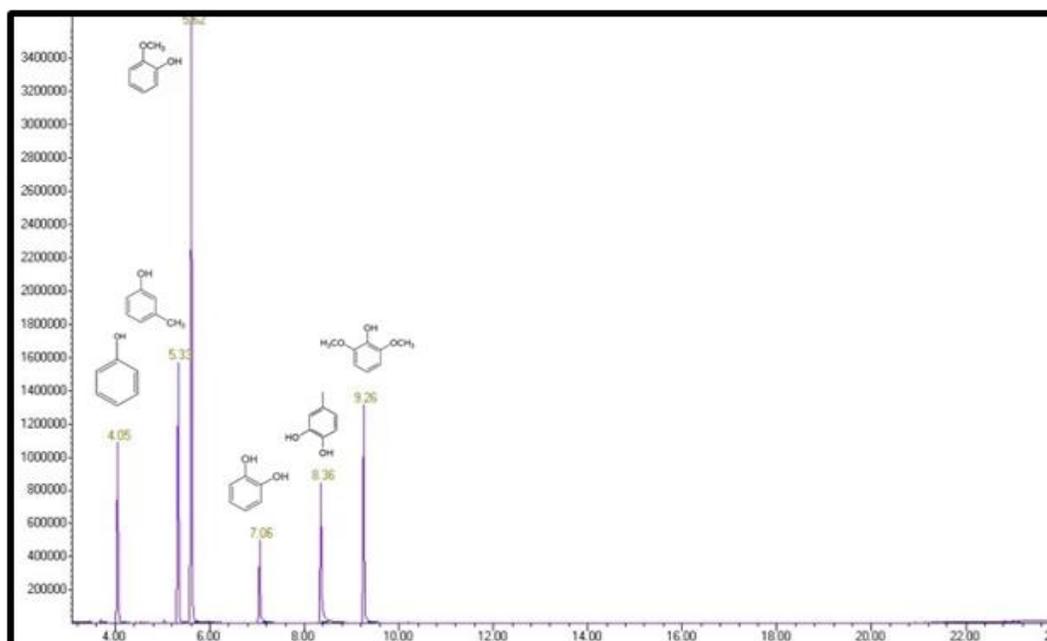


Figura 3.18 Cromatograma de los compuestos fenólicos comerciales en solución de acetato de etilo a 100 ppm

El pico de 4.05 min es el fenol, a los 5.33 min es m-cresol. El guayacol aparece en el pico más alto, a los 5.62 min. El pico de 7.06 es catecol, a un tiempo de 8.36 min aparece el 4-metilcatecol y finalmente el pico de 9.26 min es el siringol.

Cabe recalcar que a través del mismo software del GC-MS se realizaron las curvas de calibración, ya que el software tiene esa opción. Sólo se necesitó establecer en el sistema las 4 masas más altas de cada compuesto fenólico, y a través de los datos de respuesta (abundancia) que se obtuvieron de cada cromatograma de cada muestra a diferente concentración, se hicieron las siguientes gráficas.

Los datos de respuesta (abundancia) se indican en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11 Respuesta (Abundancia) de las muestras de compuestos fenólicos estándar a diferentes concentraciones.

Concentración de la muestra (ppm)	Respuesta (Abundancia)					
	Fenol	m-cresol	Guayacol	Catecol	4-metilcatecol	Siringol
20	140225	126848	449174	16017	5030	65101
30	253675	236026	764600	60218	67084	147378
50	396156	366401	1135808	162015	173701	255734
100	732481	674760	1886218	375129	430241	504289
120	819955	753208	2065703	496066	540231	560734

Las curvas de calibración de cada compuesto fenólico estándar a diferentes concentraciones se muestran a continuación.

La figura 3.19 corresponde a la curva de calibración del compuesto comercial del Fenol a las concentraciones de 20, 30, 50, 100 y 120 ppm. Se observa una tendencia lineal, con una $R^2 = 0.992$, muy cercana a 1.

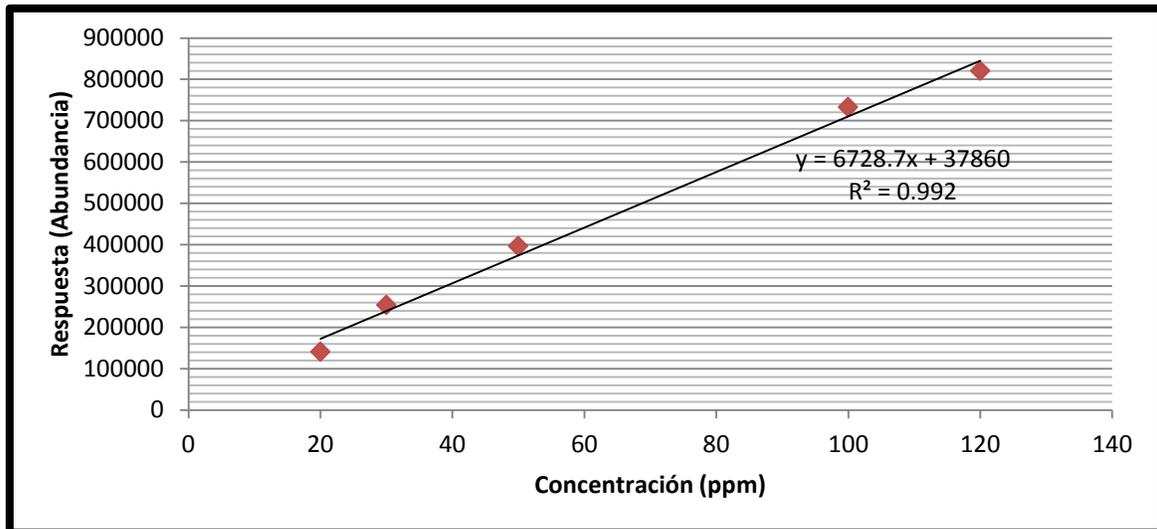


Figura 3.19 Curva de calibración del Fenol estándar a 5 concentraciones

La figura 3.20 presenta la curva de calibración del compuesto comercial de m-cresol, a las mismas concentraciones. La tendencia es lineal, con una $R^2 = 0.9907$, la cual es cercana a 1.

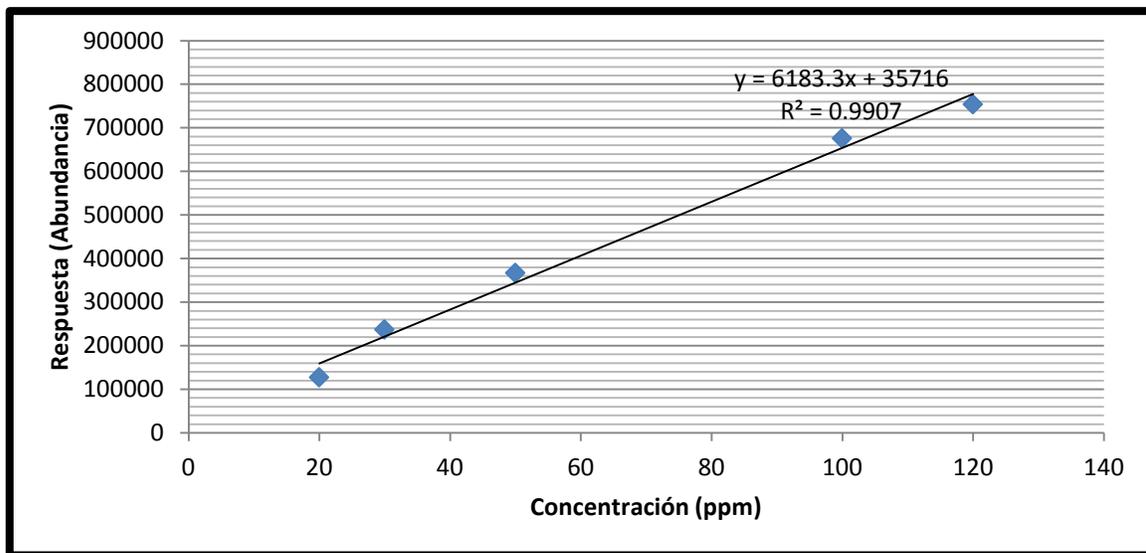


Figura 3.20 Curva de calibración del m-cresol estándar a 5 concentraciones

La figura 3.21 muestra la curva de calibración del compuesto comercial de siringol, a las mismas concentraciones anteriores. La tendencia es lineal, con una $R^2 = 0.99$, la cual es cercana a 1 y demuestra su eficiencia para cuantificar los compuestos fenólicos.

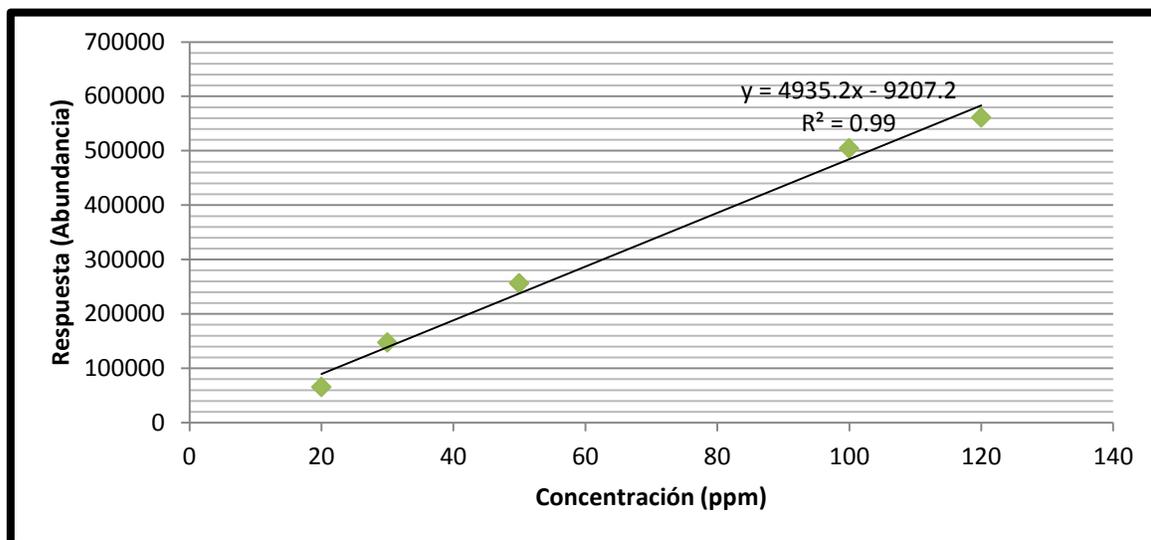


Figura 3.21 Curva de calibración del siringol estándar a 5 concentraciones

La figura 3.22 pertenece a la curva de calibración del compuesto estándar del guayacol, a las concentraciones de 20, 30, 50, 100 y 120 ppm. La $R^2 = 0.9826$ es un poco menor en comparación con las anteriores, pero se sigue considerando la gráfica con buena linealidad.

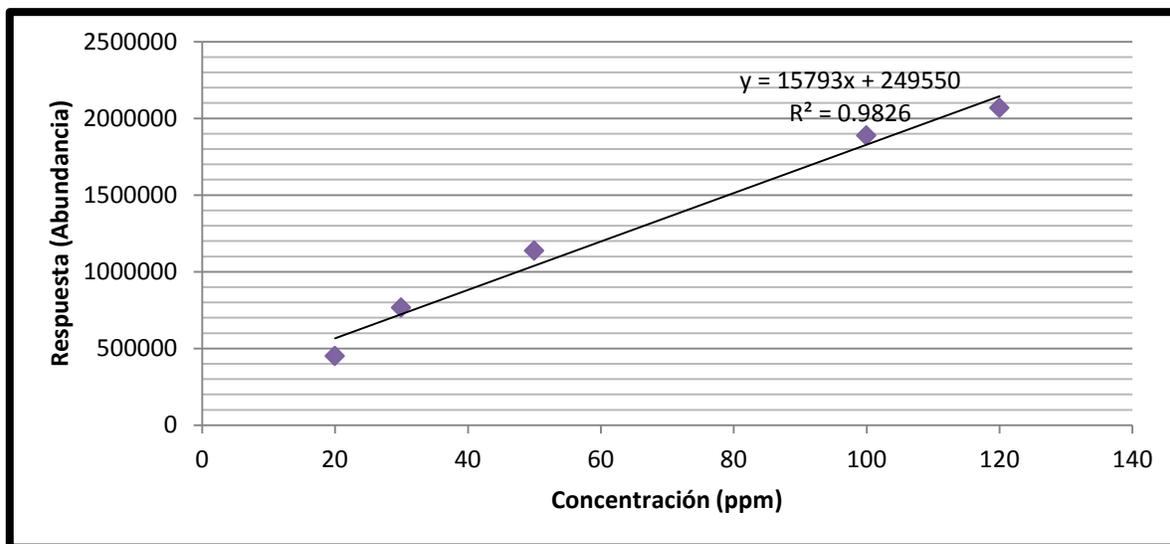


Figura 3.22 Curva de calibración del guayacol estándar a 5 concentraciones

La figura 3.23 es la curva de calibración del catecol estándar a las mismas concentraciones de las gráficas anteriores, y presenta una excelente linealidad ($R^2 = 0.9976$).

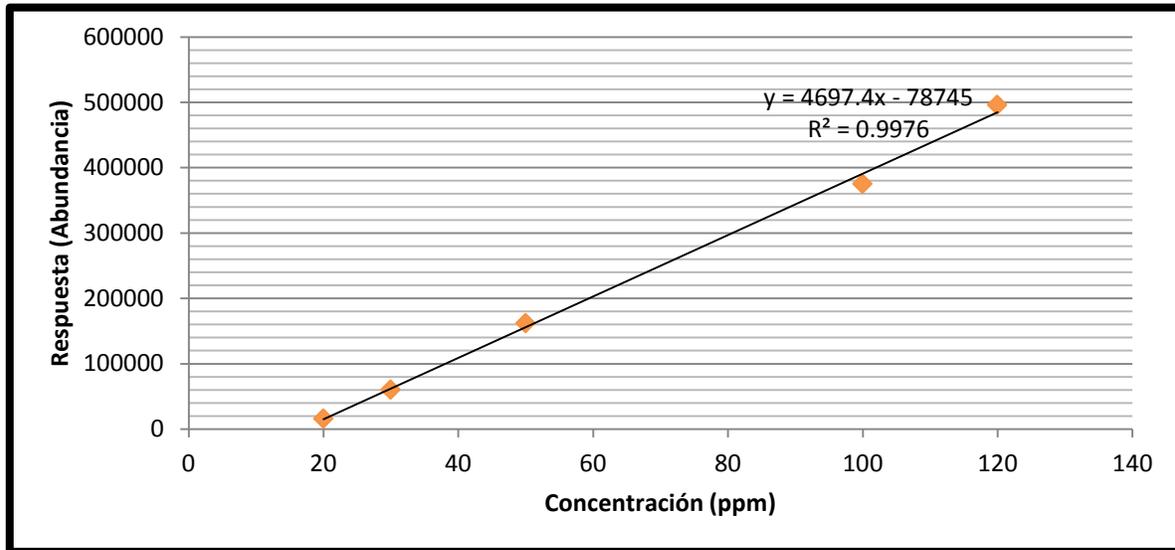


Figura 3.23 Curva de calibración del catecol estándar a 5 concentraciones

La figura 3.24 corresponde a la curva de calibración del compuesto fenólico estándar denominado 4-metilcatecol, y presenta una tendencia lineal ($R^2 = 0.9996$).

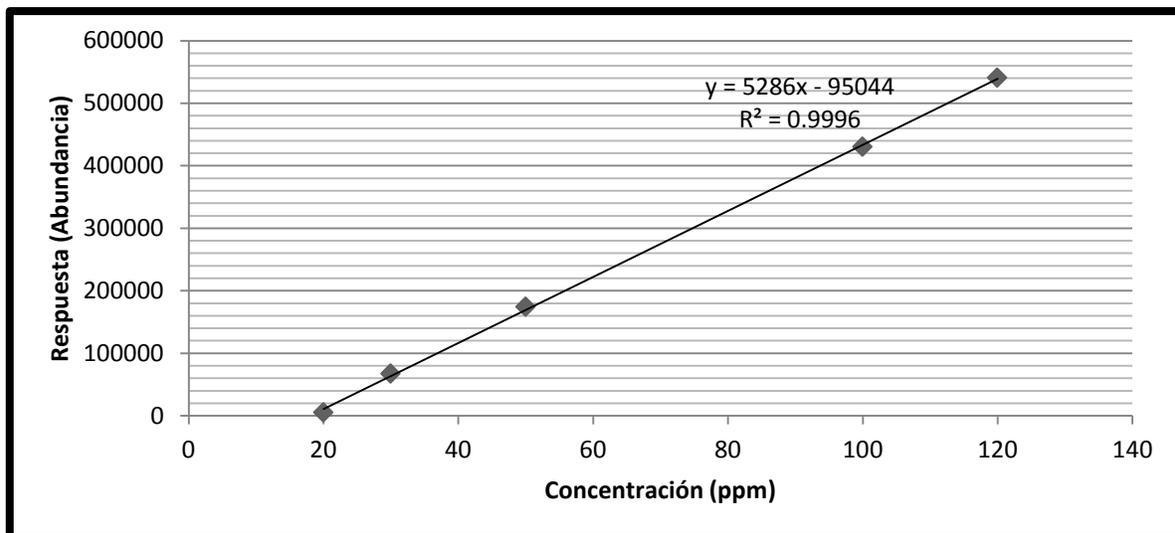


Figura 3.24 Curva de calibración del 4-metilcatecol estándar a 5 concentraciones

3.5.1 Identificación de compuestos fenólicos

Una vez llevada a cabo la curva de calibración, se procedieron a analizar las muestras de aceite fenólico en el equipo con el método explicado en el punto 2.4.2 de la parte de metodología.

Para el caso de los cromatogramas correspondientes a las muestras de aceite fenólico, se aplicó la misma instrucción que para el caso de los espectros FTIR; se mostrarán uno por muestra, para dar un total de 6 cromatogramas, ya que el diseño de experimentos corresponde a 3 temperaturas y 2 tiempos, dando un total de 6 experimentos; únicamente se realizaron por triplicado para comparar resultados entre sí y corroborar que los experimentos se llevaron a cabo de manera adecuada. Para cada muestra, se eligió el cromatograma del cual se identificaron más compuestos fenólicos de interés y del cual se cuantificaron en mayor cantidad estos compuestos.

Como se podrá apreciar en todos los cromatogramas, todas las muestras de aceite fenólico contienen una mezcla de diferentes compuestos, resultando en la aparición de una gran cantidad de picos a diferentes tiempos de retención. Gracias al espectrómetro de masas se logró identificar a los compuestos fenólicos de interés, y una vez identificados junto con su tiempo de retención, se procedió a realizar un zoom a cada pico correspondiente a cada compuesto fenólico de interés. Así mismo, se mostrarán los espectros de masas de cada uno de ellos mediante una comparación con los espectros de masas de la base de datos del equipo y la identificación que realizó el espectro de masas con el nombre del compuesto fenólico con un porcentaje de veracidad de mayor a 90 % para que en efecto el resultado sea confiable. Lo anterior se realizó con la finalidad de demostrar que en efecto se obtuvieron los compuestos fenólicos de interés y se lograron identificar.

A continuación, en la Figura 3.25 se presenta el cromatograma de la muestra de aceite fenólico a 160°C y 120 min. En la muestra a 160°C y 120 min, se encontró la presencia de fenol y siringol, en los picos de tiempo de retención de 8.563 y 18.974 min, respectivamente.

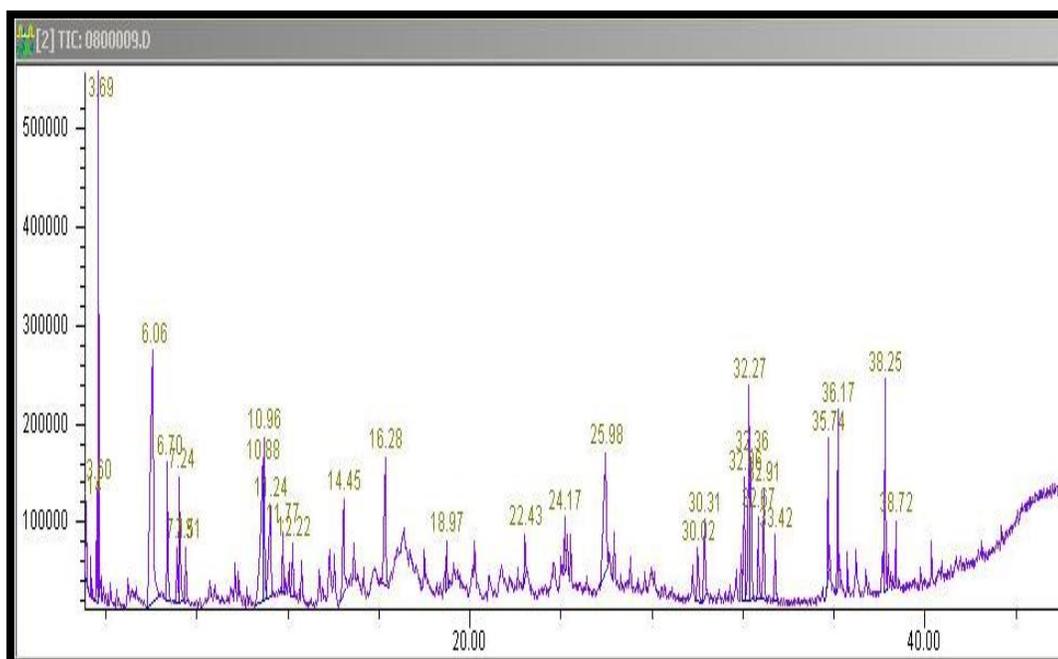


Figura 3.25 Cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 120 min

En la figura 3.26 se hizo un zoom en los tiempos de retención pertenecientes a estos compuestos, y se señaló el pico a 8.563 min, correspondiente al Fenol.

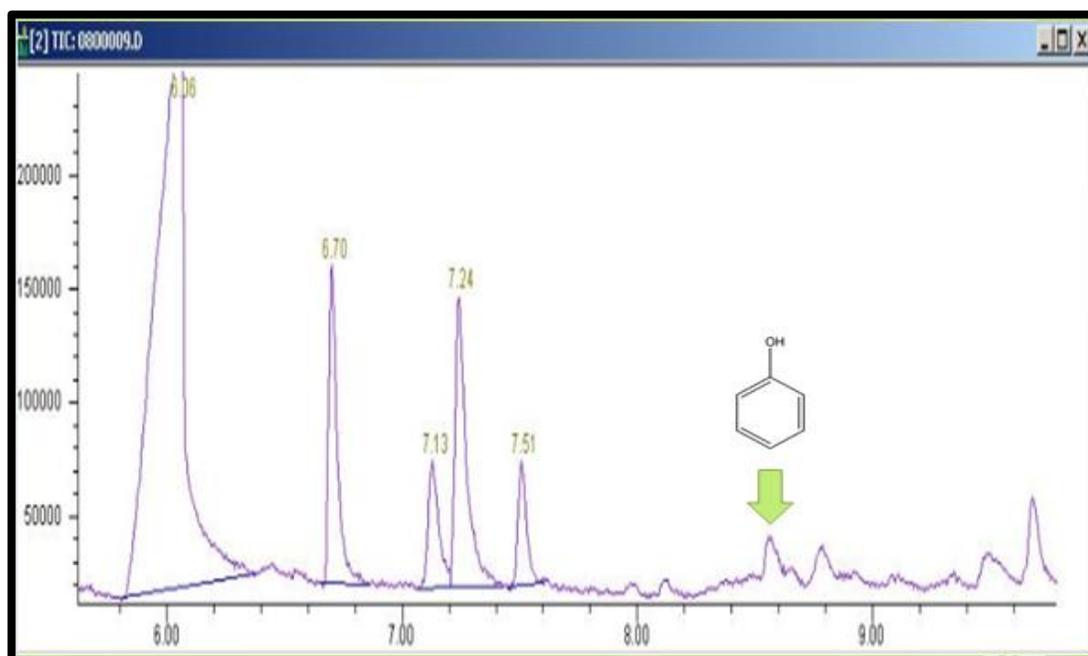


Figura 3.26 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 120 min, en pico de Fenol a 8.563 min

En la figura 3.27 se muestra la comparación del espectro de masas de la muestra y el espectro de masas de la base de datos del equipo, donde se comprueba que a ese tiempo de retención se encontró el fenol.

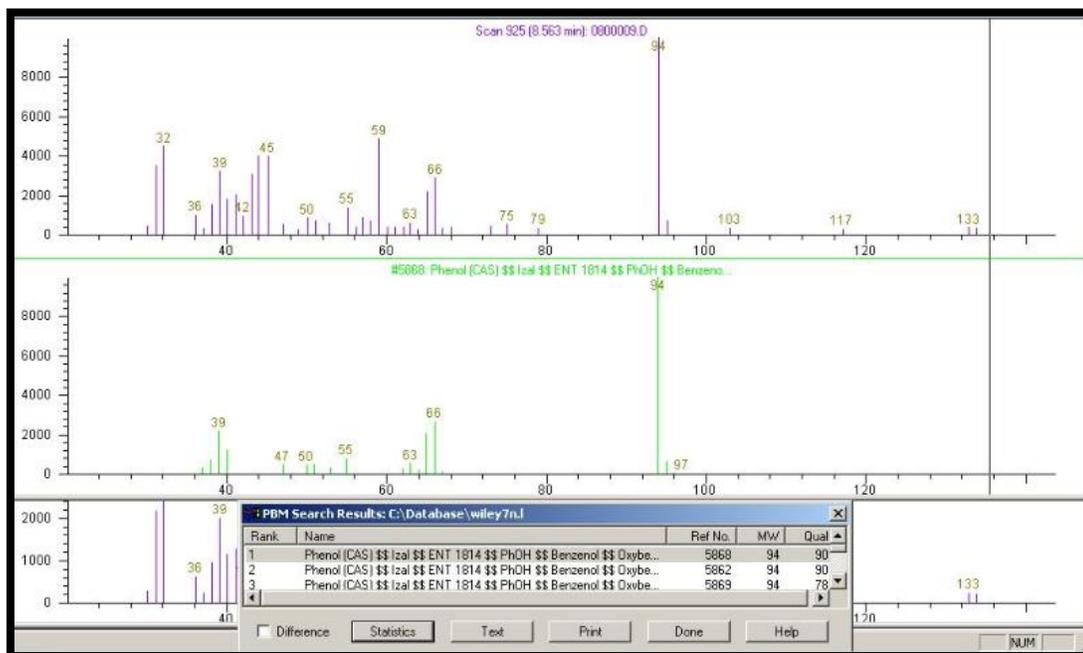


Figura 3.27 Comparación entre los espectros de masas de fenol y del pico a 8.563 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 120 min

En la figura 3.28 del cromatograma ampliado, se observa un pico mediano a 18.974 min, el cual corresponde al siringol.

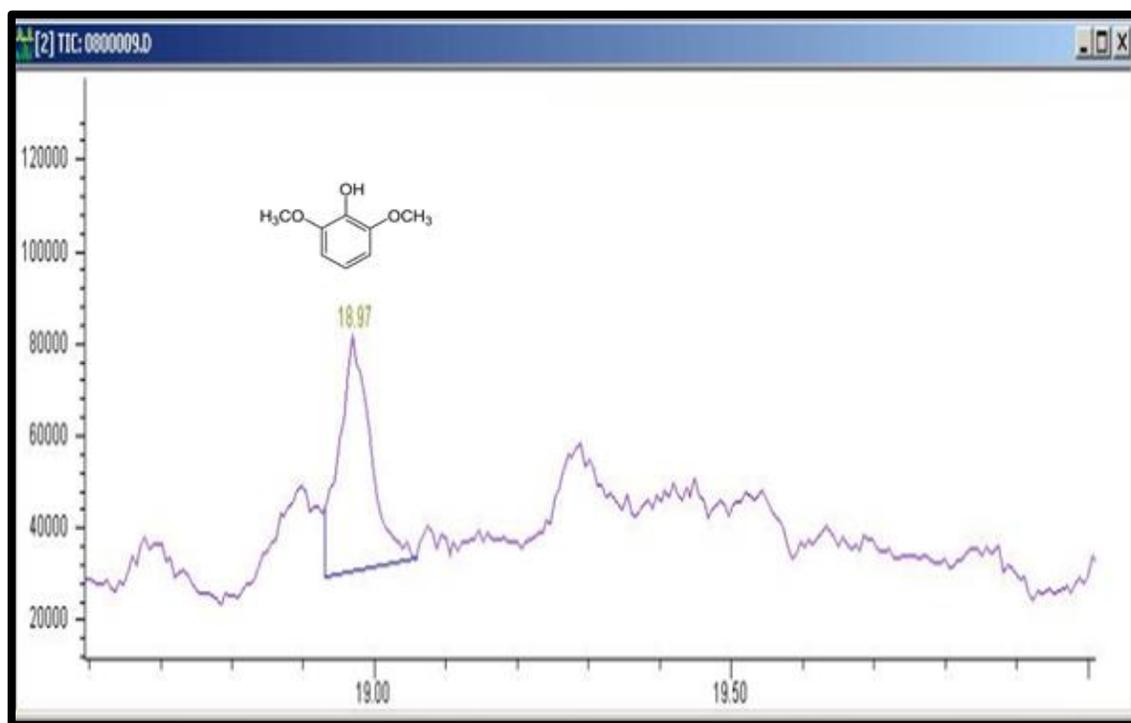


Figura 3.28 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 120 min, en pico de Siringol a 18.974 min

La comparación del espectro de masas de la muestra y el espectro de masas de la base de datos del equipo donde se comprueba que a ese tiempo de retención se encontró el siringol, se indica en la figura 3.29.

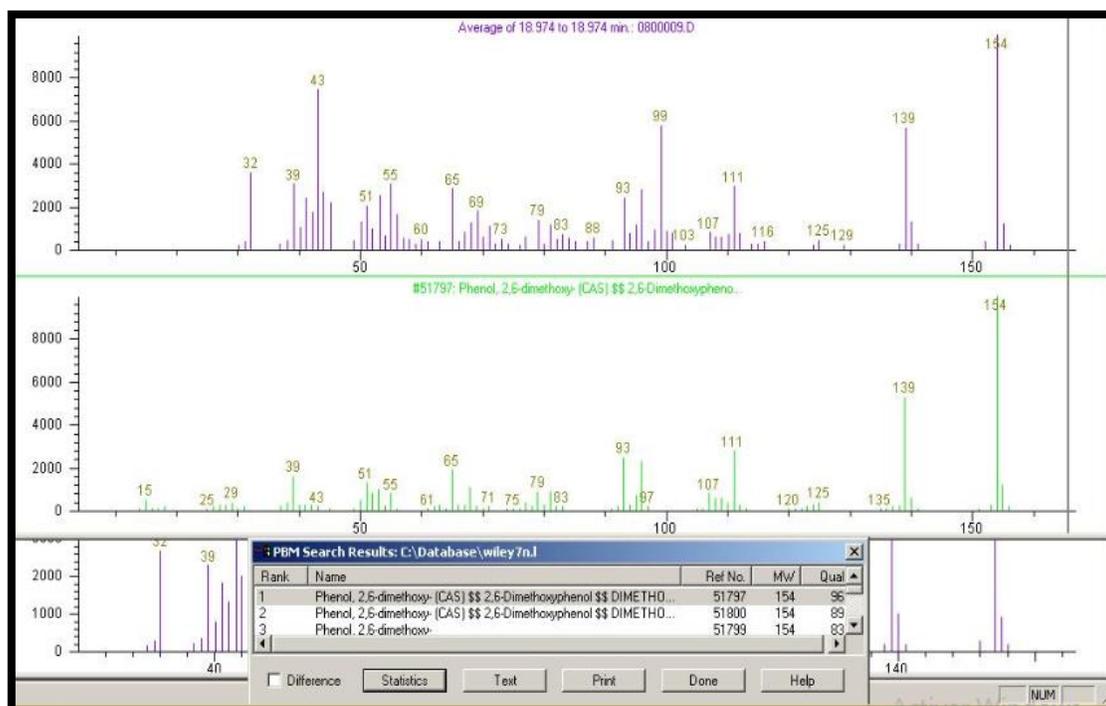


Figura 3.29 Comparación entre los espectros de masas de siringol y del pico a 18.974 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 120 min

El porcentaje de veracidad de la identificación del fenol y siringol en la muestra a 160 °C y 120 min, fue de 90 y 96 % respectivamente, de acuerdo a la información proporcionada por el espectrómetro de masas.

Como dato adicional, en el análisis de identificación de los compuestos químicos obtenidos en la muestra, se observó en el espectro de masas la presencia de vainillina en un tiempo de retención de 20.214 min, el cual es el precursor de la vainilla artificial. En la literatura se ha reportado que a partir de la lignina se puede obtener la vainillina, cuya estructura también es

de origen fenólico, pero con más sustituyentes que los compuestos fenólicos de interés y por ende, es de mayor tamaño [39].

A continuación se presenta en la figura 3.30 el cromatograma indicando la presencia de vainillina.

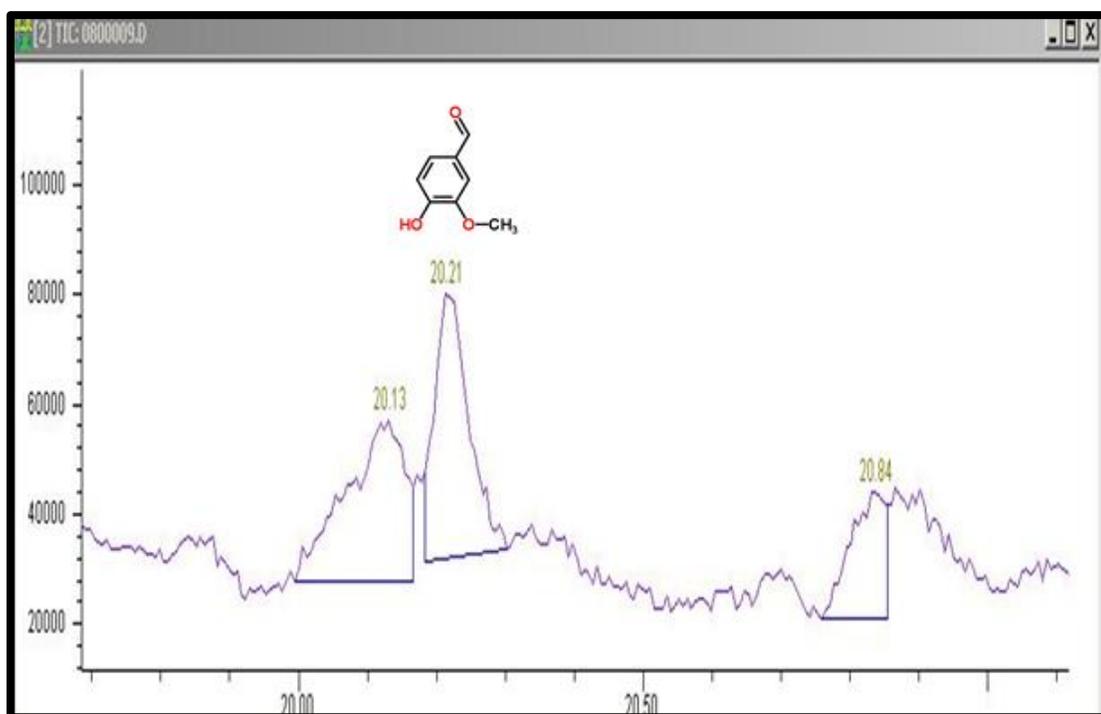


Figura 3.30 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 120 min, en pico de Vainillina a 20.214 min

El espectro de masas de la muestra y el espectro de masas de la base de datos del equipo donde se comprueba la presencia de vainillina, se muestra en la figura 3.31.

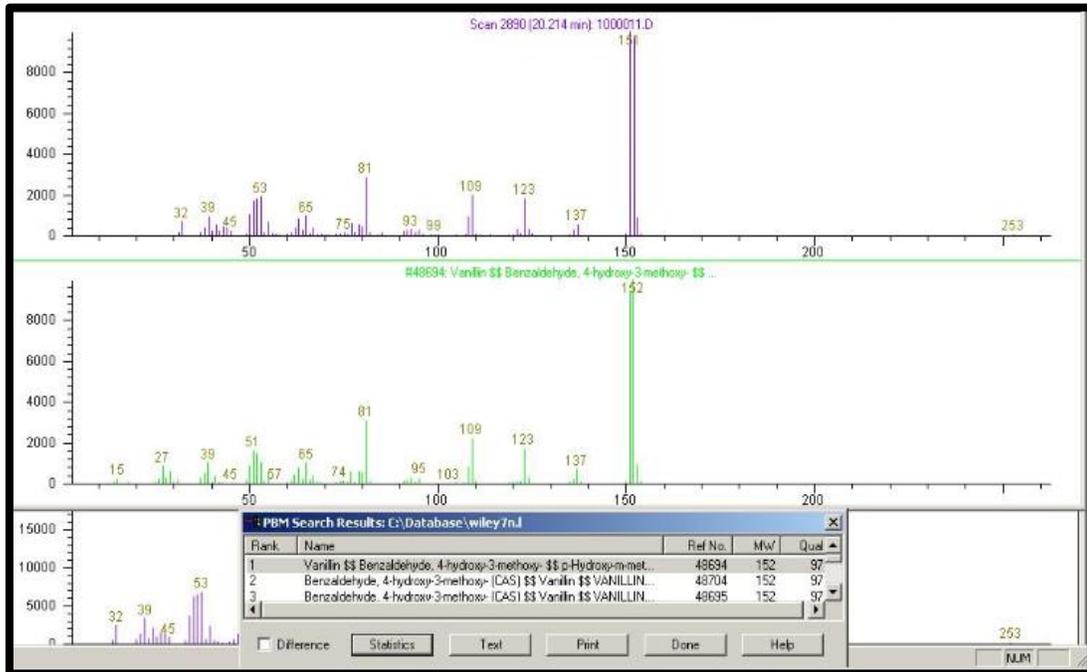


Figura 3.31 Comparación entre los espectros de masas de Vainillina y del pico a 20.214 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 120 min

En la figura 3.32 se presenta el cromatograma obtenido de la muestra de aceite fenólico a 160 °C y 60 min.

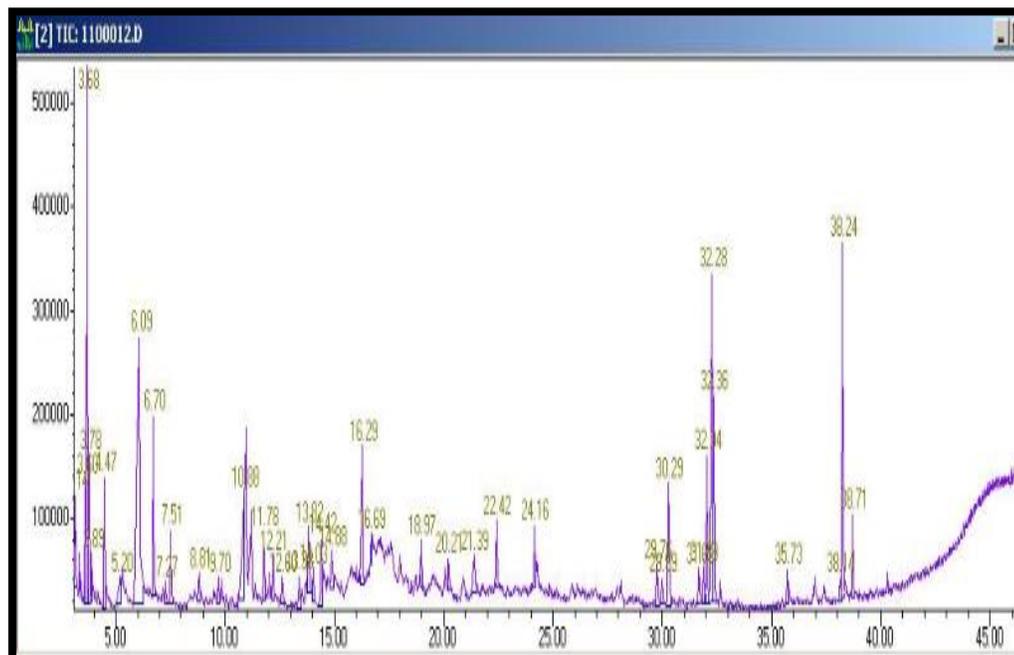


Figura 3.32 Cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 60 min

En la muestra a 160°C y 60 min, se encontró la presencia de catecol, en el pico de tiempo de retención de 14.88 min. Se hizo un zoom en el tiempo de retención perteneciente a este compuesto, y el cromatograma amplificado se muestra a continuación en la figura 3.33.

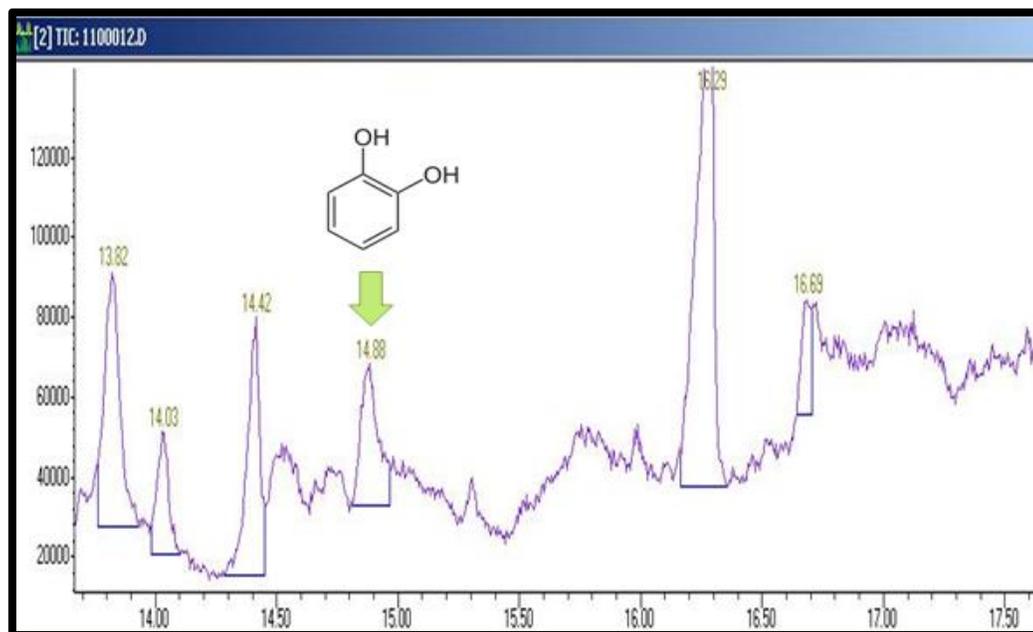


Figura 3.33 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 60 min, en pico de Catecol a 14.88 min.

En la figura 3.34, se indica el espectro de masas de la muestra y de la base de datos del sistema para demostrar la identificación del compuesto Catecol en la muestra a 160 °C y 60 min.

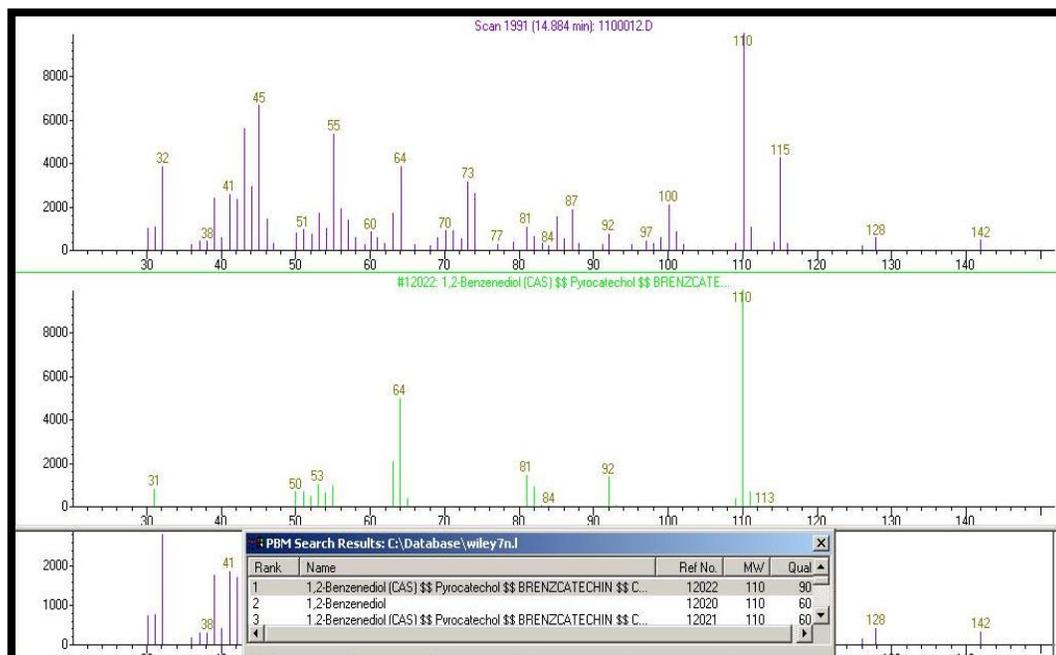


Figura 3.34 Comparación entre los espectros de masas de Catecol y del pico a 14.88 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 60 min.

El porcentaje de veracidad de la identificación del catecol en la muestra a 160 °C y 60 min, fue de 90 %, de acuerdo a la información proporcionada por el espectrómetro de masas.

Como dato adicional, en el análisis de identificación de los compuestos químicos obtenidos en la muestra, se observó en el espectro de masas la presencia de acetovainillina en un tiempo de retención de 22.42 min, a partir del cual se puede obtener vainillina. En la literatura se ha reportado que a partir de la lignina se puede obtener la vainillina, cuya estructura también es de origen fenólico, pero con más sustituyentes que los compuestos fenólicos de interés y por ende, es de mayor tamaño [22].

A continuación se presenta en la figura 3.35 el cromatograma indicando la presencia de acetovainillina.

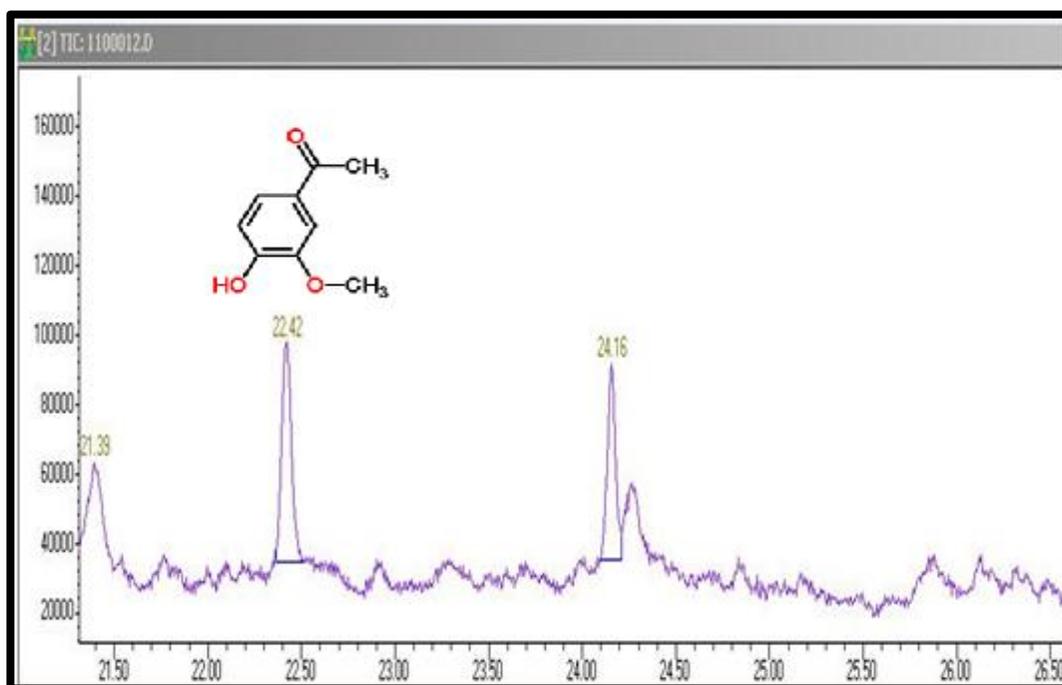


Figura 3.35 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 60 min, en pico de Acetovainillina a 22.42 min

La figura 3.36 corresponde a la comparación del espectro de masas de la muestra y de la base de datos del equipo comprobando la existencia de Acetovainillina.

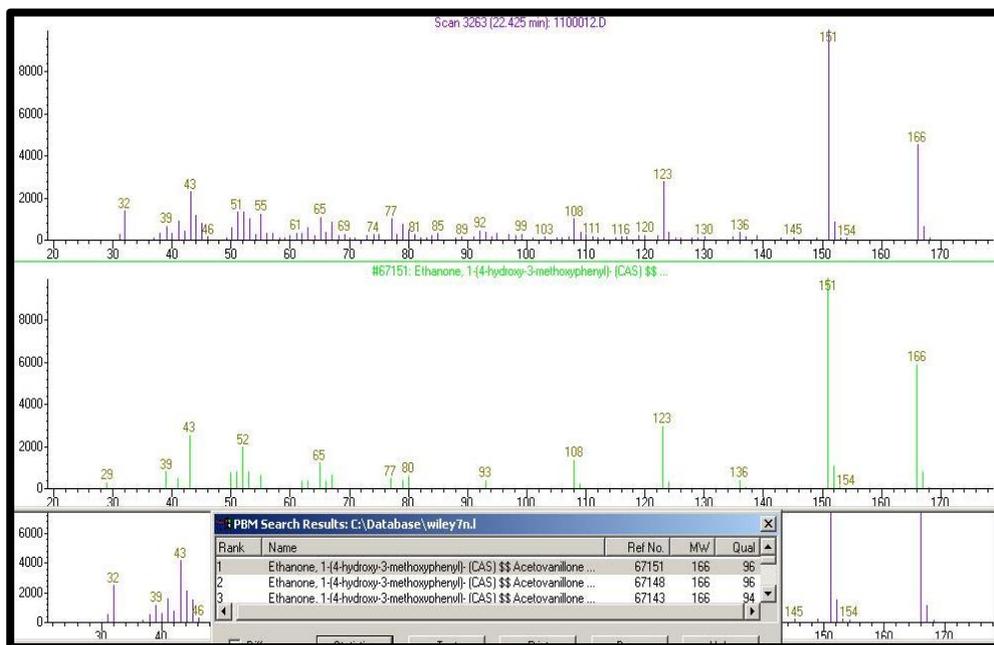


Figura 3.36 Comparación entre los espectros de masas de Acetovainillina y del pico a 22.42 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 160 °C y 60 min

En la figura 3.37 se presenta el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de lignina a 200 °C y 120 min.

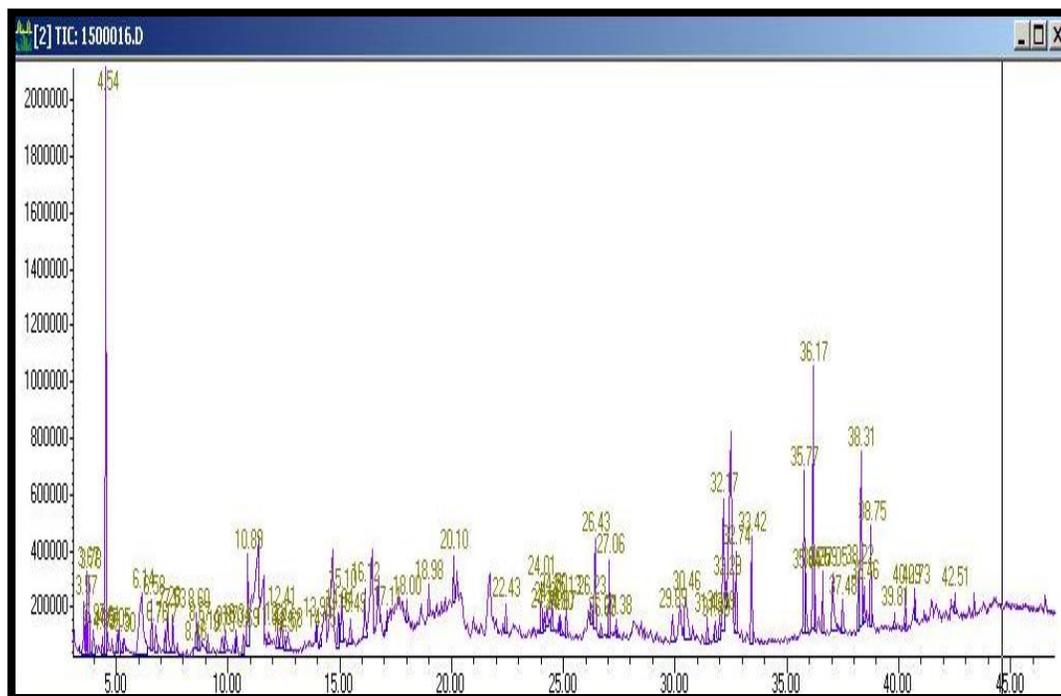


Figura 3.37 Cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 120 min

En la muestra a 200°C y 120 min, se encontró la presencia de fenol y guayacol, en los picos de tiempo de retención de 8.59 y 11.67 min, respectivamente. En la figura 3.38 se hizo un zoom en los tiempos de retención perteneciente al Fenol.

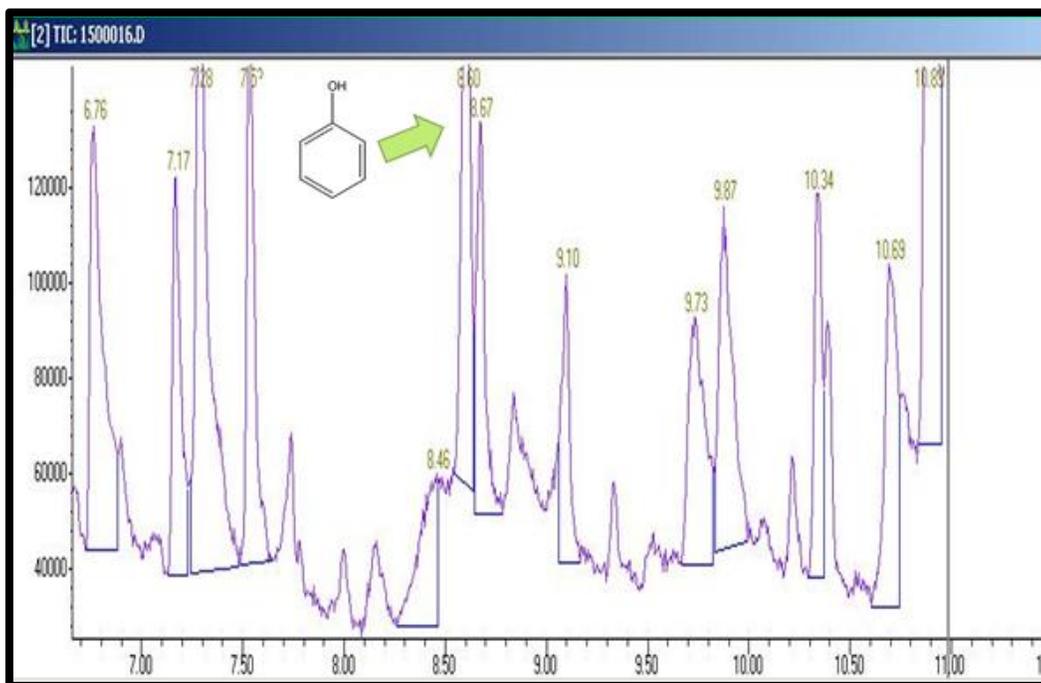


Figura 3.38 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 120 min, en pico de Fenol a 8.59 min

En la figura 3.39 se presenta la comparación del espectro de masas de la muestra y el espectro de masas de la base de datos del equipo se comprueba que a ese tiempo de retención se encontró el fenol.

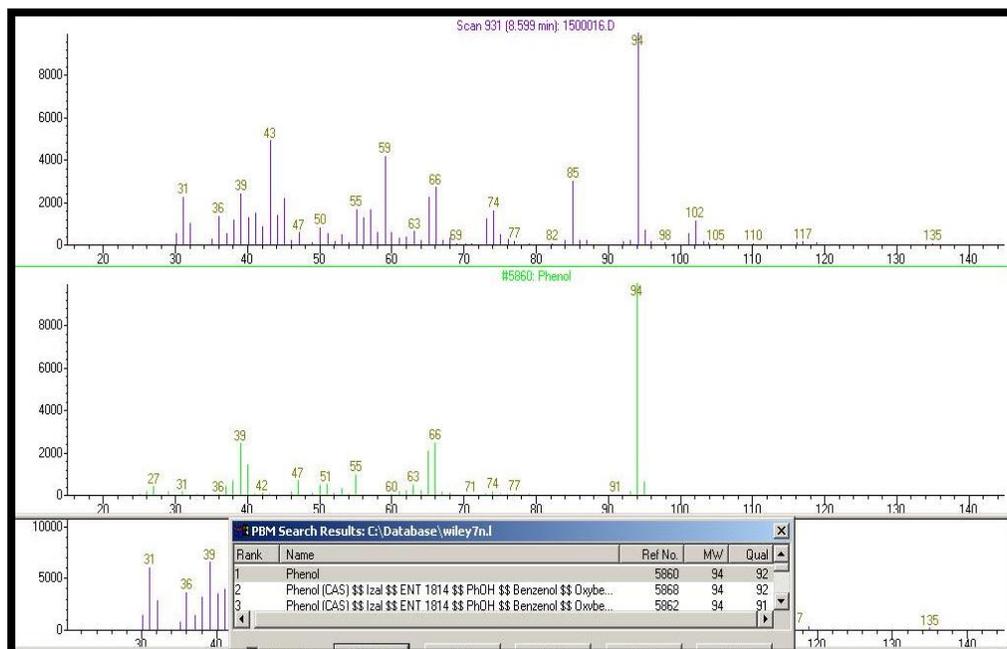


Figura 3.39 Comparación entre los espectros de masas de Fenol y del pico a 8.59 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 120 min

En la figura 3.40 del cromatograma ampliado que se muestra a continuación, se observa a 11.67 min un pico grande que no se alcanza a apreciar de manera completa debido a que está muy alto.

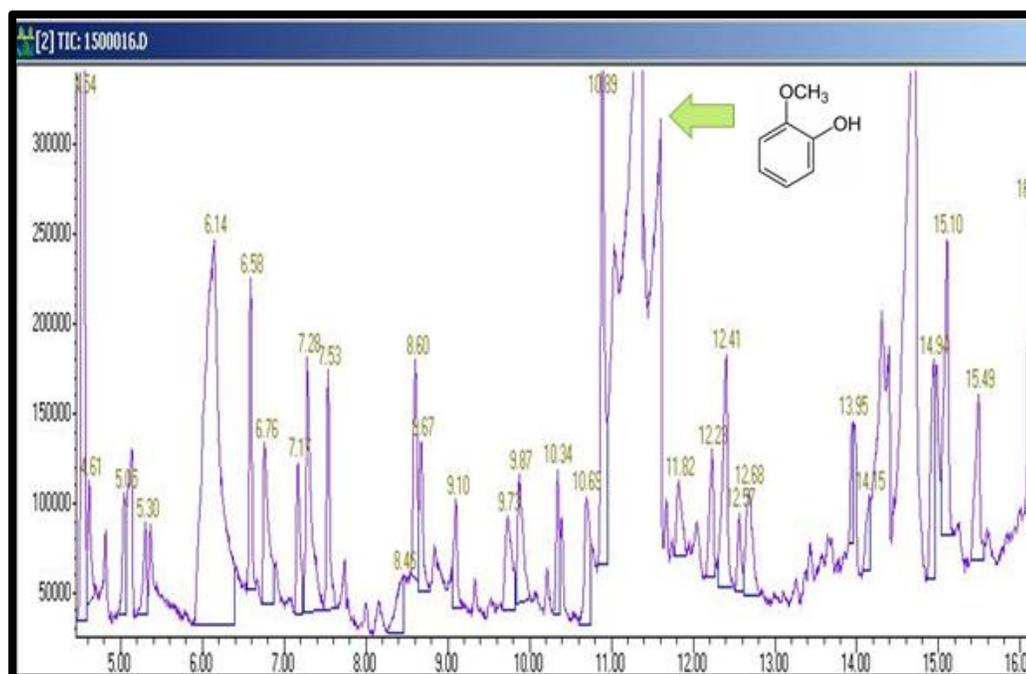


Figura 3.40 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 120 min, en pico de Guayacol a 11.67 min

Mediante la comparación del espectro de masas de la muestra y el espectro de masas de la base de datos del equipo, se comprueba que a ese tiempo de retención se encontró el fenol, en la figura 3.41.

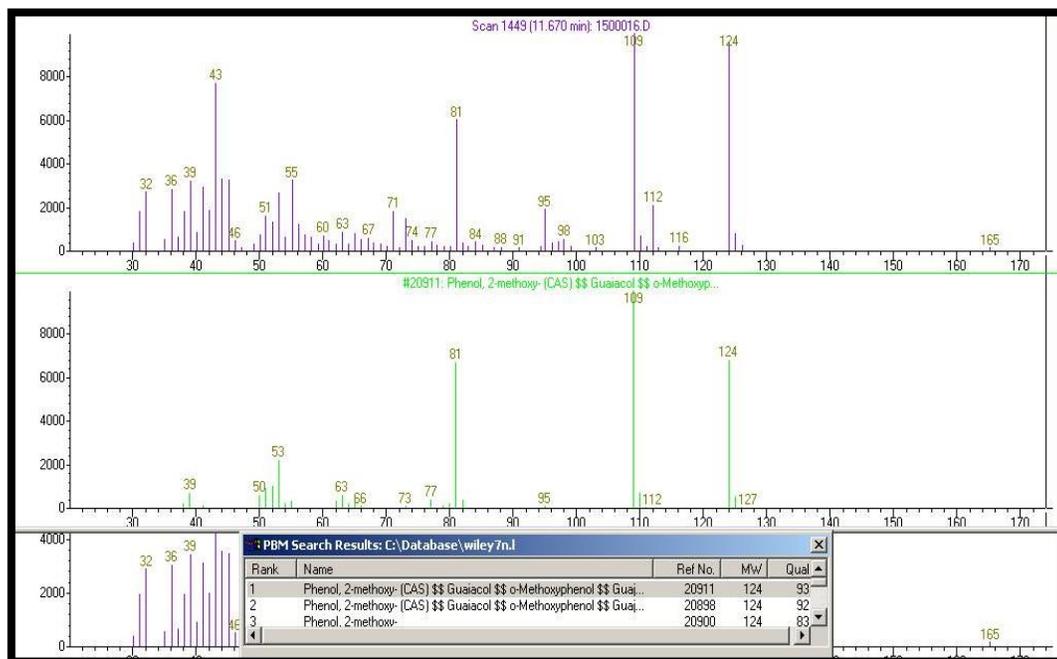


Figura 3.41 Comparación entre los espectros de masas de Guayacol y del pico a 11.67 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 120 min

El porcentaje de veracidad de la identificación del fenol y guayacol en la muestra a 200 °C y 120 min, fue de 92 y 93 % respectivamente, de acuerdo a la información proporcionada por el espectrómetro de masas.

Para el caso de esta muestra, al igual que la anterior, se observó en el análisis de identificación de los compuestos químicos obtenidos la presencia de acetovanillina, en un tiempo de retención de 22.43 min, el cual es el precursor de la vainilla artificial.

A continuación se presenta en la figura 3.42 el cromatograma indicando la presencia de acetovainillina.

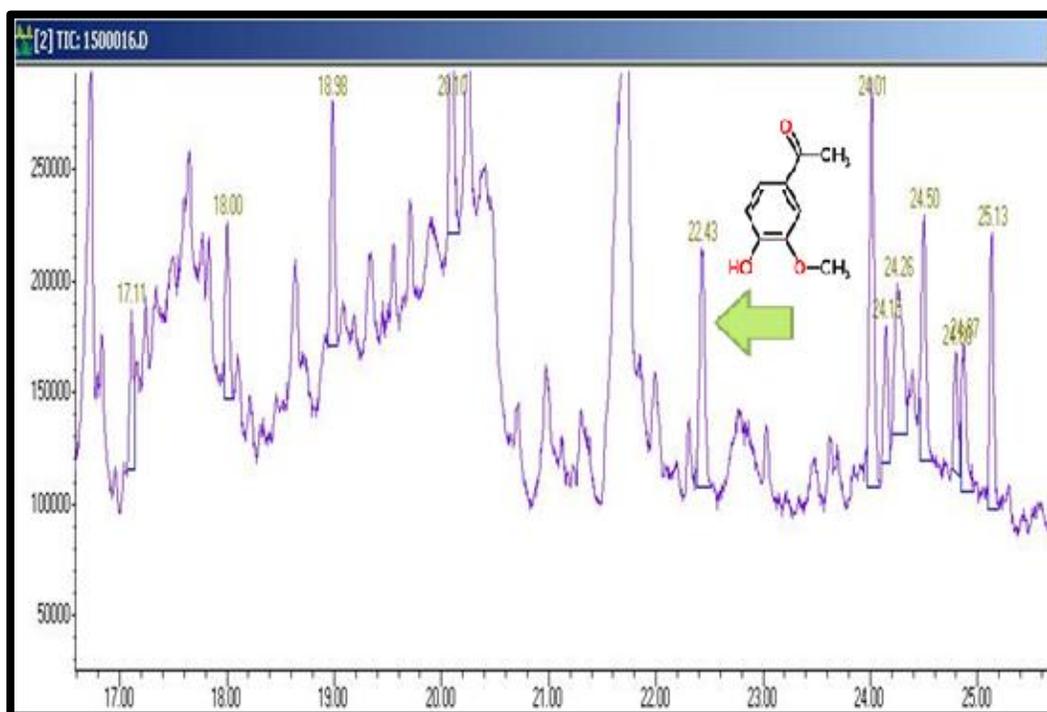


Figura 3.42 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 120 min, en pico de Acetovainillina a 22.43 min

Mediante la comparación del espectro de masas de la muestra y el espectro de masas de la base de datos del equipo, se comprueba que a ese tiempo de retención se encontró la acetovainillina, en la figura 3.43.

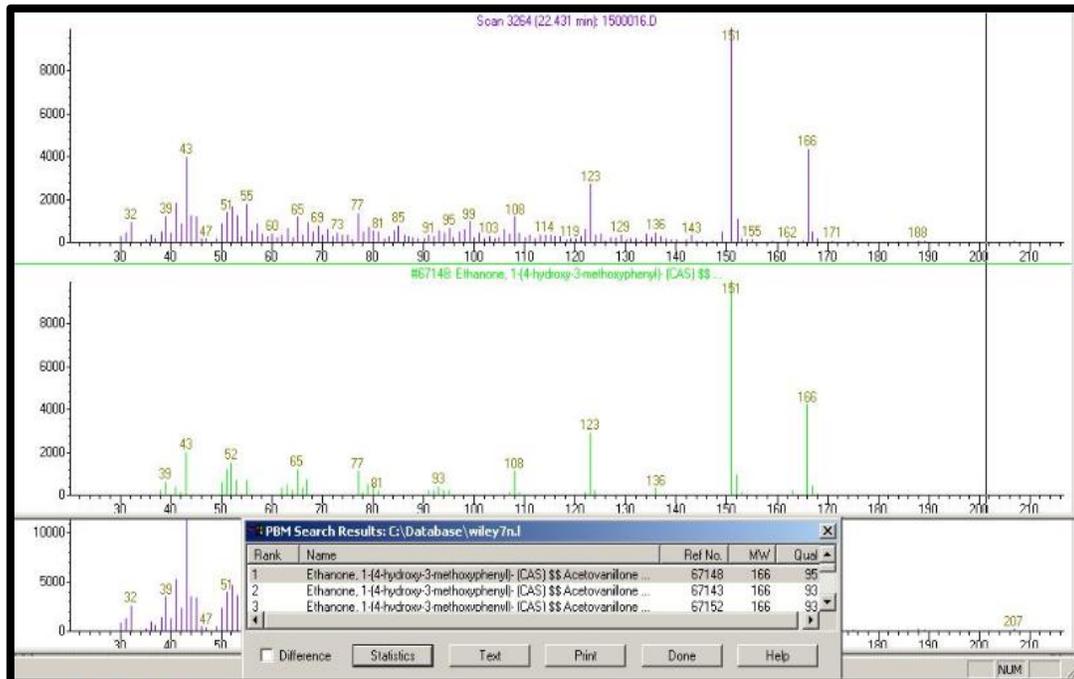


Figura 3.43 Comparación entre los espectros de masas de Acetovainillina y del pico a 22.43 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 120 min

En la muestra a 200°C y 60 min, se encontró la presencia de siringol, en el tiempo de retención de 18.97 min. En la figura 3.44 se presenta el cromatograma.

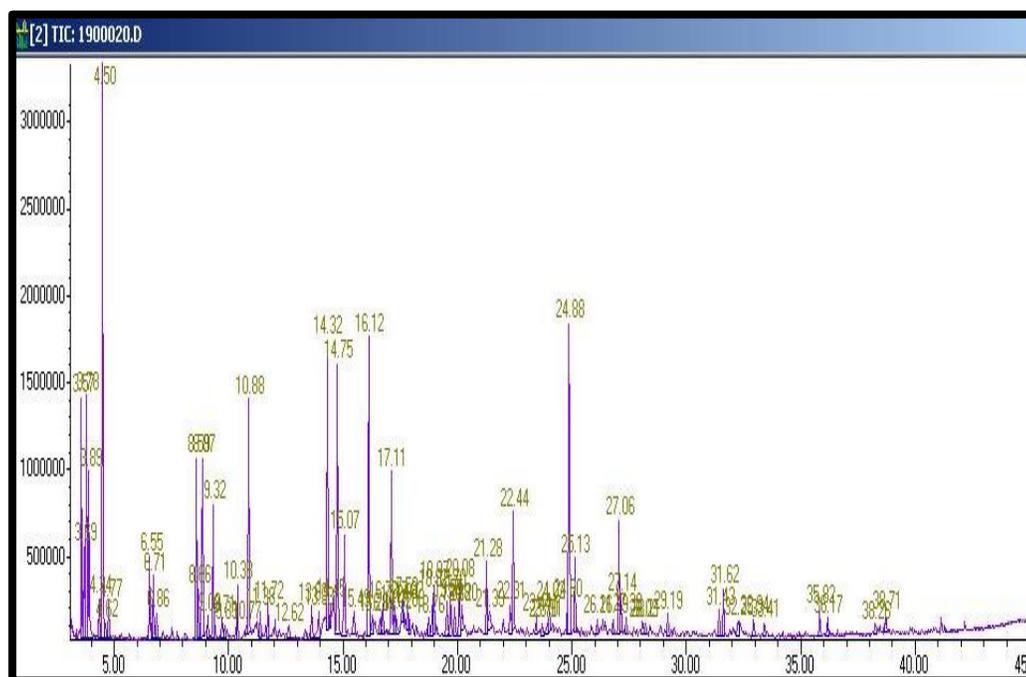


Figura 3.44 Cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 60 min

En la figura 3.45 del cromatograma ampliado que se muestra a continuación, se observa a 18.97 min un pico mediano.

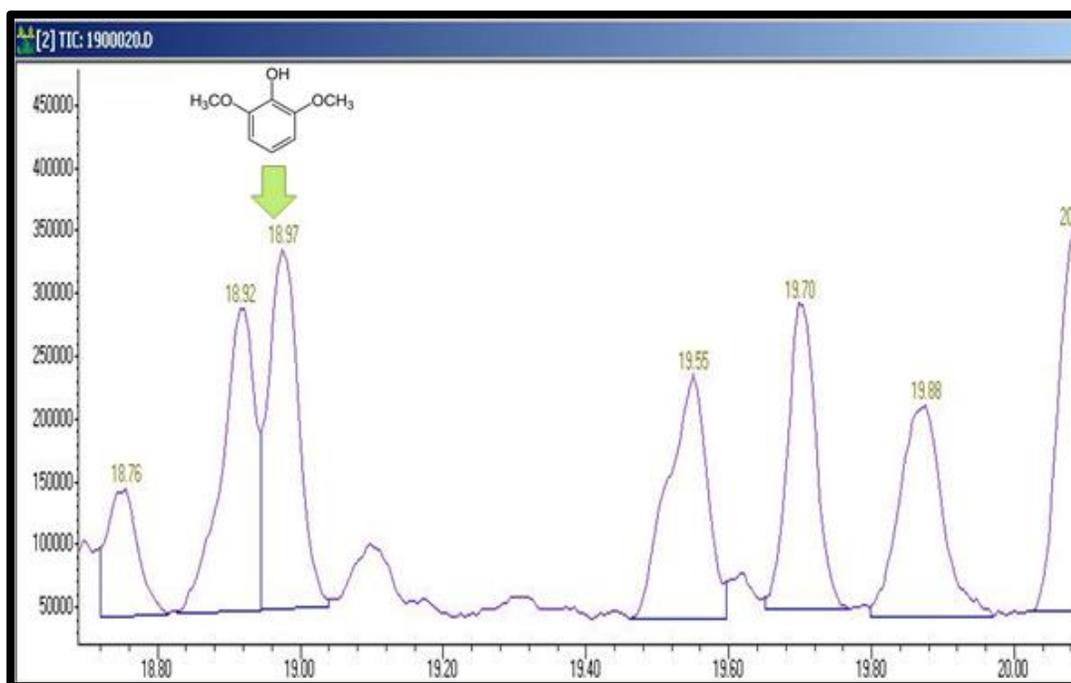


Figura 3.45 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 60 min, en pico de Siringol a 18.97 min

Mediante la comparación del espectro de masas de la muestra y el espectro de masas de la base de datos del equipo, se comprueba que a ese tiempo de retención se encontró el siringol, en la figura 3.46.

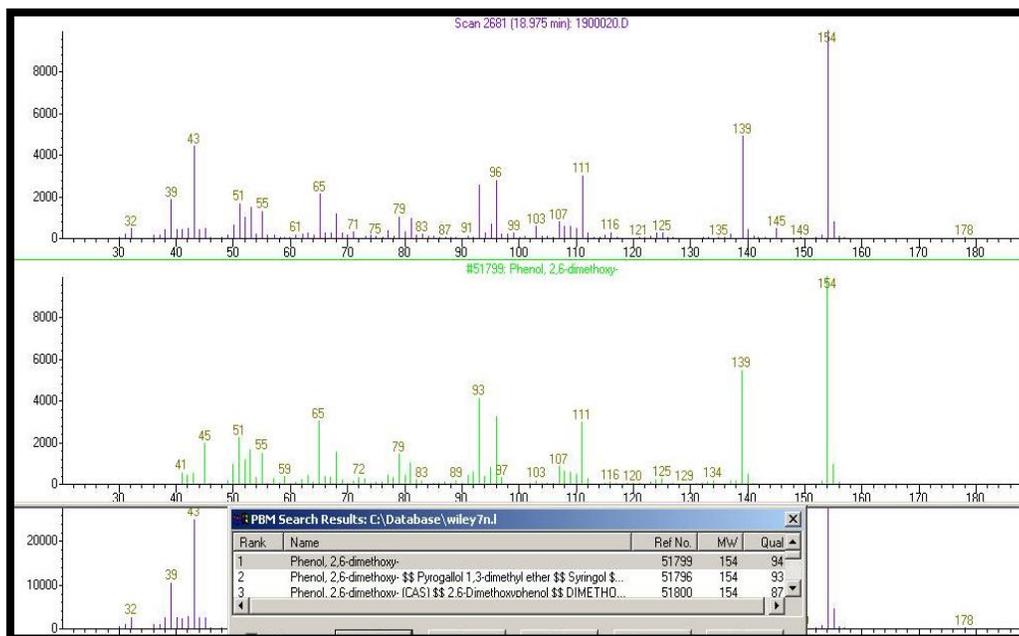


Figura 3.46 Comparación entre los espectros de masas de Siringol y del pico a 18.97 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 200 °C y 60 min.

El porcentaje de veracidad de la identificación del siringol en la muestra a 200 °C y 60 min, fue de 94 %, de acuerdo a la información proporcionada por el espectrómetro de masas.

En la figura 3.47 se observa el cromatograma de la muestra de aceite fenólico a 225 °C y 120 min. En esta muestra, se encontró la presencia de fenol, guayacol y siringol, en los picos de tiempo de retención de 8.61, 11.68 y 18.99 min, respectivamente.

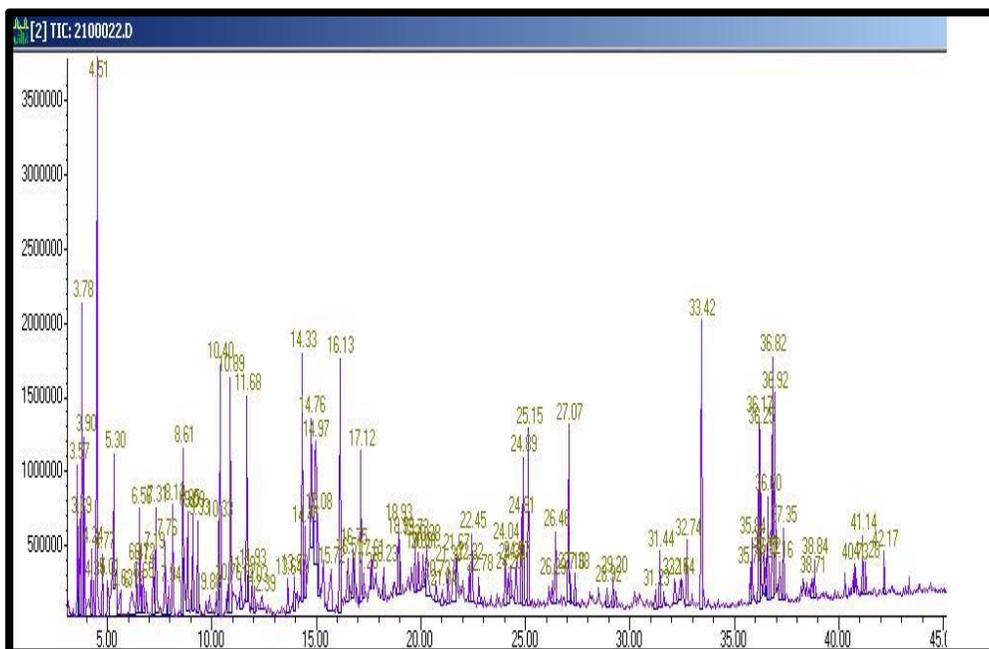


Figura 3.47 Cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 120 min

En la figura 3.48 del cromatograma ampliado que se muestra a continuación, se observa un pico mediano a 8.61 min, en el cual mediante la comparación del espectro de masas de la muestra y el espectro de masas de la base de datos del equipo se comprueba que a ese tiempo de retención se encontró el fenol.

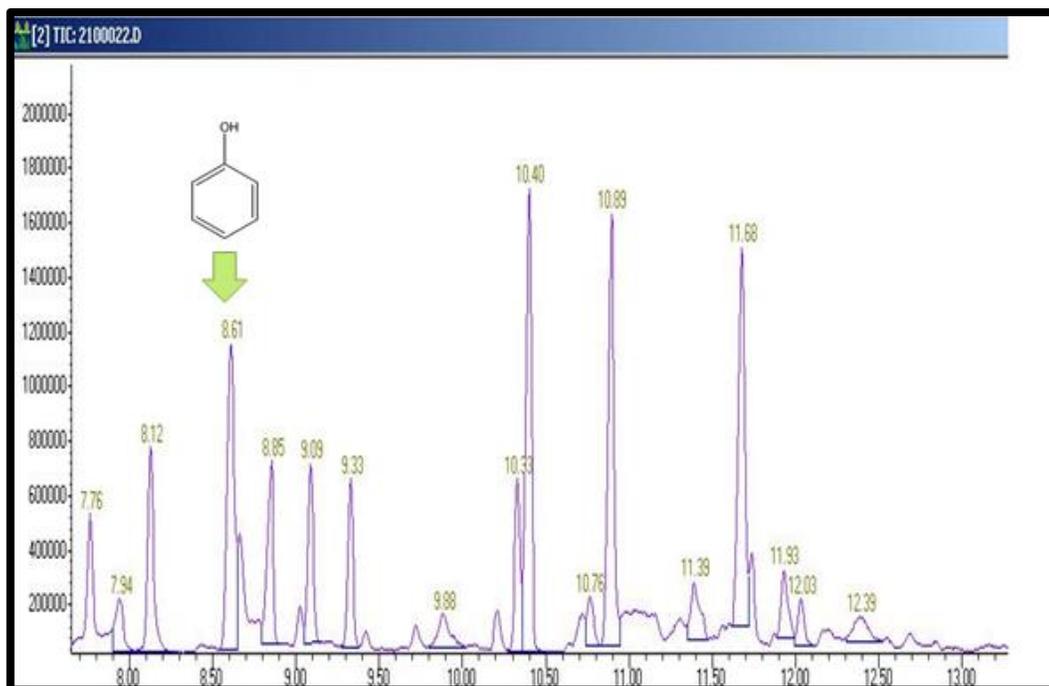


Figura 3.48 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 120 min, en pico de Fenol a 8.61 min

En la figura 3.49 se muestran los dos espectros de masas de la muestra y de la base de datos del equipo que al compararse se demuestra la presencia de Fenol.

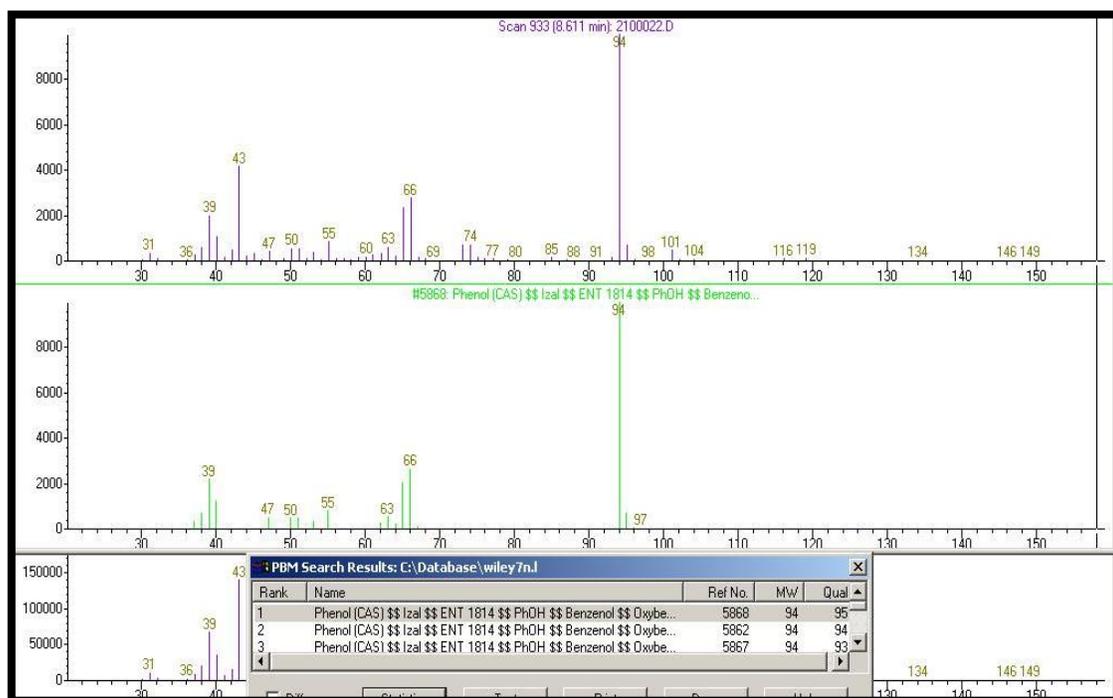


Figura 3.49 Comparación entre los espectros de masas de Fenol y del pico a 8.61 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 120 min

En la figura 3.50 del cromatograma ampliado, se observa un pico alto a 11.68 min, en el cual mediante la comparación del espectro de masas de la muestra y el espectro de masas de la base de datos del equipo se comprueba que a ese tiempo de retención se encontró el guayacol.

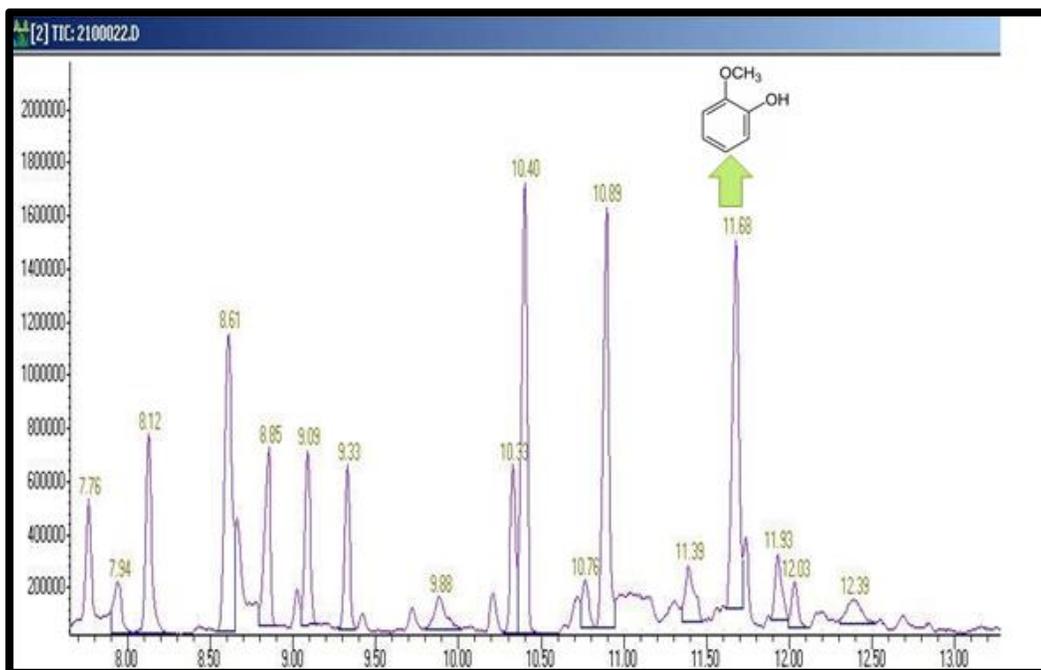


Figura 3.50 Cromatograma ampliado de muestra de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 120 min, en pico de Guayacol a 11.68 min

En la figura 3.51 se muestran los espectros de masas y la identificación del guayacol.

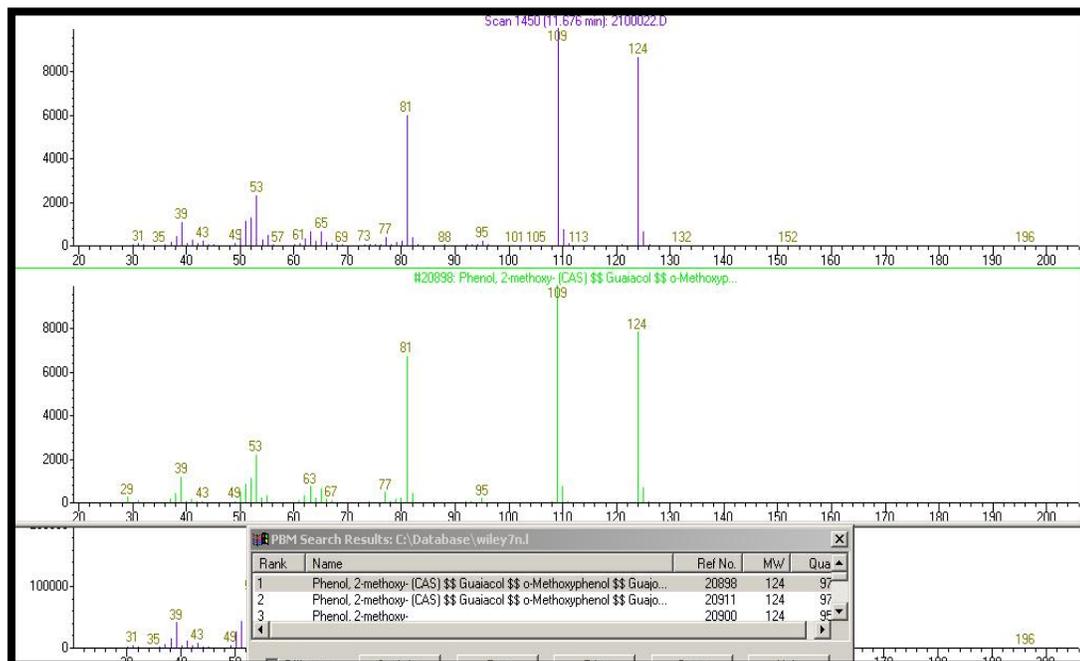


Figura 3.51 Comparación entre los espectros de masas de Guayacol y del pico a 11.68 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 120 min

En la figura 3.52 se muestra el cromatograma de aceite fenólico a 225 °C y 120 min donde al ampliarse se identifica la presencia de Siringol a 18.99 min.

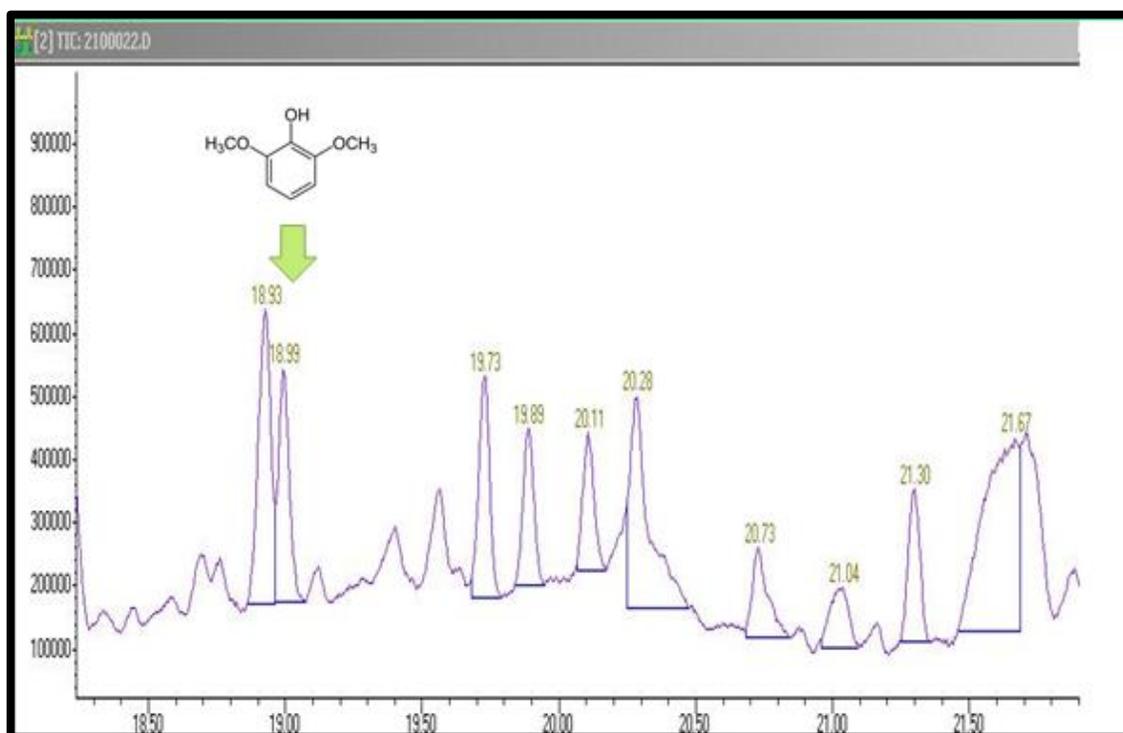


Figura 3.52 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 120 min, en pico de Siringol a 18.99 min

La comparación del espectro de masas de la muestra y el espectro de masas de la base de datos del equipo se comprueba que a ese tiempo de retención se encontró el siringol, en la figura 3.53.

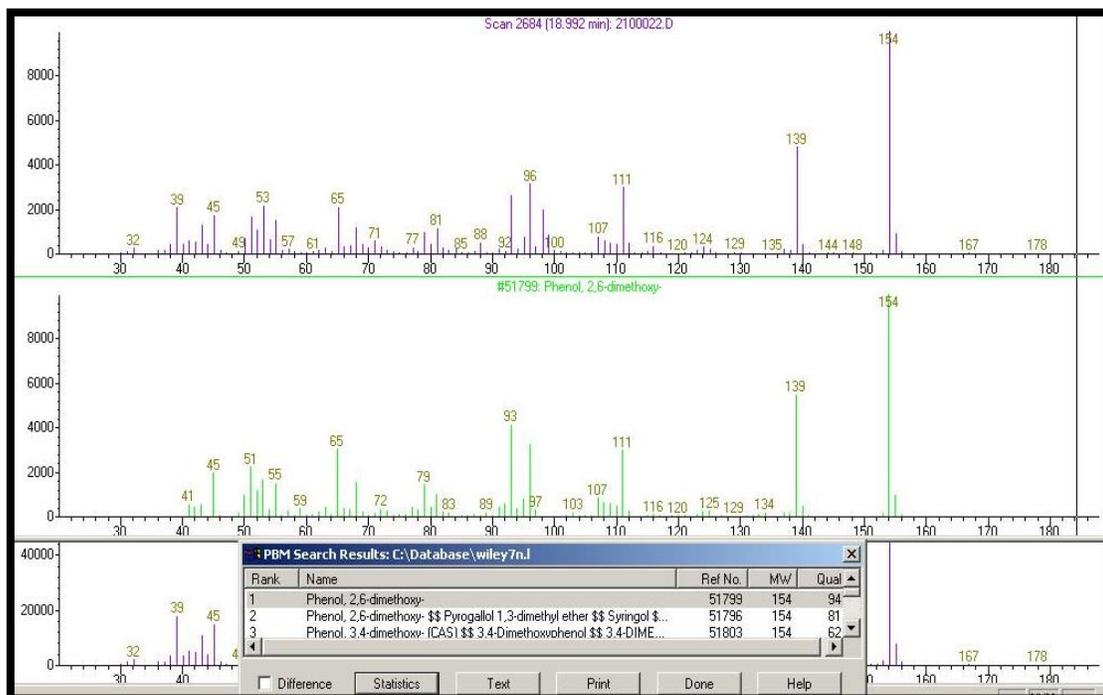


Figura 3.53 Comparación entre los espectros de masas de Siringol y del pico a 18.99 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 120 min

El porcentaje de veracidad de la identificación del fenol, guayacol y siringol en la muestra a 225 °C y 120 min, fue de 94, 97 y 94 % respectivamente, de acuerdo a la información proporcionada por el espectrómetro de masas.

En la figura 3.54 se observa el cromatograma de la muestra de aceite fenólico a 225 °C y 60 min. En esta muestra, se encontró la presencia de fenol, guayacol y siringol, en los picos de tiempo de retención de 8.67, 11.71 y 18.97 min, respectivamente.

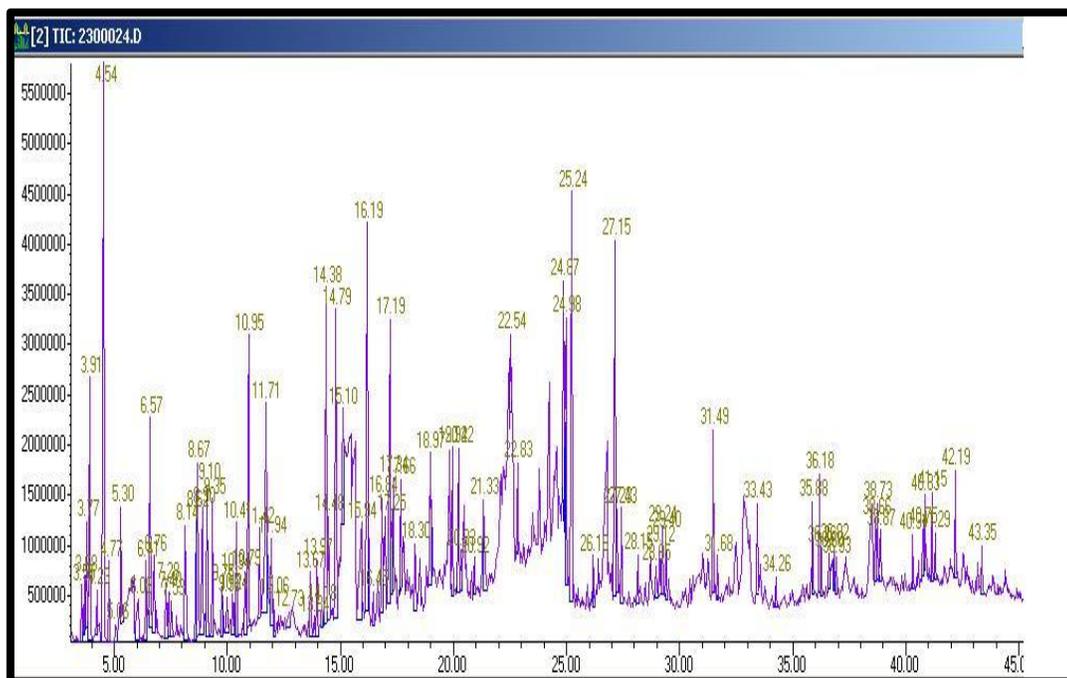


Figura 3.54 Cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 60 min

A continuación, en la figura 3.55 del cromatograma ampliado, se observa un pico apreciable a 8.67 min que corresponde al Fenol.

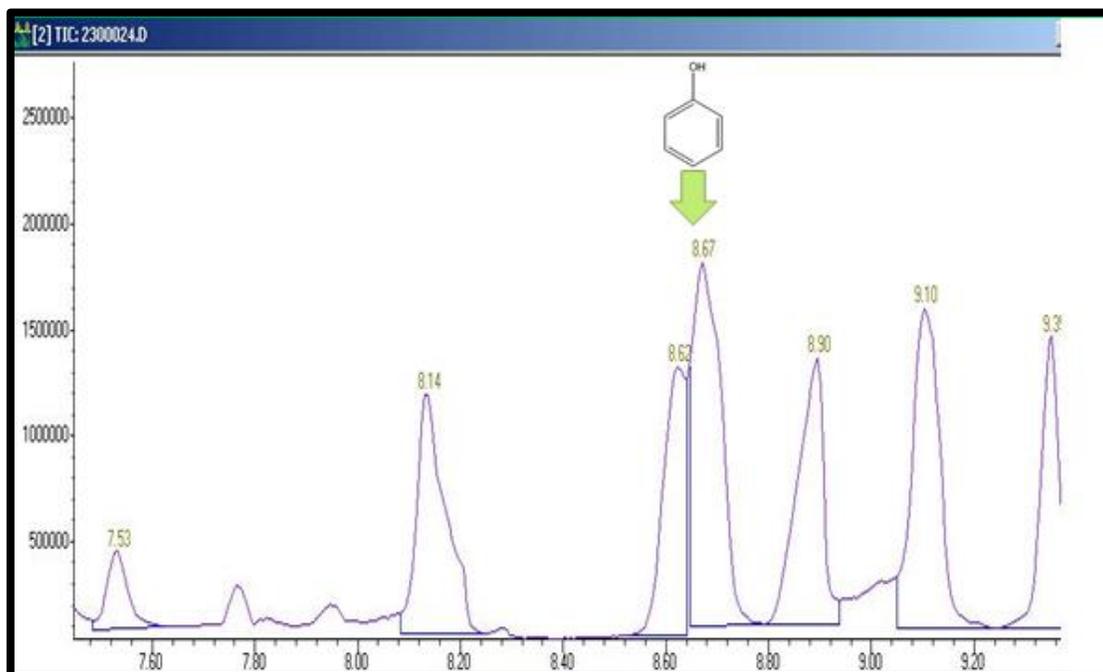


Figura 3.55 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 60 min, en pico de Fenol a 8.67 min

Mediante la comparación del espectro de masas de la muestra y el espectro de masas de la base de datos del equipo se comprueba que a ese tiempo de retención se encontró el fenol, en la figura 3.56.

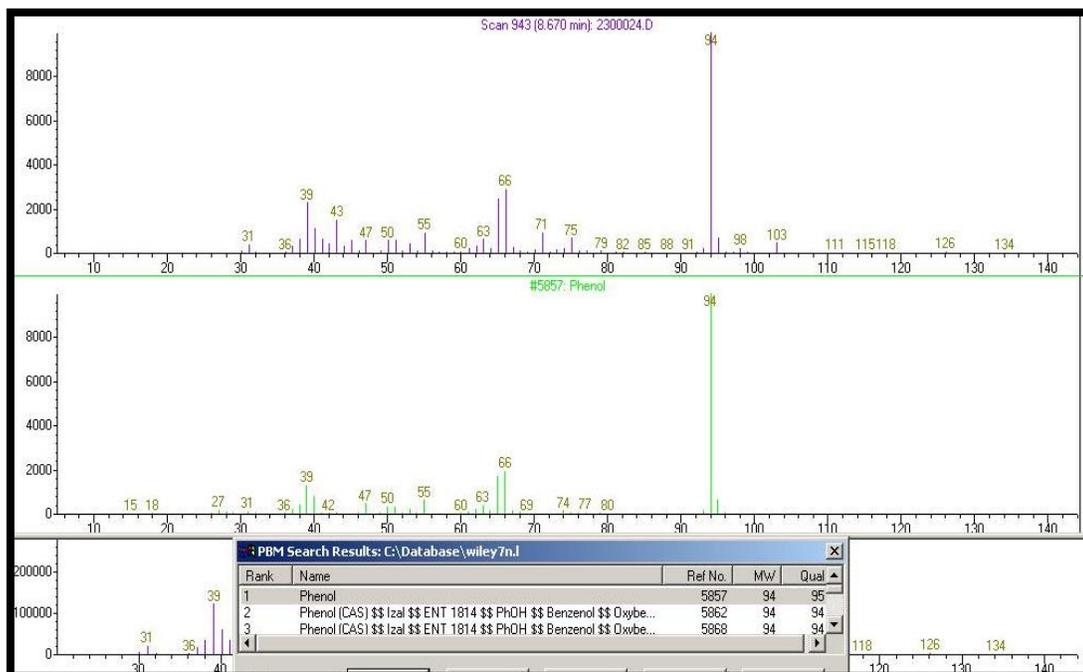


Figura 3.56 Comparación entre los espectros de masas de Fenol y del pico a 8.67 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 60 min

Ahora, en la figura 3.57 del cromatograma ampliado, se observa un pico apreciable a 11.71 min que corresponde al guayacol.

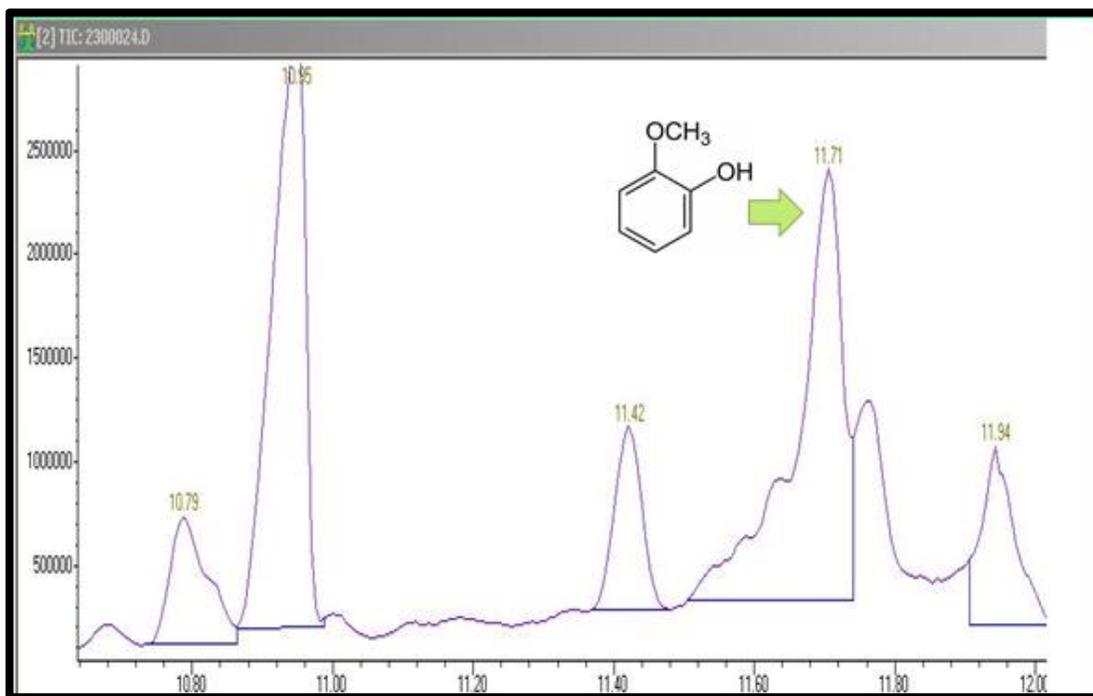


Figura 3.57 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 60 min, en pico de Guayacol a 11.71 min

La comparación del espectro de masas de la muestra y el espectro de masas de la base de datos del equipo donde se comprueba que a ese tiempo de retención se encontró el guayacol, está en la figura 3.58.

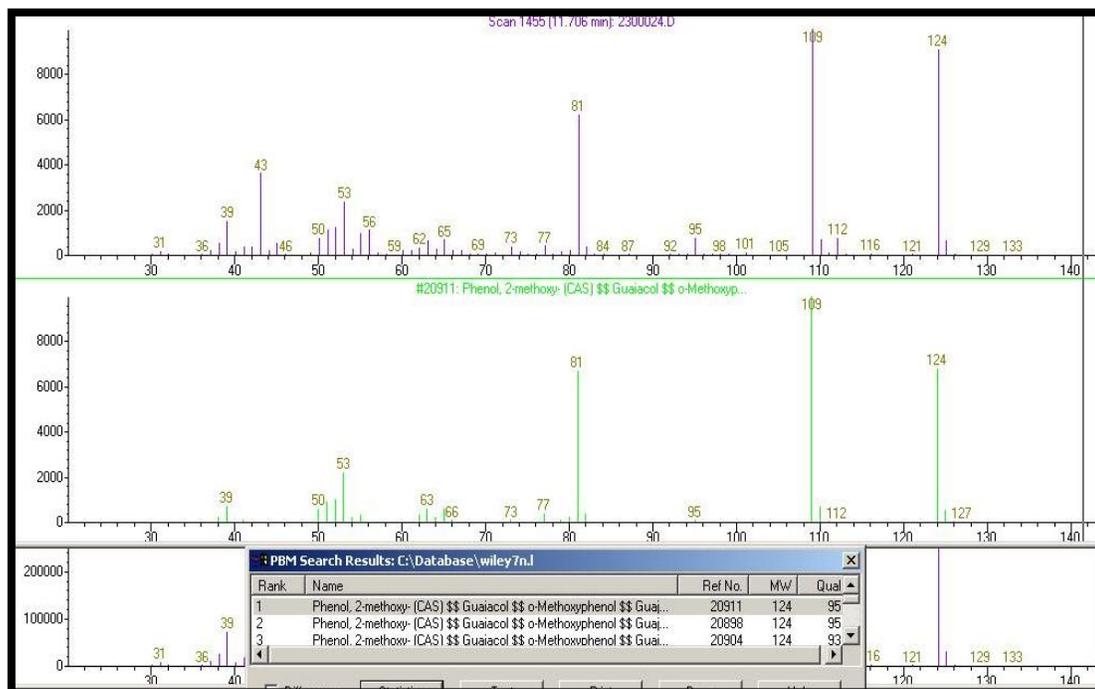


Figura 3.58 Comparación entre los espectros de masas de Guayacol y del pico a 11.71 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 60 min

Por último, para la muestra a 225 °C y 60 min, se muestra a continuación en la figura 3.59 del cromatograma ampliado, se observa un pico grande a 19.10 min que coressponde al siringol.

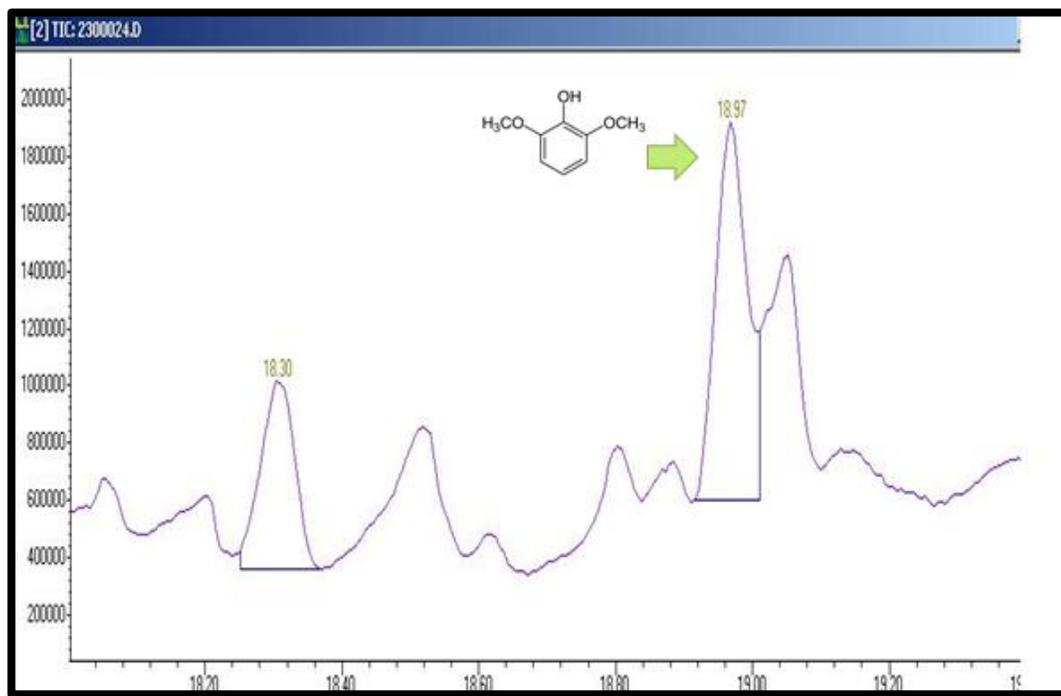


Figura 3.59 Cromatograma ampliado de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 60 min, en pico de Siringol a 18.97 min

A través de la comparación del espectro de masas de la muestra y el espectro de masas de la base de datos del equipo, se comprueba que a ese tiempo de retención se encontró el siringol, en la figura 3.60.

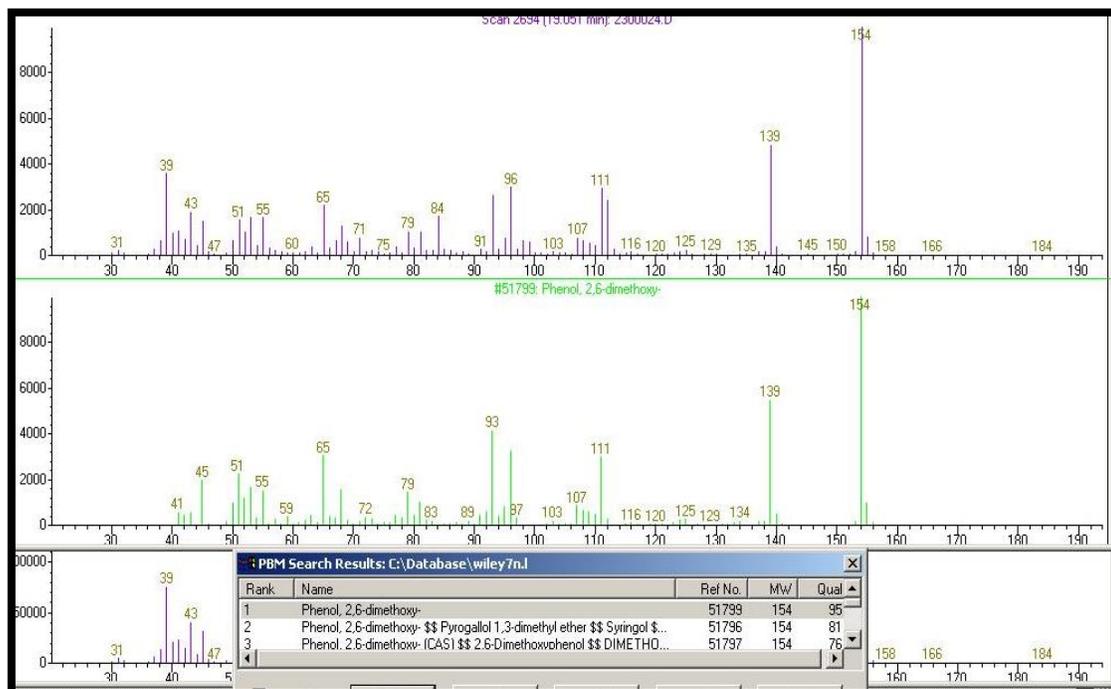


Figura 3.60 Comparación entre los espectros de masas de Siringol y del pico a 19.10 min mostrado en el cromatograma de aceite fenólico obtenido por fragmentación de la lignina a 225 °C y 60 min

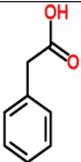
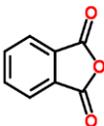
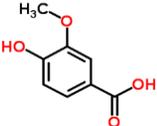
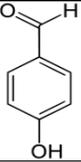
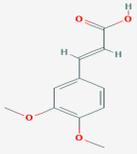
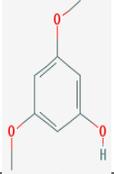
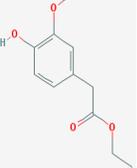
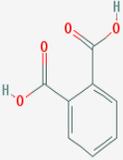
El porcentaje de veracidad de la identificación del fenol, guayacol y siringol en la muestra a 225 °C y 120 min, fue de 95 % para el caso de los tres compuestos, de acuerdo a la información proporcionada por el espectrómetro de masas. La vainillina se encontró solamente en la muestra de 160 °C y 120 min, mientras que la acetovainillina se encontró en las muestras de 160°C y 60 min, y de 200 °C y 120 min. El porcentaje de área del pico de la vainillina fue de un 0.9 %, mientras que el porcentaje de área de la acetovainillina fue de 1.49 y 1.55 %, respectivamente.

Estos valores dan una idea de que su cantidad de concentración es muy pequeño; sin embargo, su identificación es un indicativo que a partir de la lignina se pueden obtener este tipo de compuestos que sirven como materia prima para la producción en forma sintética del aditivo en los alimentos conocido como la vainilla.

Pero no sólo se identificó la presencia de vainillina y acetovainillina. Debido a que el aceite fenólico contiene una mezcla de diversos tipos de compuestos químicos, al hacer el análisis de los resultados obtenidos por la caracterización en el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, se encontraron otros compuestos de origen fenólico y con mayor peso molecular; es decir, oligómeros. Estos compuestos también se encontraron en cantidades muy pequeñas de acuerdo a su porcentaje de área del pico; sin embargo, se corrobora que la estructura compleja de la lignina se fragmentó y se obtuvieron esos compuestos de menor peso molecular con respecto al polímero de la lignina como tal. Si se siguen aplicando condiciones más extremas en la reacción de hidrólisis térmica, estos compuestos se pueden fragmentar aún más en compuestos aún más pequeños.

Algunos ejemplos de estos compuestos encontrados se muestran en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12 Ejemplos y estructura de algunos compuestos químicos con estructura fenólica encontrados en las muestras de aceite fenólico

Nombre del compuesto químico	Estructura del compuesto químico	Porcentaje de área bajo la curva
Fenilácido acético		5.40
Anhídrido ftálico		0.66
Ácido vanílico (derivado de la vainillina)		2.15
4-hidroxi-benzaldehído		2.58
Dimetil-ácido cafeico		1.98
3,5-dimetoxifenol		0.32
Homovanillato de etilo		0.41
1,2-benceno-ácido dicarboxílico		0.90

3.5.2 Cuantificación de compuestos fenólicos

Una vez finalizada la etapa de identificación de los compuestos fenólicos de interés, el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas realizó el proceso de cuantificación a través del software del equipo. Los cálculos de la cuantificación se basaron en los datos de la curva de calibración que se elaboró antes de proceder al análisis de las muestras de aceite fenólico, y el software arrojó los resultados de concentración de los compuestos fenólicos de interés encontrados en cada muestra. La unidad de concentración es mg/l.

A continuación, en la Tabla 3.13, se indican los resultados de cada compuesto fenólico de interés encontrado en cada tipo de muestra.

Tabla 3.13 Resultados de cuantificación de los compuestos fenólicos de interés encontrados en cada tipo de muestra de aceite fenólico

Tipo de muestra de aceite fenólico	Compuesto fenólico de interés	Concentración en mg/l
160 °C 120 min	Fenol	1
	Siringol	6.49
160 °C 60 min	Catecol	23.53
200 °C 120 min	Fenol	8.52
	Guayacol	1
200 °C 60 min	Siringol	35.10
225 °C 120 min	Fenol	136.33
	Guayacol	46.96
	Siringol	50.17
225 °C 60 min	Fenol	246.54
	Guayacol	70.42
	Siringol	139.48

El siringol fue el compuesto fenólico que se encontró en la mayoría de las muestras, y el fenol fue el que se encontró en mayor cantidad (246.54 mg/l) en la muestra a 225 °C y 60 min. Si se sigue la recomendación de trabajar la reacción de hidrólisis térmica a 200 °C y 60 min (de acuerdo a los rendimientos de aceite fenólico discutidos en el apartado 3.3) entonces se observa que el único compuesto fenólico obtenido fue el siringol y a un valor menor con respecto al valor del siringol obtenido en los otros tipos de muestra. Si lo que se quiere es obtener un mayor rendimiento de aceite fenólico, se recomienda trabajar a 200 °C y 60 min. Si se quiere obtener mayores compuestos fenólicos, se recomienda trabajar a 225 °C y 60 min, que fue donde se obtuvo mayor cantidad en cuanto a número de compuestos fenólicos y a concentración de éstos.

Si se analiza la tabla 3.13 al detalle, se aprecia que el fenol fue el que se obtuvo en mayor cantidad en general en todas las muestras, comparado con el guayacol y el siringol. Esto se debe a que el fenol es el monómero más simple y el de menor peso molecular, y por ende la fragmentación es más fácil de realizar en este compuesto cuya estructura es la más sencilla, sin tantos sustituyentes como el guayacol y el siringol que podrían interferir en el rompimiento. Entonces la fragmentación se llevó a cabo de manera exitosa para lograr el objetivo de fragmentar la lignina en compuestos del menor tamaño posible.

La equivalencia de mg/l es la unidad de partes por millón (ppm) por lo que los valores de concentración de los compuestos fenólicos de interés son demasiado pequeños. Si se convirtieran a mg/g de aceite fenólico, los valores serían menores a 0.5, y esto también se demuestra al observar el tamaño de algunos de los picos de estos compuestos en los cromatogramas. Los picos también son pequeños y el porcentaje de área es un indicativo de lo anterior. Sin embargo, a pesar de haber obtenido los compuestos fenólicos en cantidades muy pequeñas, se logró demostrar que la metodología propuesta tanto en el proceso de fragmentación y purificación como en el proceso de obtención de lignina, fue la adecuada para cumplir con el objetivo de obtener los compuestos fenólicos que en la literatura se reportan como los más comunes que se encuentran presentes al fragmentar la lignina.

Toledano [24] reportó que la reacción de fragmentación de lignina por hidrólisis térmica alcalina con NaOH y a una temperatura de 300 °C, dio como resultado una cuantificación en mg/l y en base a p/p de lignina inicial (20 gr) de lo siguiente: fenol (1.01), guayacol (1.24), catecol (10.22), 4-metilcatecol (5.16), m-cresol (0.25) y ausencia de siringol. Al realizar la comparación con los resultados obtenidos en este proyecto, se demuestra que la concentración del Fenol es la misma (1) a la temperatura de 160 °C y referente a una cantidad de lignina inicial menor (15 gr). Así mismo, sí se obtuvo siringol en este caso, obteniendo la mayor cantidad (139.48) a la temperatura de 225 °C; sin embargo, hubo ausencia de 4-metilcatecol y m-cresol, y el catecol se obtuvo a 160 °C con una concentración mayor que la reportada por Toledano. Por lo tanto, a menores temperaturas se obtuvieron la mayoría de los compuestos fenólicos reportados en la literatura, y a mayores concentraciones o similares.

3.5.2.1 Modelo matemático

Un modelo matemático experimental fue llevado a cabo a través del software Minitab, con la finalidad de definir la variable del diseño de experimentos que influye más en el valor de concentración de cada compuesto fenólico obtenido. Así mismo, otra finalidad del modelo matemático es la determinación de ecuaciones lineales para que al resolverlas den como resultado el valor reportado de concentración de cada compuesto fenólico de interés, de acuerdo a lo propuesto por Bradley [40].

Para el diseño de experimentos, se utilizaron dos variables independientes: temperatura y tiempo. Los valores de cada temperatura fueron: 160, 200 y 225 °C, y los valores de tiempo fueron: 60 y 120 min. Por lo tanto, 3 temperaturas por 2 tiempos dan como resultado la realización de 6 experimentos, cuyas réplicas por triplicado dan un total de 18 experimentos. Todos los datos del diseño de experimentos fueron introducidos en el software Minitab para ajustar el modelo lineal. Para ello, los 18 experimentos se reportaron como realizados en forma aleatoria, y una vez ajustado el modelo lineal, se procedió a introducir como variable dependiente los valores de concentración de cada compuesto fenólico reportados en la Tabla 3.13 (excepto el Catecol, ya que éste sólo aparece en el experimento a 160 °C y 60 min y se

dificulta la elaboración del modelo) para analizar e interpretar el diseño de experimentos con su respectiva “Respuesta” o variable dependiente.

Como resultado del análisis e interpretación del modelo matemático, se obtuvo un diagrama de Pareto por cada compuesto fenólico (Fenol, Guayacol y Siringol) en el que se indica cuál de las dos variables independientes (o la combinación de ambas) es la que tiene mayor influencia sobre la respuesta, en este caso sobre la concentración de los compuestos fenólicos obtenidos.

En la figura 3.61 se muestra el diagrama de Pareto estandarizado de la temperatura y tiempo en la respuesta del Fenol. La temperatura es la de mayor influencia.

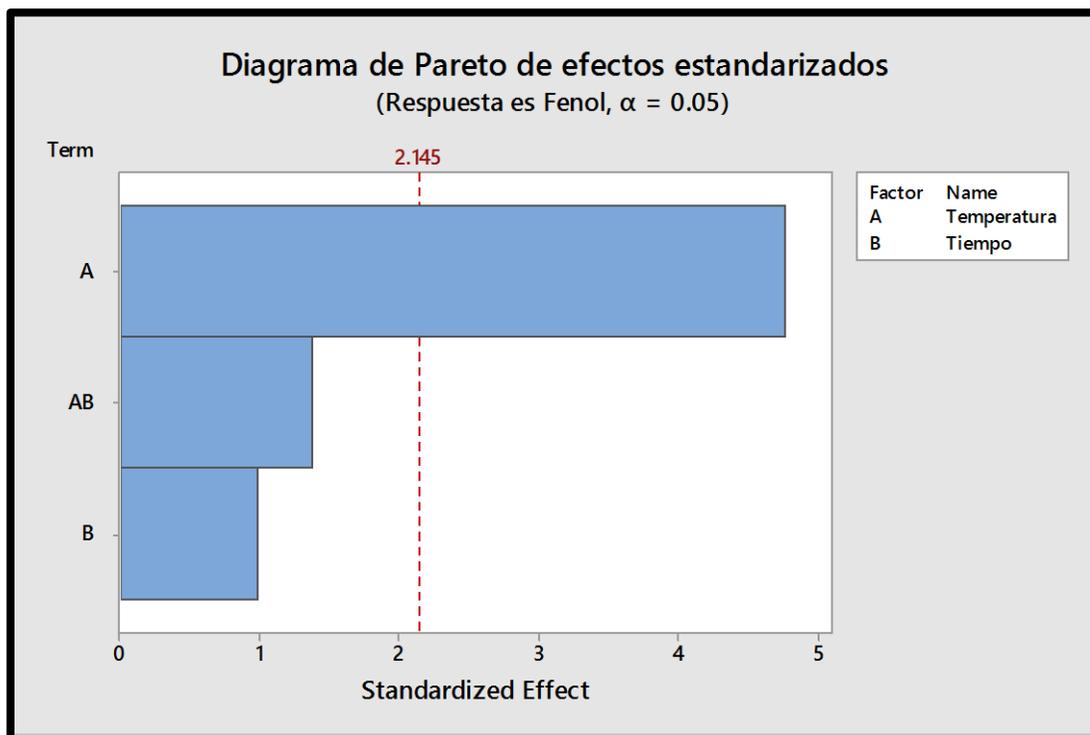


Figura 3.61 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de la temperatura y tiempo en la respuesta de Fenol

En la figura 3.62 se muestra el diagrama de Pareto estandarizado de la temperatura y tiempo en la respuesta del Guayacol. La temperatura es la de mayor influencia.

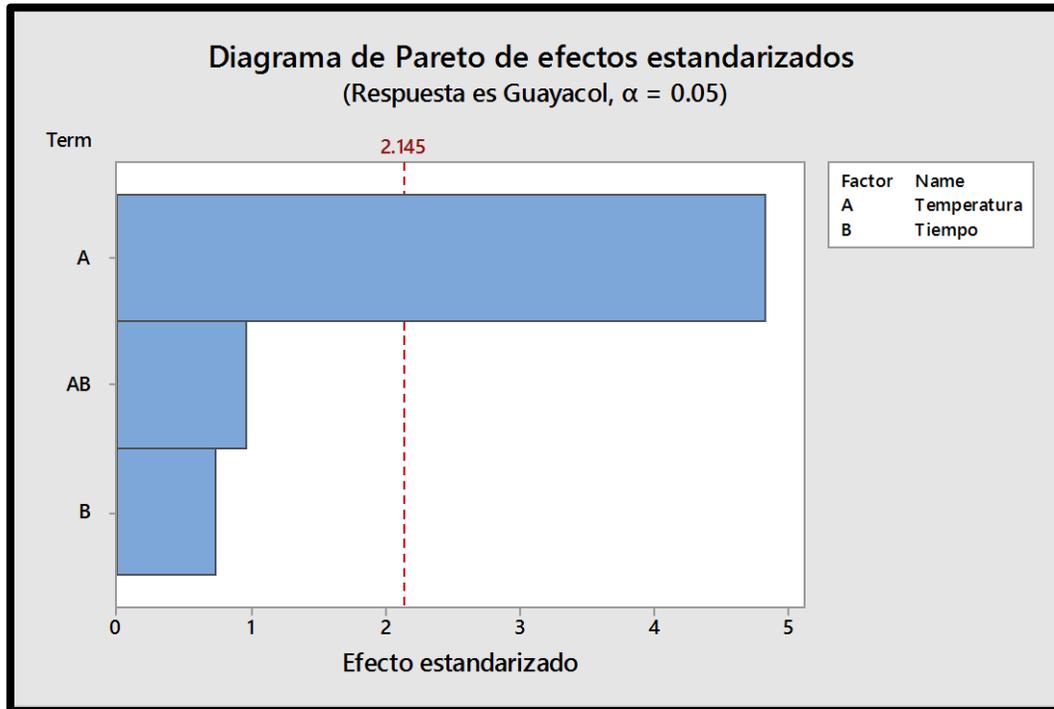


Figura 3.62 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de la temperatura y tiempo en la respuesta de Guayacol

En la figura 3.63 se muestra el diagrama de Pareto estandarizado de la temperatura y tiempo en la respuesta del Siringol. La temperatura es la de mayor influencia.

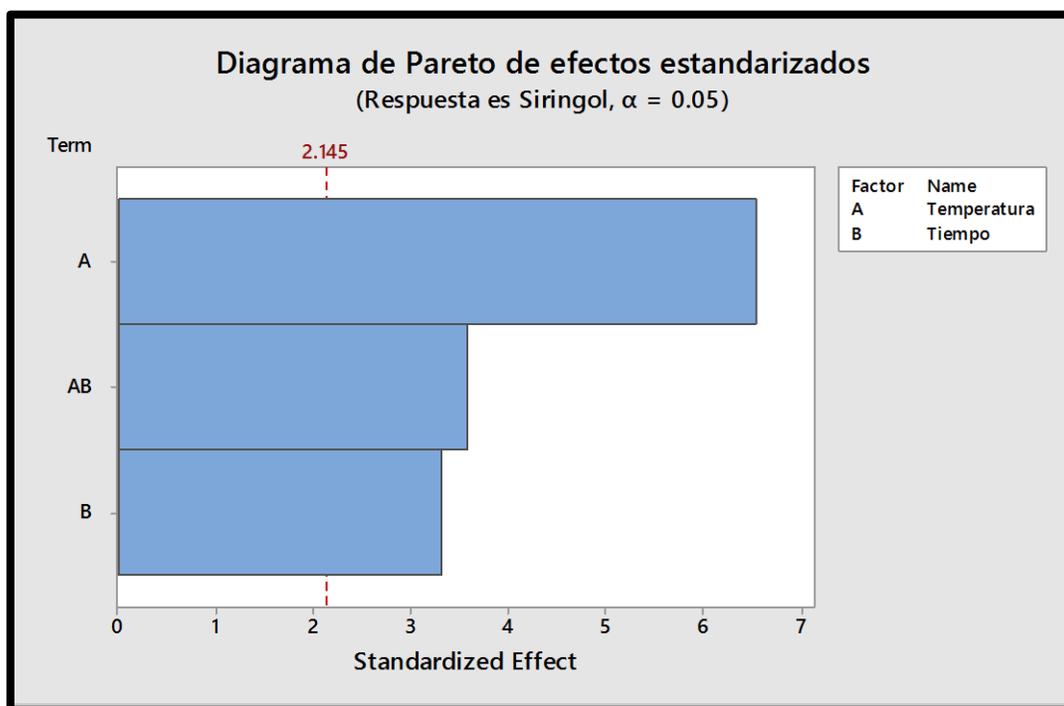


Figura 3.63 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de la temperatura y tiempo en la respuesta de Siringol

En los tres diagramas de Pareto se aprecia una ventaja considerable de la temperatura (Factor A) con respecto al tiempo (Factor B) y la combinación de ambos (Factor AB). Por lo tanto, la temperatura es la principal variable independiente que tiene una influencia importante sobre los valores de concentración del fenol, guayacol y siringol. Si se observa la Tabla 3.13, las concentraciones de los compuestos fenólicos obtenidos son mayores a la temperatura de 225 °C, por lo que significa que el resultado del diagrama de Pareto concuerda con los valores de concentración obtenidos a la temperatura más alta con la que se trabajó. Otra forma de comprobar la influencia de la temperatura es mediante la elaboración de futuros experimentos con variaciones en la temperatura y la observación en el GC-MS de los resultados de concentración de compuestos fenólicos.

En el mismo software de estadística Minitab, a través del diseño de experimentos y el análisis e interpretación factorial, se ajustó el diseño a un modelo lineal y se obtuvieron ecuaciones en base a la temperatura y el tiempo para resolverse y conocer la respuesta, la cual es el valor de la concentración de cada compuesto fenólico de acuerdo a su correspondiente ecuación.

Las ecuaciones son el producto final del modelo matemático y se muestran a continuación. La ecuación 3.4 da como resultado la concentración del fenol, la ecuación 3.5 corresponde a la concentración de guayacol, y la ecuación 3.6 presenta el valor de concentración de siringol.

$$\text{Fenol} = -854 + 4.97 \text{ Temperatura} + 4.43 \text{ Tiempo} - 0.0256 \text{ Temperatura*Tiempo}$$

.....Ecuación 3.4

$$\text{Guayacol} = -224 + 1.308 \text{ Temperatura} + 0.93 \text{ Tiempo} - 0.00542 \text{ Temperatura*Tiempo}$$

.....Ecuación 3.5

$$\text{Siringol} = -577 + 3.461 \text{ Temperatura} + 4.00 \text{ Tiempo} - 0.02389 \text{ Temperatura*Tiempo}$$

.....Ecuación 3.6

Con el modelo matemático se logró conocer a la variable independiente con mayor influencia sobre el resultado buscado de la concentración de los compuestos fenólicos, y también se logró corroborar la veracidad y eficacia del diseño de experimentos propuesto en este proyecto de investigación bajo un respaldo estadístico realizado en un software específico para este fin.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

La lignina es un biopolímero que forma parte de la biomasa lignocelulósica, y cuya aplicación se encuentra limitada en la actualidad debido a que aún se considera como un material de baja importancia en comparación con los otros componentes de la biomasa lignocelulósica, que son la celulosa y la hemicelulosa; y así mismo, al poco conocimiento que se tiene sobre su potencial uso para la obtención de productos de valor agregado, como los polímeros biodegradables y los compuestos fenólicos que se usan como aditivos en la industria química y, en especial, en la producción de biocombustibles.

Un proceso de biorefinería a escala laboratorio fue llevado a cabo para desarrollar un método eficiente de obtención y purificación de lignina, así como su posterior fragmentación y finalmente la purificación y separación de compuestos fenólicos. A partir de este proceso, se corroboró que los residuos de café (*Coffea arabica*) tienen factibilidad para ser utilizados en el proceso de biorefinería basada en biomasa lignocelulósica dentro de un marco sustentable y ecológico, ya que de esta manera, disminuirá el desecho de estos residuos y se les dará un reaprovechamiento para obtener la lignina, la cual a su vez, funciona como materia prima para la fabricación de productos de valor agregado.

La eficiencia de la etapa de la obtención de la lignina a través del método de reacción de pulpeo alcalino demostró ser la adecuada según el porcentaje de rendimiento de lignina obtenido a partir de los residuos del café, el cual fue de 22.5 %, y este valor se encuentra dentro del rango óptimo de concentración de lignina presente en la biomasa lignocelulósica (15 - 25 %). La metodología de determinación de humedad de la muestra de residuos de café en base a TAPPI también resultó ser la ideal para la obtención de un adecuado rendimiento de lignina y las condiciones de temperatura y tiempo de la reacción de pulpeo alcalino (125 °C y 60 min) son consideradas dentro del estándar para evitar gastos excesivos de energía y altos costos.

El método utilizado para la etapa de fragmentación de la lignina fue la hidrólisis térmica alcalina, y las condiciones de temperatura utilizadas de acuerdo al diseño de experimentos establecido, fueron de 160, 200 y 225 °C, resultando éstas mucho menores que las reportadas en la literatura, las cuales oscilan en un rango de 300 – 450 °C. Hablando de términos exclusivos de ahorro de energía y costos, se cumplió con el objetivo al reducir la temperatura de reacción. Sin embargo, se tendría que hacer, como siguiente paso, una comparación de la concentración de compuestos fenólicos obtenidos a todas las condiciones de temperatura mencionadas anteriormente, desde 160 °C a 450 °C, y así determinar si a mayor o menor temperatura se obtiene mayor concentración de fenólicos.

El método de hidrólisis térmica alcalina para la fragmentación de la lignina ocasionó la aparición de otros subproductos además del aceite con los compuestos fenólicos: las cenizas y la lignina residual. Las cenizas formaron debido a la alta temperatura con la que se trabajó la reacción. Afortunadamente, el promedio de porcentaje de rendimiento de las cenizas se mantuvo en un rango de 5 a 16 %, siendo estos valores considerados como bajos y es un indicativo que se cumplió con el objetivo de obtener la menor cantidad de rendimiento de cenizas posible, puesto que es un subproducto no deseado. Un punto importante es que la temperatura no tuvo una influencia considerable en la variación de la cantidad de cenizas, y en términos generales el tiempo tampoco, ya que los valores se mantuvieron en el rango aceptable para considerarlo como bajo y no hubo una variación drástica, tal como se comprobó en el modelo estadístico del diagrama de Pareto, cuyas barras de las variables fueron semejantes entre sí.

Para el caso de la lignina residual, su porcentaje de rendimiento fue alto para los experimentos realizados a un tiempo de 60 min, obteniendo en promedio de 59 a 63 %. Esta condición ya se esperaba, debido a que se tienen reportes que el uso de una base para el proceso de fragmentación de lignina (en este caso el NaOH) favorece la aparición de alta cantidad de lignina residual. Esta es la lignina que no se alcanzó a fragmentar; sin embargo, la temperatura no mostró influencia en el rendimiento, ya que se mantuvo en un rango similar. Donde sí hubo una variación considerable fue al subir el tiempo de reacción a 120 min, ya que disminuyó el

porcentaje de rendimiento promedio. En el modelo estadístico del diagrama de Pareto fue corroborada la influencia predominante del tiempo en comparación con la temperatura. Una propuesta es la elaboración de un posterior análisis a tiempos de reacción mayores para determinar si sigue la tendencia de disminución de la lignina residual y así comparar con el rendimiento de aceite fenólico obtenido a estas condiciones.

Con respecto a los 15 gr de lignina iniciales, la lignina que sí se fragmentó a 60 min representa el rango de 37 – 41 %, mientras que a 120 min representa un rango de 60 – 83 %, por lo que a esta última condición del tiempo más alto, se obtuvo un mayor porcentaje de fragmentación de lignina, y de este valor fue donde se extrajo el aceite fenólico.

El aceite fenólico es donde se ubican los compuestos fenólicos de interés y por ende es el subproducto principal. Al analizar los rendimientos en todas las muestras se encontró que el mayor porcentaje de rendimiento fue de 44.85 % a 200 °C y 60 min. Por lo tanto, se recomienda trabajar a estas condiciones para obtener el mayor porcentaje de rendimiento de aceite fenólico.

En el análisis de la caracterización por Espectroscopía FTIR, los grupos funcionales encontrados en el análisis del espectro de la lignina obtenida coinciden con los correspondientes a la estructura de la lignina, por lo que efectivamente el proceso de obtención de lignina mediante el método de pulpeo alcalino resultó favorable. Estos grupos funcionales son principalmente el –OH indicador de fenoles mediante la banda ancha en un rango de 3000-3500 cm^{-1} , los enlaces C-H representativos de grupos metilo y metilenos presentes a 2845-2900 cm^{-1} en los sustituyentes del anillo fenólico o en la cola propanoide del esqueleto del fenilpropano de los monómeros precursores de la lignina. Las vibraciones de C=O y C=C del anillo aromático presente de forma obligatoria en la estructura de origen fenólico de la lignina también se localizaron en un rango de 1550-1650 cm^{-1} .

Los análisis de los espectros FTIR de las muestras de aceite fenólico a las diferentes condiciones de temperatura y tiempo, demostraron la presencia de grupos funcionales

relacionados con la lignina y su estructura tanto polimerizada como no polimerizada (monómeros y oligómeros). La banda principal representativa de la estructura de origen fenólico a $3000-3500\text{ cm}^{-1}$ está presente, así como los enlaces C-H de metilo y metilenos en los sustituyentes del anillo fenólico, y los enlaces C=O y C-O del anillo y de los mismos sustituyentes. Cabe mencionar que debido a que el aceite fenólico es una mezcla de diversos compuestos químicos, esta caracterización muestra una identificación de los grupos funcionales en general de toda la mezcla, pero los grupos funcionales encontrados son similares a los relacionados con la lignina.

Finalmente, en la caracterización de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, el objetivo fue la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos que son de interés debido a que se ha reportado que son los más comunes que se presentan al fragmentar la lignina: fenol, m-cresol, catecol, guayacol, catecol, 4-metilcatecol y siringol. La identificación del fenol, siringol, guayacol y catecol se logró realizar mediante el análisis de los cromatogramas seleccionados de las muestras a todas las condiciones de temperatura y tiempo de reacción. En la muestra a 225 °C y 60 min se obtuvo la mayor concentración de los compuestos fenólicos y se encontraron 3 de ellos (fenol, guayacol y siringol) por lo que hablando estrictamente de términos de obtención de concentración y tipos de compuestos fenólicos, se recomienda trabajar a 225 °C y 60 min .

Una vez demostrado lo anterior, se cumplió con el objetivo de la obtención de los compuestos fenólicos de interés a partir de la reacción propuesta de fragmentación de la lignina obtenida a partir de los residuos del café arábigo. Sin embargo, al llevarse a cabo la cuantificación de estos compuestos en base a los resultados arrojados por el software del equipo y la curva de calibración, los compuestos fenólicos se obtuvieron en cantidades muy pequeñas (mg/L o ppm). El fenol fue el compuesto químico que se obtuvo en mayor cantidad en todas las muestras donde se identificó su presencia. Esto significa que la fragmentación de la lignina fue exitosa al romper su estructura en el monómero más pequeño (de menor peso molecular y estructura más sencilla), en este caso el fenol. Cabe mencionar que la estructura simple del fenol facilita la fragmentación, ya que no cuenta con tantos sustituyentes que dificultan el

rompimiento de enlaces. Otras estructuras de origen fenólico de un mayor tamaño fueron identificadas, incluyendo la vainillina, el cual es un importante aditivo alimenticio y precursor de la vainilla sintética.

El modelo matemático realizado en el software Minitab concluyó que la temperatura tiene mucha relevancia en la obtención y cuantificación de los compuestos fenólicos, y las ecuaciones concuerdan con la concentración de cada compuesto fenólico principal: fenol, guayacol y siringol.

Hay que continuar realizando estudios para maximizar la obtención de los compuestos fenólicos y hacer aún más eficiente y óptimo el método presentado para favorecer más la fragmentación de los oligómeros y para que en un futuro se lleve a escala piloto y escala industrial, y así se logren extraer los compuestos fenólicos a través de una biorefinería integral, sustentable y con el uso de una materia prima natural, ecológica y renovable. Pero sin duda, este trabajo marcó un precedente y una base experimental y teórica para dar el primer paso hacia el aprovechamiento de los recursos naturales para crear productos de valor agregado que podrán reemplazar a los productos derivados del petróleo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Barroso, C; Molleda, C; Santos, S (2010). “Pre-tratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería” Universidad Politécnica de Madrid, págs 3-4.
- [2] Clark, H (2007). “Green chemistry for the second generation biorefinery: Sustainable chemical manufacturing based on biomass” J.Chem.Technol.Biotechnol. 82:603-607
- [3] Tejado, A; Peña, C; Labidi, J; Echeverría, J.M; Mondragon, I (2007). “Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol–formaldehyde resin synthesis” Bioresource Technology 98: 1655–1663.
- [4] Hatakeyama, H; Hatakeyama, T (2010). “Lignin Structure, Properties and Applications” Adv Polym Sci 232: 1-63.
- [5] Zhang, Ai-Ping; Liu, Chuan-Fu; Sun, Run-Cang; Xie, Jun (2013). “Extraction, Purification and Characterization of Lignin Fractions from Sugarcane Bagasse” BioResources 8(2): 1604-1614.
- [6] Carlos, José Martín (2015). “Obtención, purificación y caracterización de la lignina proveniente de procesos de biorrefinería” Tesis de Maestría, Universidad Michoacana de San Miguel de Hidalgo.
- [7] González, M; García, A; Toledano, A; Llano-Ponte, R; de Andrés, M.A; Labidi, J (2009). “Lignocellulosic feedstock biorefinery processes: Analysis and design” Chemical Engineering Transactions 17: 1107-1112.
- [8] Gil, D (2009). “El futuro de los biocombustibles: biorrefinerías integradas” Universidad de Valladolid, págs. 7-20.
- [9] Del Prado, G.M (2008). “Biorrefinerías: situación actual y perspectivas a futuro” GENOMA España, Energético e Industrial, págs. 78-85, 100-112.
- [10] Sádaba, S.I (2012). “Catalizadores para biorrefinería: Obtención de furfural y su transformación a productora de condensación aldólica” Memoria para aspirar al grado de Doctor, Catálisis y Petróquímica, Madrid, págs 11-28.

- [11] Kukk, L; Roostalu, H; Suuster, E; Rossner, H; Astover, A (2011). “Reed canary grass biomass yield and energy use efficiency in Northern European climatic conditions” Biomass and Bioenergy 50: 407-416.
- [12] Ruzene, D.S; Silva, D.P; Vicente, A.A; Goncalves, A.R; Teixeira, J.A (2008). “An alternative application to the portuguese agro-industrial residue: Wheat straw” Appl Biochem Biotechnol 147: 85-96.
- [13] Le Digabel, F; Averous, L (2006). “Effects of lignin content on the properties of lignocellulose-based biocomposites” Carbohydrate Polymers 66: 537–545.
- [14] Zhang, Y.P; Ding, S; Mielenz, J.R; Cui, J; Elander, R.T; Laser, M; Himmerl, M.E; McMillan, J.R; Lynd, L.R (2007). “Fractionating Recalcitrant Lignocellulose at Modest Reaction Conditions” Biotechnol Bioeng 97(2): 214-223.
- [15] Sun, Y; Cheng, J (2002). “Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review” Bioresource Technology 83: 1-11.
- [16] Moreno, H; Zamudio, M.A.M; De Alva, H; Morales, A.B (2015). “Separación de lignina aplicando procesos de biorefinería en la deslignificación de material lignocelulósico” Memoria del 7º Congreso Internacional de la Academia Mexicana Multidisciplinaria “Ciencia, Tecnología e Innovación en Movimiento” Universidad Autónoma de Tamaulipas.
- [17] Pacheco, M.E; Pimentel, J.P; Roque, W.F (2010). “Cinética de la bioadsorción de iones cadmio (II) y plomo (II) de soluciones acuosas por biomasa residual de café” Rev Soc Quim Perú 76(3): 32-34.
- [18] Silvarolla, M.B; Mazzafera, P; Fazuoli, L.C (2004). “A naturally decaffeinated arabica coffee”. Nature 429 (6994): 826.
- [19] Laurichesse, S; Avérous, L (2014). “Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers” Progress in Polymer Science 39: 1266-1290.
- [20] Sanders, J; Maarten, P.M; Kootstra, J; Beftink, H.H; Scott, E.L (2007). “Comparison of dilute material and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw” Biochemical Engineering 46: 126-131.
- [21] Zheng, Y; Pan, Z; Zhang, R. (2009). “Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production” Int J Agric & Biol Eng 2(3): 51-68.

-
- [22] Toledano, A (2012). "Lignin Extraction, Purification and Depolymerization Study" Tesis de Doctorado, Escuela Politécnica de San Sebastián, España.
- [23] García, Juan Rafael (2014). "Biorrefinería de Tule (*Typha Dominguensis*) Autohidrólisis para obtención de furfural-resina furánica: Celulosa-Papel" Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico de Ciudad Madero.
- [24] Toledano, A; Serrano, L; Labidi, J (2012). "Organosolv lignin depolymerization with different base catalysts" J Chem Technol Biotechnol 87: 1593–1599.
- [25] Lima, D.U; Oliveira, R.C; Buckeridge, M.S (2003). "Seed storage hemicelluloses as wet-end additives in papermaking" Carbohydrates Polymers 52: 367-373.
- [26] Tiwari, A; Srivastava, R.B (2012). "Biotechnology in Biopolymers: Developments, Applications and Challenging Areas" Editorial Smithers-Rapra, págs 124-127, 135, 139-140.
- [27] Gosselink, R; Teunissen, W; van Dam, J; de Jong, E; Gellerstedt, G; Scott, E.L; Sanders, J (2012). "Lignin depolymerization in supercritical carbon dioxide/acetone/water fluid for the production of aromatic chemicals" Bioresource Technology 106: 173–177.
- [28] Chávez-Sifontes; M; Domine, M.E (2013). "Lignina, estructura y aplicaciones: Métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial" Av. Cien. Ing 4(4): 15-46.
- [29] Dewick, P.M (2002). "Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach" 2ª edición, Editorial John Wiley & Sons, pág 133.
- [30] Novo-Uzal, E; Pomar, F; Gomez, L.V; Espiñeira, J.M; Ros, A (2012). "Evolutionary History of Lignins" Advances in Botanical Research 61: 312-341.
- [31] Toledano, A; García, A; Mondragón, I; Labidi, J (2010) "Lignin separation and fractionation by ultrafiltration" Separation and Purification Technology 71: 38–43.
- [32] El Mansouri, N.E (2007). "Despolimerización de lignina para su aprovechamiento en adhesivos para producir tableros de partículas" Tesis de Doctorado, Universidad Rovira i Virgili, Italia.
- [33] Vanholme, R; Morreel, K; Ralph, J; Boerjan, W (2008). "Lignin engineering" Current Opinion in Plant Biology 11: 278–285.
- [34] Roberts, V.M; Stein, V; Reiner, T; Lemonidou, A; Li, X; Lercher, J.A (2011). "Towards Quantitative Catalytic Lignin Depolymerization" Chem. Eur. J. 17: 5939-5948.
-

- [35] TAPPI (2015) Numerical Listing of TAPPI Standards. TAPPI: The leading association for the worldwide pulp, paper, packaging and converting industries. <http://www.tappi.org>
- [36] Pavia, D.L; Lampman, G.M; Kriz, G.S (2001). "Introduction to Spectroscopy" 3a edición, Editorial Thomson Learning, USA, págs 56-60.
- [37] Khoddami, A; Wilkes, M.A; Roberts, T (2013). "Techniques for Analysis of Phenolic Compounds" Molecules 18: 2328-2375.
- [38] Esquivel, D; López, V; Rodríguez, J; Alemán, G; Cuéllar, S; Rostro, M; Parra, R (2016). "Supercritical Carbon Dioxide and Microwave-Assisted Extraction of Functional Lipophilic Compounds from *Arthrospira platensis*" Int. J. Mol. Sci 17: 658.
- [39] Constant, S; Robitzer, M; Quignard, F; Di Renzo, F (2012). "Vanillin oligomerization as a model of side reactions in lignin fragmentation" Catalysis Today 189: 123-128.
- [40] Bradley, N (2007) "The Response Surface Methodology" Tesis de Maestría, Universidad de South Bend, Indiana, EUA.