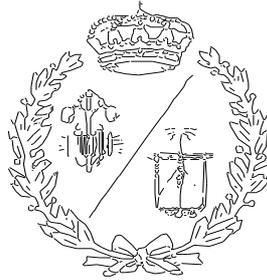


**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS  
INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN**

**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**



***Proyecto Fin de Carrera***

**Detoxicación del licor gastado al  
sulfito ácido mediante intercambio  
iónico y adsorción**  
(Detoxification of acid sulfite spent liquor by  
means of ionic exchange and adsorption)

Para acceder al Título de

**INGENIERO TÉCNICO INDUSTRIAL  
ESPECIALIDAD EN QUÍMICA INDUSTRIAL**

Autor: Laura Ulloa Guntiñas

Septiembre - 2014



## Agradecimientos

Al director de este proyecto, Alberto Coz, por haberme dado la oportunidad de conocer en primera persona lo que es trabajar en un laboratorio de investigación. Muchísimas gracias por todo!

A Natalia Quijorna, la codirectora del proyecto. Contigo queda claro que se puede ser jefa, codirectora y amiga en la misma persona.

A mis compañeros de Sniace: Alicia, Ana, Bea, Cris, Eli, Javi, Tamara, Patricia y Pedro. Gracias por toda la ayuda que me habéis prestado tanto dentro como fuera del laboratorio, y por todos los buenos ratos que hemos pasados juntos. Ha sido un placer trabajar con vosotros.

Se despide, una ligno-looser muy feliz ☺

Laura Ulloa Guntiñas

Santander, Septiembre de 2014

"O verdadeiro heroísmo está en transformar os desexos en realidades e as ideas en feitos"

Alfonso Rodríguez Castelao

# Índice

<b>1. Introducción</b> .....	<b>7</b>
1.1. Biomasa lignocelulósica. Composición.....	7
1.2. Biorrefinería .....	8
1.2.1. Procesos implicados .....	9
1.2.1.1. Fabricación de pasta de papel.....	9
1.2.1.2. Producción de bioetanol .....	10
1.2.2. Inhibidores e importancia de la detoxificación .....	13
1.2.2.1. Inhibidores: origen y naturaleza.....	13
1.3. Procesos de detoxificación .....	15
1.3.1. Intercambio iónico.....	22
1.3.2. Adsorción .....	22
1.4. Marco y objetivos .....	23
1.4.1. Marco del proyecto .....	23
1.4.2. Objetivos .....	24
<b>2. Metodología experimental</b> .....	<b>26</b>
2.1. Muestras .....	26
2.2. Procedimientos de detoxificación. ....	27
2.2.1. Intercambio iónico.....	27
2.2.1.1. Procedimiento experimental .....	28
2.2.1.2. Regeneración de la resina.....	29
2.2.1.3. Condiciones experimentales.....	30
2.2.1. Adsorción .....	31
2.2.1.1. Muestras.....	31
2.2.1.2. Características de los adsorbentes .....	32
2.2.1.3. Procedimiento experimental.....	33
2.2.1.4. Condiciones experimentales .....	35
2.3. Caracterización. Métodos analíticos.....	36
2.3.1. Determinación de % de lignosulfonatos, OH fenólicos .....	36
2.3.2. Medida de azúcares en cromatografía líquida de alta resolución .....	38
2.3.4. Determinación de metales mediante Absorción Atómica .....	40
<b>3. Resultados</b> .....	<b>44</b>

3.1. Licor gastado .....	44
3.2. Intercambio iónico.....	44
3.2.1. Resina catiónica Dowex®.....	45
3.2.1.1. Efectividad del tratamiento con el tiempo .....	45
3.2.2. Resina aniónica Amberlite® .....	49
3.2.2.1. Efectividad del tratamiento con el tiempo .....	49
3.2.3. Combinación de resinas en serie .....	52
3.3. Adsorción .....	55
3.3.1. Licor neutralizado.....	55
3.3.2. Carbón Activo .....	56
3.3.2.1. Efectividad del tratamiento con el tiempo .....	56
3.3.3. Negro de Humo.....	60
3.3.3.1. Efectividad del tratamiento con el tiempo .....	60
3.3. Comparación de resultados .....	63
3.3.1. Comparación entre resinas catiónica y aniónica. ....	63
3.3.2. Comparación entre adsorbentes .....	65
3.3.3. Comparación entre técnicas .....	67
<b>4. Conclusiones .....</b>	<b>71</b>
<b>5. Bibliografía .....</b>	<b>74</b>



# 1. Introducción

---

# 1. Introducción

---

## 1.1. Biomasa lignocelulósica. Composición.

La *biomasa* es la materia orgánica originada en un proceso biológico derivado de organismos vivos, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía. (RAE, 2014)

La *biomasa vegetal* representa la principal fuente de materiales renovables de la Tierra, y tiene por tanto un gran potencial como materia prima para la producción de celulosa, bioenergía y otros productos de interés industrial. La biomasa vegetal, y en particular los materiales lignocelulósicos, están disponibles en grandes cantidades y a bajo coste, como cultivos o residuos agroforestales, y podrían ser una fuente barata de biocombustibles y bioproductos como alternativa a los combustibles fósiles. (Prinsen, 2013)

Los *materiales lignocelulósicos*, compuestos principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, son las materias primas más abundantes en la Tierra. La hemicelulosa es la segunda parte más importante de la pared celular de las plantas después de la celulosa y es un potencial sustrato para la producción de bioetanol y/o productos de alto valor añadido. En las plantas, la pared celular varía su contenido de celulosa entre un 40-80%, hemicelulosa entre 10-40% y lignina entre 5-25%. Después de un pretratamiento con ácido, álcali, y/o enzimas (hemicelulasas/celulasas), la fracción de carbohidratos de la pared celular de la planta puede convertirse en monómeros de azúcar fermentables, los cuales pueden convertirse por procesos de fermentación microbiana en productos como etanol, xilitol o 2,3-butanodiol, etc. (Chandel, 2012).

La principal fuente de celulosa la constituyen los cultivos forestales madereros que se utilizan principalmente para la producción de pasta y papel. Para la obtención de productos químicos a partir de celulosa, por ejemplo el bioetanol, las características físicas no influyen en el producto final, pero sí pueden influir en la resistencia a la deconstrucción química de la matriz lignocelulósica. Los cultivos madereros de crecimiento rápido, tales

como el eucalipto, chopo, abedul y álamo, son atractivos para la obtención de bioetanol, y también una amplia gama de otros productos químicos derivados, tanto de los carbohidratos (celulosa y hemicelulosas) como de la lignina. Los cultivos agrícolas constituyen una excelente materia prima alternativa a los cultivos forestales para la obtención de celulosa. (Prinsen, 2013)

En las dos últimas décadas se han realizado amplios trabajos para desarrollar procesos alternativos para la utilización integral y reevaluación de biomasa vegetal. Los árboles de hoja caduca, en particular el ***Eucaliptus globulus***, han demostrado ser de particular interés, por su rápido crecimiento así como la excelente calidad de la pulpa de madera que se puede obtener. De la pulpa de madera obtenida, solamente se utiliza la fracción de celulosa para la fabricación de papel, mientras que, generalmente, las fracciones de lignina y de hemicelulosa se queman para producir calor o se vierten.

Este proceso podría llevarse a cabo de una forma más rentable fraccionando el material procedente de la madera en diferentes compuestos y utilizándolas de forma separada en otros procesos. (Converti et al., 2000)

## 1.2. Biorrefinería

Dado el declive de las fuentes de combustibles fósiles, la biomasa forestal está reconocida en el mundo como la mayor fuente potencial de energía renovable. Su aprovechamiento completo (y no sólo de fracciones azucaradas o amiláceas para la obtención de etanol vía fermentación, si no también las fibrosas para pasta celulósica o combustión competitiva, o de fracciones residuales, etc.) permitiría, además, la disposición de una gran 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. (López et al., 2010)

Mucho antes de la introducción del concepto de biorrefinería, los materiales lignocelulósicos ya se utilizaban para la producción de papel. El

papel es un producto de biorrefinería, en el sentido de que su producción consiste básicamente en la separación de fibras de celulosa de la matriz lignocelulósica, a través de procesos mecánicos y/o químicos. El concepto de biorrefinería consiste en la producción de biomateriales y bioenergía a partir de materiales renovables, como son los materiales lignocelulósicos. Este concepto no sólo tiene por objeto el fraccionamiento de la matriz lignocelulósica, si no también aumentar la sostenibilidad tanto a nivel de uso de los recursos naturales y a nivel técnico-económico, como a nivel medioambiental.

Los constituyentes principales de los materiales lignocelulósicos, celulosa, hemicelulosas y lignina, son en teoría, susceptibles de separación en un esquema de fraccionamiento integral, similar al de la refinería de petróleo. El alto grado de entrecruzamiento entre los constituyentes es una de las principales barreras de la matriz lignocelulósica a su degradación como por su insolubilidad en la mayoría de los disolventes. Tanto la eficiencia del fraccionamiento de los materiales lignocelulósicos, como el valor añadido de los productos obtenidos o derivados de ellos juegan un papel esencial en el éxito industrial de los procesos de biorrefinería. Actualmente, los principales procesos de biorrefinería de materiales lignocelulósicos son la producción de celulosa y producción de bioetanol. Los residuos de lignina de estos procesos también son susceptibles del aprovechamiento, por ejemplo, la fracción de la lignina resultante de la obtención de la celulosa, también se puede aprovechar mediante la obtención de lignina aislada para aplicaciones como biocombustible sólido y como polímero en biomateriales, y mediante la conversión de lignina a compuestos químicos primarios. (Prinsen, 2013, Ahmed et al., 2014)

### **1.2.1. Procesos implicados**

#### **1.2.1.1. Fabricación de pasta de papel**

La fabricación de pasta de papel consiste en la separación de las fibras de celulosa de la matriz lignocelulósica a través de procesos mecánicos y/o químicos. El contenido, la composición y la estructura química de la lignina son parámetros importantes en la producción de pasta

de celulosa, ya que influyen en el consumo de reactivos y en la calidad y el rendimiento final de la pasta.

- Procesos mecánicos

El pasteado mecánico separa las fibras por fragmentación mecánica, utilizando molinos y refinadores de discos, lo que supone un considerable gasto energético. La acción de las máquinas rompe las fibras de celulosa, por lo que la pasta resultante es más débil que la obtenida químicamente. La lignina no se disuelve, simplemente se ablanda, permitiendo que las fibras se asienten fuera de la estructura de la madera. Es un proceso que ofrece un rendimiento muy alto, obteniéndose pastas que resultan ventajosas para algunos tipos de papel, ya que confieren rigidez, volumen y opacidad. No obstante, el alto contenido de lignina en la pasta limita la calidad del papel ya que las fibras son poco flexibles, no están bien unidas entre sí y el papel es poco resistente y tiende a amarillear.

- Procesos químicos

La acción de los procesos químicos se basa en la disolución (parcial) de la lignina y de las hemicelulosas. En general durante el pasteado químico, los enlaces éter tipo alquil-aril se empobrecen en la lignina, los enlaces condensados se enriquecen, y se pueden formar nuevos enlaces entre lignina y carbohidratos. Existen varios procesos, el proceso al sulfito, proceso kraft, proceso a la sosa y proceso organosolv. En este trabajo, el licor gastado procede de un proceso al sulfito ácido, el cual emplea los reactivos una sal bisulfítica de calcio y magnesio formada a partir de  $\text{SO}_2$  gas y dolomita,. La lignina disuelta en el licor gastado se recuperan en forma de lignosulfonatos.

#### 1.2.1.2. Producción de bioetanol

Los biocombustibles poseen un gran interés industrial, ya que gran parte de los recursos energéticos fósiles se destina a los carburantes para transporte. Actualmente, los biocombustibles líquidos se producen principalmente a partir de cultivos oleaginosos (biodiesel), y de cultivos ricos

en azúcares y almidón (bioetanol), siendo considerados biocombustibles de primera generación.

En la figura 1.1. se muestra un diagrama donde se recogen las principales fuentes de biomasa aptas para la producción de bioetanol de primera y de segunda generación. En cuanto a los primeros, los cultivos destinados son la caña de azúcar y el maíz. El que los biocombustibles provengan de este tipo de cultivos, presenta el inconveniente de competir con los destinados a la producción de productos alimenticios, tanto a nivel económico como de uso de los recursos naturales necesarios para su cultivo. Por este motivo, se están investigando materiales lignocelulósicos, tanto de origen forestal como agrícola, ya que no compiten en el mercado alimenticio para la producción de biocombustibles de segunda generación y hasta tercera generación, debido a que en su mayoría provienen de residuos de origen agrícola, forestal o urbano.

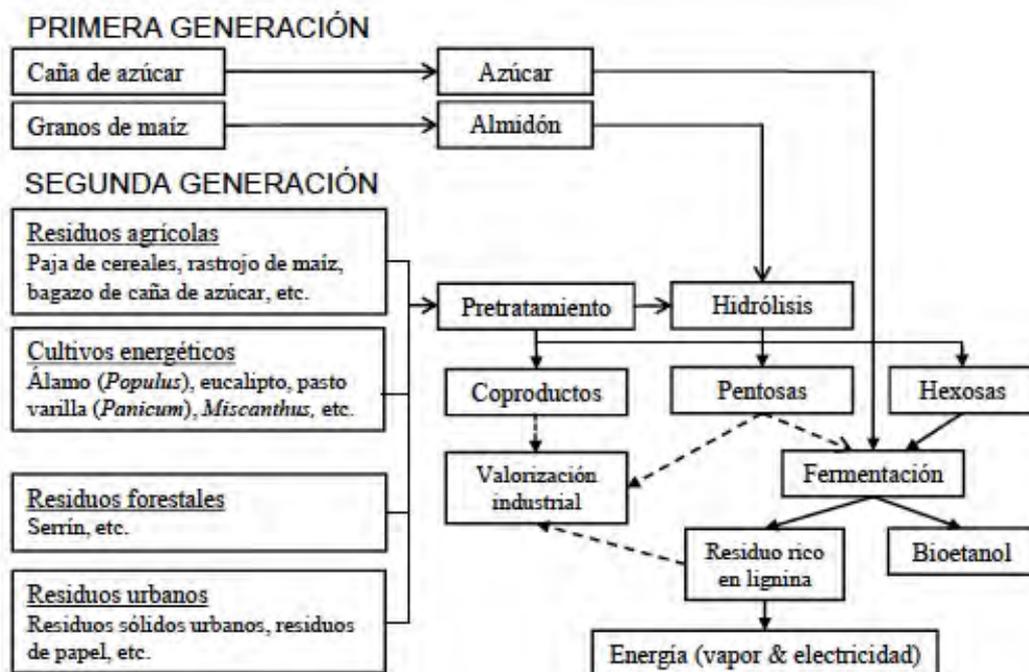


Figura 1.1. Las principales fuentes de biomasa aptas para la producción de bioetanol de primera y de segunda generación (Prinsen, 2013)

Los residuos lignocelulósicos, en particular los residuos agrícolas, también son de gran interés para la producción de bioetanol de segunda

generación. Entre ellos, la paja de trigo es uno de los más interesantes por su bajo coste, disponibilidad y abundancia durante todo el año.

El bioetanol se obtiene por hidrólisis de los carbohidratos, seguida de fermentación de los monosacáridos obtenidos. Los factores principales que afectan el rendimiento de la hidrólisis son el contenido y estructura de la lignina y de las hemicelulosas, la cristalinidad de la celulosa, y la porosidad y el área específica de la materia lignocelulósica. La lignina es un polímero recalcitrante que limita el acceso de reactivos y enzimas usados durante la hidrólisis, y a partir del cual se pueden formar inhibidores que influyen negativamente en el rendimiento de fermentación. Por este motivo, es necesario aplicar pretratamientos que eliminen parcialmente la lignina o que modifiquen su estructura.

- Pretratamientos del material lignocelulósico

La función principal de los pretratamientos utilizados en la biorrefinería es reducir el tamaño de las partículas de los materiales lignocelulósicos para reducir los gastos energéticos en los posteriores procesos. Entre los distintos pretratamientos existentes, se puede distinguir entre mecánicos, químicos, físico-químicos y biológicos. (Prinsen, 2013)

- Hidrólisis y fermentación

En la hidrólisis de los carbohidratos, destinados a la producción de bioetanol, se persigue obtener el mayor rendimiento posible de celobiosa y monosacáridos (unidades de carbohidrato con un grupo reductor) como la glucosa, xilosa, xilitol, arabinosa, galactosa, etc. La hidrólisis ácida es actualmente el proceso más utilizado a nivel industrial, y frecuentemente se lleva a cabo de forma simultánea a la fermentación para reducir costes. La hidrólisis ácida, sin embargo, conlleva un determinado nivel de corrosión en los reactores y está asociada con la generación de inhibidores que influyen negativamente en el rendimiento de la fermentación. Por este motivo, se han desarrollado procesos de hidrólisis enzimática, basados en mezclas de celulasas y  $\beta$ -glucosidasas que, sin embargo, están limitados por su alto coste y por la resistencia de la matriz lignocelulósica, debido al carácter

recalcitrante de la lignina. Además, para obtener un alto rendimiento de la hidrólisis a partir de los xilanos, se requiere una mezcla de diferentes enzimas.

La conversión a bioetanol se lleva cabo por fermentación a partir de los monosacáridos. El bioetanol es uno de los principales productos de biorrefinería obtenidos por fermentación, mediante el uso de colonias apropiadas de levaduras o bacterias. Después de la fermentación, el etanol se concentra y se purifica mediante destilación (Prinsen, 2013)

### **1.2.2. Inhibidores e importancia de la detoxificación**

El proceso de fabricación de etanol requiere la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica para generar monómeros de azúcar para la etapa de fermentación. La hidrólisis de la lignocelulosa se lleva a cabo normalmente a partir de un pretratamiento ácido, el cual primeramente resulta en la hidrólisis de la hemicelulosa, seguido de la hidrólisis de la celulosa restante. La hidrólisis de la celulosa puede ser química o enzimática. La liberación de azúcares monoméricos durante el pretratamiento se acompaña con la generación de inhibidores de la fermentación de microorganismos, los cuales afectan fuertemente al rendimiento de la fermentación. Por tanto, es necesario utilizar un microorganismo que tolere los inhibidores en el paso de fermentación (Almeida et al., 2007).

#### **1.2.2.1. Inhibidores: origen y naturaleza**

El objetivo del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica es separar lignina y hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa, y aumentar la porosidad de la lignocelulosa a la vez que minimizar la destrucción química de azúcares fermentables requeridos para la producción de etanol. Se han desarrollado diferentes procesos de pretratamientos para materiales lignocelulósicos, incluyendo métodos apropiados para uso industrial como ácidos diluidos, oxidación húmeda y explosión de vapor. El pretratamiento de la biomasa lignocelulósica con estos métodos genera un amplio rango de componentes. (Almeida 2007)

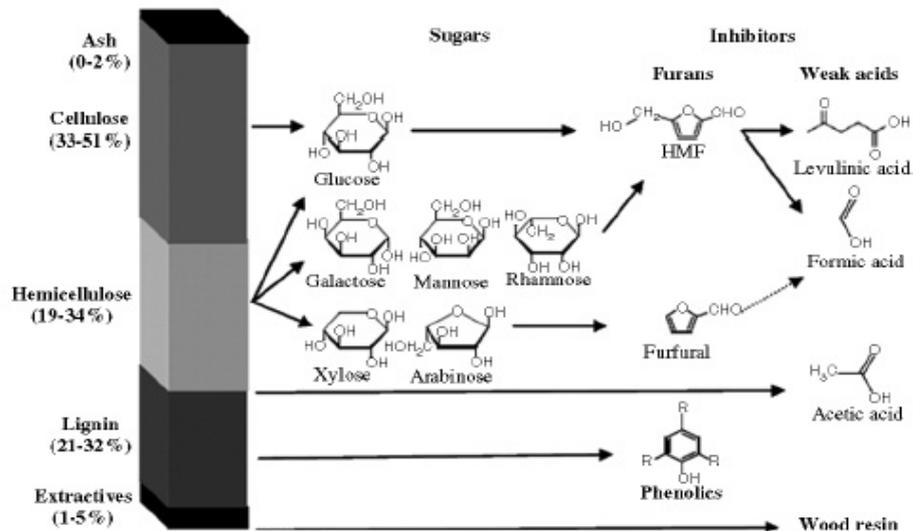


Figura 2.1. Composición media de la biomasa lignocelulósica y principales productos derivados de la hidrólisis (Almeida et al., 2007)

Los tratamientos de hidrólisis pueden resultar en posteriores degradaciones de la lignina y monosacáridos en tres grupos principales de componentes que inhiben los siguientes pasos de fermentación: *derivados de furano, ácidos débiles y compuestos fenólicos*. (Almeida et al., 2007). La fermentación de hidrolizados se ve dificultada por la formación de estos inhibidores durante la hidrólisis química, como por ejemplo furfural, hidroximetilfurfural (generado por la degradación de azúcares), ácido acético (liberado de los grupos acetilos de la materia prima), productos de la degradación de la lignina y compuestos derivados de los extractivos de madera (principalmente compuestos por componentes fenólicos y metanol), e inhibidores derivados de los metales o minerales en la madera, tierra o de los equipos de hidrólisis (Converti et al., 2000). La presencia de los inhibidores en el medio de fermentación lleva a una reducción del rendimiento del proceso de etanol. A consecuencia de esto, habrá que acondicionar el hidrolizado, lo que se conoce como *detoxificar* antes de la etapa de fermentación para eliminar los inhibidores y ajustar el pH a valores óptimos para la fermentación (Grzenia et al., 2012). Para minimizar estos efectos, se han desarrollado diversas tecnologías de detoxificación, las cuales se describen en el siguiente apartado.

### 1.3. Procesos de detoxificación

Existen diferentes estrategias de detoxificación que se pueden aplicar para remediar el efecto de los inhibidores en la fermentación. Estas técnicas pueden dividirse en tratamientos físicos (separación con membranas, evaporación), químicos (overliming, hidróxido de calcio, neutralización, resinas de intercambio iónico, adsorción y extracción líquido-líquido, biológicos (microbianos y enzimáticos), y detoxificación microbiana in situ. (Chandel, 2012). En la tabla 1.1 se muestran los principales procesos de detoxificación, junto con el objetivo que se consigue con cada uno y las referencias donde consultar dichos procesos. Además, en la tablas 1.2 se muestran los procesos con los inhibidores y su eliminación en el caso de procesos con SO<sub>2</sub> como el proceso al sulfito.

Tabla 1.1. Procesos de detoxificación (Basaras, 2013)

<b>Método</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Referencia</b>
Coagulación Floculación	Con los flóculos se absorben o combinan las sustancias que se desean eliminar	F. Edeline, 1990
Overliming	Precipita/ioniza algunos inhibidores consiguiendo un cambio en la toxicidad de los componentes	Nilvebrant et al., 2001 Van Zyl et al., 1998 Martínez et al., 2001
Oxidación avanzada	El efecto sobre el ácido acético depende del pH. Los microorganismos digieren Furfural e HMF	Taherzadeh et al., 1997
Adsorción con Carbón Activo	Alta capacidad de adsorción de compuestos sin afectar los niveles de azúcar en el hidrolizado	Parajó et al., 1997 Dominguez et al., 1996
Adosrción Carbón vegetal o tierra diatomeas	Mejores resultados que con carbón activo	Miyatuji et al., 2003 Ribeiro et al., 2001

Tabla 1.1. (continuación). Procesos de detoxificación (Basaras, 2013)

<b>Método</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Referencia</b>
Adsorción con Zeolitas	Eliminación de metales tóxicos, catalizador de reacciones de hidrólisis, adsorbente de materiales no deseados.	López et al., 2000
Adsorción con Lignina residual	Adsorbente en una extracción en fase sólida aprovechando sus propiedades hidrofóbicas	Björklund et al., 2002
Intercambio iónico	Eliminar los inhibidores derivados de la lignina, ácido acético y furfurales, que conduce a un hidrolizado que muestra una fermentación similar a la de un sustrato de modelo libre de inhibidores	Fernandes et al., 2012 Larsson et al., 1999 Nilvebrant et al., 2001 Van Zyl et al., 1991
Cromatografía	Quita inhibidores primero y luego separa azúcares con cromatografía. Gran pureza de los hidrolizados en un solo paso.	Heihonen J. et al., 2011
Evaporación	Puede eliminar compuestos volátiles de hidrolizados lignocelulósicos	Parajó et al., 1997 Larsson et al., 1999
Membranas	Mejoras significativas sobre el intercambio iónico.	Grzenia D. L. et al., 2012 Chandel et al, 2011
Detoxificación biológica	Aplicación de microorganismos vivos y/o la aplicabilidad enzimática microbiana para la detoxificación de hidrolizados lignocelulósicos	JRM Almeida et al., 2007 Jönsson et al., 1998

Tabla 1.2. Procesos de detoxificación para hidrolizados con SO<sub>2</sub>.

Materia prima	Tratamiento	Inhibidores	Eliminación (%)	C <sub>inicial</sub> (g/L)	Referencia
Licor gastado al sulfito	Intercambio aniónico y catiónico	Ca <sup>+2</sup>	99	0,05	Fernandes et al., 2012
		Mg <sup>+2</sup>	100	0,55	
		Lignosulfonatos	99	12	
		Ácido acético	100	1	
		Azúcar	28	5	
Hidrolizados de maderas de abeto	Carbón Activo	Furanos	94	1	Guo et al, 2013
		Ácido acético	28	1,72	
		Ácido fórmico	39	0,18	
		Fenólicos totales	88	1,3	
	Overliming	Furanos	45	1	
		Ácidos alifáticos	0	0	
		Fenólicos totales	14	1,3	
	NH <sub>4</sub> OH	Furanos	15	1	
		Ácidos alifáticos	0	0	
		Fenólicos totales	8	1,3	
	NaOH	Furanos	8	1	
		Ácidos alifáticos	6	1,9	
		Fenólicos totales	1	1,3	
	Intercambio aniónico a pH 10	Furanos	26	1	
		Ácidos alifáticos	23	1,9	
Fenólicos totales		79	1,3		

Tabla 1.2. (continuación). Procesos de detoxificación para hidrolizados con SO<sub>2</sub>.

Materia prima	Tratamiento	Inhibidores	Eliminación (%)	C <sub>i</sub> (g/L)	Referencia
Hidrolizados del pretratamiento de SO <sub>2</sub> en maderas de abeto	Intercambio aniónico a pH 5,5	Furanos	9	1	Guo et al, 2013
		Ácidos alifáticos	28	1,9	
		Fenólicos totales	53	1,3	
	Intercambio catiónico a pH 10	Furanos	15	1	
		Ácidos alifáticos	10	1,9	
		Fenólicos totales	22	1,3	
	Intercambio catiónico a pH 5,5	Furanos	6	1	
		Ácidos alifáticos	9	1,9	
		Fenólicos totales	8	1,3	
Líquido SPORL	10 g/L Ca(OH) <sub>2</sub> 30°C, pH=10, 90 min	Lignosulfonatos	11	50	Yu et al., 2012
		Glucosa	100	12	
		Xilosa	100	148	
	20 g/L Ca(OH) <sub>2</sub> 30°C, pH=12, 90 min	Lignosulfonatos	26	50	
		Glucosa	100	12	
		Xilosa	60	148	
	90 g/L Ca(OH) <sub>2</sub> 30°C, pH=12,5, 90 min	Lignosulfonatos	38	50	
		Glucosa	59	12	
		Xilosa	58	148	

Tabla 1.2. (continuación). Procesos de detoxificación para hidrolizados con SO<sub>2</sub>.

Materia prima	Tratamiento	Inhibidores	Eliminación (%)	C <sub>inicial</sub> (g/L)	Referencia
Líquido SPORL	20 g/L Ca(OH) <sub>2</sub> 75°C, pH=12, 90 min	Lignosulfonatos	36	50	Yu et al., 2012
		Glucosa	21	12	
		Xilosa	5	148	
SSL	Resina aniónica Diaion PA408, base fuerte, 24 h, 30°C, 150 rpm	Ácido acético	0	11,2	Takahashi et al., 2013
		Azúcares	12	35,9	
		Lignosulfonatos	34	119,5	
	Resina aniónica Diaion WA30, base débil, 24 h, 30°C, 150 rpm	Ácido acético	10	11,2	
		Azúcar	0	35,9	
		Lignosulfonatos	41	119,5	
	Resina aniónica Diaion A103S, base débil, 24 h, 30°C, 150 rpm	Ácido acético	0	11,2	
		Azúcar	0	35,9	
		Lignosulfonatos	-	119,5	

Tabla 1.2. (continuación). Procesos de detoxificación para hidrolizados con SO<sub>2</sub>.

Materia prima	Tratamiento	Inhibidores	Pérdida (%)	C <sub>inicial</sub> (g/L)	Referencia
SSL	Overliming CaO pH=11,5, 70°C, 15 min	Azúcar	4	35,9	Takahashi et al., 2013
		Lignosulfonatos	43	119,5	
		Sulfito	87	5,5	
		Sulfato	-	18,4	
	Carbón activo, 24 ho, 30°C, 150 rpm	Ácido acético	50	11,2	
		Azúcar	6	35,9	
		Lignosulfonatos	20	5,5	
		Sulfito	-13	5,5	
		Sulfato	-23	18,4	
	Combinado: CaO+resina PA408	Ácido acético	40	11,2	
		Azúcar	91	35,9	
		Lignosulfonatos	90	119,5	
	Combiado: CaO+ neutralización con CO <sub>2</sub> + resina PA408	Ácido acético	56	11,2	
		Azúcar	73	35,9	
		Lignosulfonatos	77	119,5	
	Combinado: CaO+ neutralización con CO <sub>2</sub> + resina WA30	Ácido acético	-19	11,2	
		Azúcar	4	35,9	
		Lignosulfonato	81	119,5	

Tabla 1.2. (continuación). Procesos de detoxificación para hidrolizados con SO<sub>2</sub>.

Materia prima	Tratamiento	Inhibidores	Pérdida (%)	C <sub>inicial</sub> (g/L)	Referencia
SSL	Combinado: CaO+ neutralización con CO <sub>2</sub> + resina A103S	Ácido acético	-19	11,2	Takahashi et al., 2013
		Azúcar	4	35,9	
		Lignosulfonatos	56	119,5	
	Ultrafiltración, 100 kDa	Lignosulfonato	80	38	Bhattacharya et al., 2005
	Nanofiltración	Lignosulfonato	99	84	Restolho et al., 2009
		Glucosa	85	9,31	
		Xilosa	78	30,9	
	Ultrafiltración	Lignosulfonato	57	84	
		Azúcar	76	49	
	Ósmosis inversa	Lignosulfonato	68	84	
		Glucosa	96	9,31	
		Xilosa	93	30,9	
	Ultrafiltración	Lignosulfonato	67	56 (%)	Madsen and Nielsen, 1978
		Azúcar	95	32 (%)	
		Ácido acético	36	6,6	

En este trabajo fin de carrera se desarrollan 2 técnicas de detoxificación: intercambio iónico con resina catiónica y aniónica y adsorción utilizando como adsorbentes el carbón activo y el negro de humo.

### **1.3.1. Intercambio iónico**

El intercambio iónico es una operación de separación basada en la transferencia de materia fluido-sólido. Este proceso puede explicarse como una reacción reversible implicando cantidades químicas equivalentes. La eficacia del proceso depende del equilibrio sólido-fluido y de la velocidad de transferencia de materia. Los sólidos suelen ser de tipo polimérico, siendo los más habituales los basados en resinas sintéticas. (UAM, 2014)

El tratamiento con resinas de intercambio iónico es conocido para eliminar los inhibidores derivados de la lignina, ácido acético y furfurales, respectivamente, que conduce a un hidrolizado que muestra una fermentación similar a la de un sustrato de modelo libre de inhibidores. Las resinas de intercambio iónico basadas en la separación de los inhibidores de la fermentación puede no ser rentable, sin embargo, se proporciona medios más eficaces de separación del inhibidor cuando el hidrolizado se ajusta a un pH próximo a 10. Además, el tratamiento de aniones también ayuda a eliminar la mayoría de los inhibidores (es decir, levulínico, ácido acético, ácido fórmico, y furfural y 5-HMF (Chandel et al, 2011).

### **1.3.2. Adsorción**

El carbón activo es un material poroso preparado por la carbonización y activación de materiales orgánicos, especialmente de origen vegetal, hullas, lignitos y turbas, con el fin de obtener un alto grado de porosidad y una importante superficie intraparticular. La elevada superficie específica facilita la adsorción física de gases y vapores de mezclas gaseosas o sustancias dispersas en líquidos.

La detoxificación de los hidrolizados de hemicelulosa por el carbón activo es conocida por su alta capacidad de adsorción de compuestos sin afectar los niveles de azúcar en el hidrolizado. La eficacia de tratamiento con carbón activo depende de diferentes variables de proceso tales como pH,

tiempo de contacto, la temperatura y la proporción de carbón activo tomado en comparación con el líquido hidrolizado de volumen (Parajó et al., 1997).

El negro de humo es un material petroquímico. Básicamente es carbón puro con una estructura muy semejante a la del grafito. El tamaño de las partículas en el negro de humo varía desde 10 hasta 500 nm y tiene un contenido de carbono que va desde 88 a 99,3%, 0,4-0,8% de hidrógeno y de 0,3 a 17% de oxígeno.

Las materias primas para hacer negro de humo pueden incluir desde gas natural hasta aceites pesados con alto contenido de poliaromáticos. Existen tres procesos generales para fabricar industrialmente negro de humo; proceso de canal, proceso de horno y proceso térmico. La diferencia básica entre los dos primeros procesos y el último es que los procesos de canal y de horno obtienen los productos quemando parcialmente los materiales usados como materia prima, mientras que el proceso térmico consiste en descomponer los productos por medio del calor. (Susana Chow, 1998)

En este trabajo fin de carrera se ha estudiado la posibilidad de utilizar el negro de humo como adsorbente de compuestos orgánicos solubles, ya que su coste es muy pequeño al tratarse de un subproducto (Coz, 2001)

#### **1.4. Marco y objetivos**

##### **1.4.1. Marco del proyecto**

El proyecto ha sido llevado a cabo mediante una beca de prácticas del COIE concedida por el grupo de investigación *GER* ([www.geruc.es](http://www.geruc.es)) el cual se encuentra dentro del Departamento de *Química e Ingeniería de Procesos y Recursos* de la Universidad de Cantabria. Las prácticas fueron realizadas en el Laboratorio de Hidrólisis situado dentro de la empresa Sniace en colaboración con la Universidad de Cantabria.

Por otro lado, este proyecto se enmarca dentro del Proyecto Europeo *BRIGIT* ([www.brigit-project.eu](http://www.brigit-project.eu)) cuyo objetivo principal es producir un sustrato de azúcar adecuado para la producción de biopolímeros a partir de

los materiales residuales lignocelulósicos: licor gastado del proceso al sulfito y bagazo de caña de azúcar. Se trata de un proyecto de I+D+i en el cual, la Universidad de Cantabria tiene como cometido incrementar la cantidad de azúcares tras la digestión de los chips de madera dura *Eucalyptus globulus* y *nitens* y eliminar los inhibidores generados presentes en la materia residual lignocelulósica para optimizar la producción de biopolímeros.

#### **1.4.2. Objetivos**

A pesar de que el objetivo principal del proyecto Europeo es la obtención de biopolímeros, este proyecto fin de carrera se centra en procesos de detoxificación del licor lignocelulósico con objetivo final de obtención de bioetanol.

El objetivo de este proyecto fin de carrera es el estudio a escala laboratorio de las técnicas de detoxificación, intercambio iónico y adsorción, en el licor gastado al sulfito, para minimizar la concentración de los inhibidores de fermentación.

Con el fin de cumplir este objetivo general, se plantean las siguientes etapas parciales:

1. Planteamiento de experimentos en discontinuo de procesos de intercambio iónico basados en bibliografía y en los inhibidores del proceso.
2. Ensayos de intercambio iónico con resinas catiónica y aniónica. Búsqueda de los puntos óptimos de trabajo. Con los óptimos de trabajo, plantear ensayos con ambas resinas en serie.
3. Planteamiento de experimentos en discontinuo de procesos de adsorción con Carbón Activo y Negro de Humo basados en bibliografía y en los inhibidores del proceso.
4. Ensayos de adsorción con Carbón Activo y Negro de Humo. Búsqueda de los puntos óptimos de trabajo.
5. Comparación de diferentes técnicas de detoxificación.

## 2. Metodología experimental

---

## 2. Metodología experimental

### 2.1. Muestras

Las muestras utilizadas en los procesos de detoxificación llevados a cabo en el laboratorio provienen de licor gastado al sulfito ácido, producto secundario de la fabricación de pasta de madera al sulfito ácido. Está compuesto principalmente por lignosulfonatos (LS) y azúcares. Estos últimos son un buen sustrato para el bioprocesado aunque es necesario un paso previo de purificación para eliminar los inhibidores microbianos. (Fernandes et al., 2012). Las muestras utilizadas en este proyecto fueron obtenidas del proceso de obtención de pasta *dissolving* de la empresa Sniace.

La madera que se utiliza en el proceso de Sniace es *Eucalyptus globulus*, cuya composición es de 49% celulosa, 30% hemicelulosa y 21% lignina (Mendivil, 2013).

El proceso de obtención de pasta de papel de la empresa Sniace consta de las siguientes etapas:

- Preparación de la madera
- Cocción
- Blanqueo
- Secado y embalado
- Recuperación y energía

Después de la deslignificación de la madera, se obtiene el licor gastado o licor marrón. Se trata de un residuo generado en el proceso de cocción química de las astillas para la obtención de pulpa química. Este licor residual está compuesto principalmente por agua, materia orgánica proveniente de la degradación de la holocelulosa, lignina solubilizada, extraíbles y materiales inorgánicos provenientes de los reactivos químicos utilizados en el proceso de cocción; todo esto puede resumirse en que los elementos principales del licor son C, H, S, Na y  $N_2+O_2$ . (Mendivil, 2013)

El licor se somete a diferentes procesos para recuperar los reactivos químicos utilizados en la etapa de cocción, entre ellos se encuentra la evaporación del agua del licor que sirve para aumentar su concentración en sólidos. La fábrica de CELLTECH cuenta con dos plantas de evaporación, o concentración de lejías bisulfíticas, del licor gastado proveniente de la cocción de madera de Eucalipto en los digestores. En dichas plantas se concentra el licor desde el 11-12% al 55% de sólidos (Llano et al., 2013).

Con esta mezcla de licor gastado concentrado se preparan las muestras a detoxificar. Se prepara una disolución al 1/10 de licor, utilizando como disolvente agua destilada.

## 2.2. Procedimientos de detoxificación.

### 2.2.1. Intercambio iónico

En los experimentos de intercambio iónico presentados en este proyecto se utilizaron dos tipos de resinas basadas en bibliografía para este tipo de muestras (Fernandes et al., 2012); la resina de intercambio catiónica Dowex 50WX2® (malla 100-200) en forma de H<sup>+</sup> y la resina de intercambio aniónica Amberlite IRA-96® (malla 20-50) en forma OH<sup>-</sup>.

Todos los ensayos de intercambio iónico con resinas se realizaron en discontinuo. Se han realizado tres tipos de ensayos diferentes: resina catiónica, resina aniónica y combinación entre ambas.



Figura 2.1. Resinas: A la izquierda la resina aniónica Amberlite® y a la derecha la resina catiónica Dowex®

### 2.2.1.1. Procedimiento experimental

1. En una balanza de precisión se pesa, dentro de un falcon, una cantidad de resina determinada.
2. Con la ayuda de una pipeta se añade al falcon el volumen de muestra.
3. Se ponen las muestras en el rotatorio a 12 rpm.
4. Se van quitando muestras del rotatorio a diferentes tiempos.
5. Se filtra la muestra con un equipo de filtrado, mostrado en la figura 2.2. Se trata de un equipo de filtración a vacío de líquidos corrosivos, orgánicos o acuosos para el análisis de contaminantes particulados. Está formado por un embudo, base, soporte del filtro y tapa tubulada de vidrio además de una pinza de sujeción de aluminio. En el soporte del filtro se coloca un filtro Milipore 0,45  $\mu\text{m}$ . Este equipo se conecta a una bomba de vacío. La resina quedará retenida en el soporte del filtro y la muestra detoxificada se recoge en el matraz kitasato



Figura 2.2. Equipo de filtración

6. La muestra detoxificada se almacena a un falcon nuevo.
7. Parte de la muestra que contiene el falcon, se pasa a un vial utilizando para esto una jeringuilla con un filtro Milipore 0,22  $\mu\text{m}$  colocado en la punta. Este vial será analizado en el HPLC. La muestra restante se utiliza para el resto de análisis.

En todos los casos, los experimentos se realizaron por duplicado.

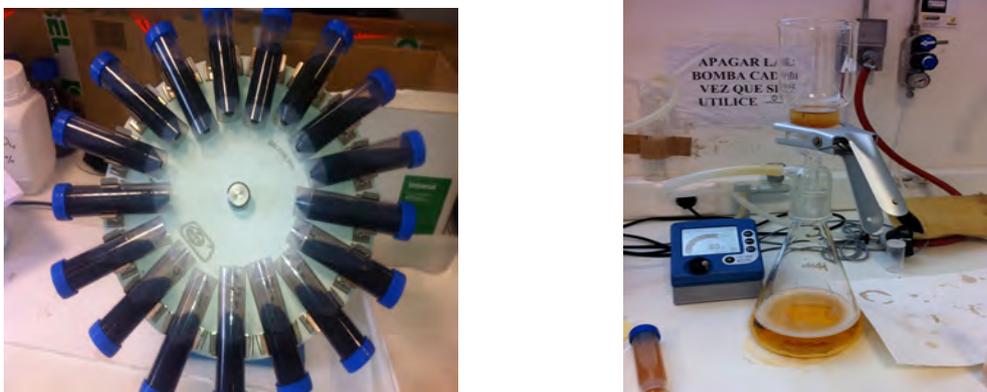


Figura 2.3. Equipo experimental para intercambio iónico. A la izquierda el rotatorio y a la derecha el equipo de filtración

#### 2.2.1.2. Regeneración de la resina

1. En un recipiente falcon limpio se junta la resina utilizada en los experimentos y se añade agua ultrapura hasta llenar el frasco. Se pone en el rotatorio a una velocidad de 12 rpm durante 1 hora.
2. Se filtra la resina en el mismo equipo de filtrado descrito anteriormente.
3. La resina seca se vuelve a introducir en otro falcon, en este caso si es resina aniónica se añade al falcon una disolución 0,1M de NaOH. Si se está regenerando la resina catiónica se agregará una disolución 0,1 M de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Se ponen los falcon en el rotatorio a una velocidad de 12 rpm durante 40 minutos.

4. Se filtra la resina en equipo de filtrado
5. En el mismo equipo de filtrado, se somete a la resina a varios lavados con agua ultrapura hasta que el pH del líquido que sale de la resina llegue a un valor constante y aproximadamente igual a 6 si es resina catiónica, y aproximadamente igual a 7 si es aniónica.

### 2.2.1.3. Condiciones experimentales

#### ❖ Evolución de las técnicas con el tiempo

Con el objetivo de buscar el óptimo se han realizado varios ensayos de cinéticas en resinas de intercambio iónico, todos los ensayos se hicieron a temperatura ambiente y a una velocidad de agitación de 12 rpm. Las condiciones experimentales de cada experimento realizado se encuentran en la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Condiciones experimentales para el estudio de la efectividad del tratamiento con el tiempo

Resina	Ratio (v/w)	Tiempo (min)				
Catiónica	0,67					
	2	5	15	30	45	60
	3					
	4					
Aniónica	1,2					
	1,5	5	30	60	120	
	2					
	3					

## 2.2.1. Adsorción

### 2.2.1.1. Muestras

En este caso, las muestras iniciales también proceden de una disolución 1/10 de licor gastado de un proceso de fabricación de pasta de papel al sulfito (SSL). Pero antes de comenzar los ensayos, serán necesarios algunos pasos previos:

- *Humedad del adsorbente:* En un analizador halógeno de humedad, se pesa una pequeña cantidad de adsorbente y se anota el valor de su humedad. Esta operación se repite hacen tres réplicas y se calcula la humedad media.
- *Neutralización del SSL:* El licor de entrada que se utiliza para estos ensayos se neutraliza antes de iniciar la experimentación. Para neutralizarlo primero se mide el pH del SSL sin neutralizar. Las muestras de licor se tratan con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  2,5 M hasta alcanzar un pH de 7. Se pasa el licor a varios Erlenmeyer y se colocan estos en un agitador orbital durante media hora a 30°C y después se reajusta a 5,5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , eliminando los precipitados por centrifugación. (Carvalho et al., 2004).



Figura 2.4. Equipo experimental para la neutralización del SSL

### 2.2.1.2. Características de los adsorbentes

- Carbón Activo

Tabla 2.2. Propiedades del Carbón Activo

<b>Fabricante</b>	Panreac
<b>Tamaño de partícula</b>	1,25 – 3,15 mm
<b>Densidad</b>	1,8 – 2,1 g/cm <sup>3</sup>

- Negro de Humo: N220-0740-140102 BB-35

Tabla 2.3. Propiedades del Negro de Humo

<b>Fabricante</b>	Columbian Carbon Spain
<b>Arena retenida en tamiz de 325 <math>\mu\text{m}</math> (ppm)</b>	250
<b>Arena retenida en tamiz de 35 <math>\mu\text{m}</math> (ppm)</b>	5



Figura 2.5. Adsorbentes: A la izquierda negro de humo en polvo y a la derecha carbón activo granular

### 2.2.1.3. Procedimiento experimental

#### ❖ Activación del carbón activo

El carbón comercial se activó mediante el lavado y equilibrado con HCl seguido por otro lavado y posterior secado a temperatura ambiente.

Procedimiento (Parajó et al., 1996): El carbón activo hay que lavarlo y equilibrarlo seguidamente con HCl 0,4M y agua ultrapura. Posteriormente se seca a temperatura ambiente. Para el primer uso del carbón activo, las muestras se lavarán solamente con agua ultrapura hirviendo varias veces y se filtra hasta que el papel de filtro quede blanco.

#### ❖ Procedimiento experimental para ambos casos

El procedimiento experimental de los ensayos será como sigue:

1. En primer lugar se establecen los ratios sólido/líquido (S/L) con los que se va a trabajar. Para calcular la cantidad de adsorbente que se va utilizar, se procede de siguiente modo:

$$M_{\text{Adsorbente}} = V_{\text{SSL-N}} \times \text{ratio} \times \frac{100}{100 - H_{\text{Ads}}}$$

donde  $H_{\text{Ads}}$  es la humedad media del adsorbente.

2. En una balanza de precisión se tara un Erlenmeyer y se va añadiendo la cantidad de adsorbente determinada para cada ratio.
3. Con la ayuda de una pipeta se añade el volumen de SSL neutralizado
4. Se programa el orbital a una temperatura y velocidad de agitación determinadas
5. Se van sacando las muestras a distintos tiempos
6. En este punto se diferencia el procedimiento experimental dependiendo de si son ensayos de Carbón Activo o de Negro de Humo.

6.1. *Carbón Activo*: Se vacía el contenido del Erlenmeyer en un equipo de filtración similar al utilizado en resinas con la salvedad de que el filtro era de papel tipo resma. Se recoge el filtrado en un falcon. Con la ayuda de una jeringuilla con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  colocado en la punta, se preparan los viales para analizarlos en el HPLC.

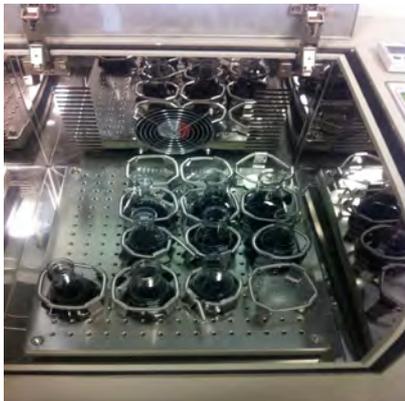


Figura 2.6. Equipo experimental utilizado en los ensayos con carbón activo. A la izquierda imagen del agitador orbital y a la derecha equipo de filtración

### 6.2. *Negro de Humo*

- Finalizado el ensayo, se pasa el contenido de cada Erlenmeyer a un frasco tipo falcon y se pasa por la centrífuga para que precipiten los sólidos. Esta operación se repite dos veces,

usando un falcon limpio para cada muestra cada una de las veces.

- Se preparan las muestras para su posterior análisis

Cada experimento fue realizado por duplicado.

#### 2.2.1.4. Condiciones experimentales

##### ❖ Efectividad del tratamiento con el tiempo

En la tabla 2.4. se recogen las condiciones experimentales con las que se ha trabajado tanto para carbón activo como para negro de humo. Para cada adsorbente se han aplicado las mismas condiciones experimentales.

Tabla 2.4. Condiciones experimentales de los experimentos de adsorción

<b>Ratio (v/w)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>			
5 mL/g	30				
	50	15	30	45	60
10 mL/g	30				
	50				

## 2.3. Caracterización. Métodos analíticos

### 2.3.1. Determinación de % de lignosulfonatos, OH fenólicos

Estos ensayos están basados en la norma UNE 16109 (UNE EN 16109)

#### ❖ Procedimiento

1. Medir humedad y densidad de las muestras según salen del proceso de detoxificación.
2. Calcular el volumen de disolución a tomar para que haya entre 0,15 y 0,20 g de producto seco.
3. Preparar una disolución con el volumen determinado anteriormente en un matraz de 250 mL de agua ultrapura. Normalmente será de entre 0.6 y 0.8 g/L de LS (seco).
4. *Disolución A:* Tomar parte de la disolución de 250 ml y ajustar a pH de entre 2 y 2,2. Para ajustar dicho pH se utilizará HCl 5M. Con una pipeta tomar 5 mL de la disolución con el pH ajustado a un matraz de 50 mL y enrasar con agua ultrapura.
5. *Disolución B:* Pipetear 5 mL de la disolución del matraz de 250 mL a un matraz de 50 mL. Ajustar a  $\text{pH} > 11$  usando 10 mL de hidróxido sódico 5M y enrasar con agua ultrapura.
6. *Disolución C:* Pipetear 3 mL de la disolución inicial a un vaso de 100 mL y añadir agua. Ajustar el pH de la disolución entre 4 y 5 mediante la adición de NaOH 0.125 M o HCl 0.2M según sea necesario. Llevar a matraz aforado de 100 mL, enrasar con agua ultrapura y agitar.
7. Encender el equipo de UV-Vis y esperar unos 15 minutos.
8. Poner en ambas celdas del UV-Vis agua destilada y hacer la línea base. Llenar el compartimento de muestra con la disolución A y pulsar Start para escanear de 340 a 220 nm.
9. Anotar el valor de absorbancia del pico entre 270 y 285 como A.
10. Llenar ahora la celda de muestra con la disolución B y la referencia con la solución A y escanear nuevamente de 340 a 220 nm. Anotar el

valor de absorbancia del pico alrededor de 255 como B y el del valle mínimo a cualquiera de los dos lados como C.

11. Para determinar el contenido en Lignosulfonatos llenar la celda de muestra con la disolución C y la de referencia con agua ultrapura y anotar el valor de absorbancia a 232,5 nm como E.

Este procedimiento está pensado para muestras con concentraciones de LS entre 30 y 80 g/L de LS seco. Se puede adaptar a las muestras variando la cantidad de muestra pesada o la alícuota tomada. La absorbancia final de la solución a medir debe estar entre 0,2 y 0,8 para minimizar las desviaciones en la ley de Beer y con ello el error instrumental.

#### ❖ Cálculos

$K_{\text{solids}}$  es un método de análisis de LS por UV, el valor calculado es una medida relativa del contenido de lignina

$$K_{\text{solids}} = \frac{A}{\text{Conc} \left( \frac{\text{g}}{\text{L}} \right)}$$

$$\%OH_{\text{fenólicos}} = \frac{B - C}{\text{Conc} \left( \frac{\text{g}}{\text{L}} \right)} \cdot 0.192$$

$$\%LS = \frac{E \cdot D(\text{mL})}{f \cdot P(\text{g}) \cdot 10}$$

- Conc (g/l): es el valor de la concentración en g de LS seco por litro de las disoluciones de 50 ml.
- D: es el factor de dilución en ml
- f: factor que toma los siguientes valores
  - ✓ ácido lignosulfónico: 36,5
  - ✓ lignosulfonato cálcico: 35,2
  - ✓ lignosulfonato sódico: 35
- P: peso de muestra en g

### 2.3.2. Medida de azúcares en cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. El método de determinación cuantitativa y cualitativa de azúcares e inhibidores da soporte a aplicaciones muy diversas: caracterización química del licor, eficacia del proceso fermentativo de los azúcares, estudio de la cocción a escala de laboratorio o a escala de planta piloto, y validación de las mismas de acuerdo con los resultados obtenidos a escala industrial.

En las muestras que han sido sometidas a detoxificación en este proyecto se analizan mediante este método 11 compuestos divididos en dos grupos, azúcares e inhibidores. Los compuestos se encuentran recogidos en la tabla 6. (Llano, T. 2011)

Tabla 2.5. Azúcares e inhibidores analizados por HPLC

<b>Azúcares</b>	<b>Inhibidores</b>
Celobiosa	Fórmico
Glucosa	Acético
Xilosa	Levulínico
Galactosa	Hidroximetilfurfural
Arabinosa	Furfural
Manosa	

#### ❖ Instrumentación básica

Un cromatógrafo consiste en un sistema compuesto de un recipiente de fase móvil, una bomba de alta presión, un sistema de introducción de muestras, la columna cromatográfica y, a continuación, el acoplamiento de un sistema de detección y de adquisición y tratamiento de datos que permita visualizar la separación. En este proyecto, se han utilizado dos columnas cromatográficas. La columna CHO-782 transgenomic y la SH1011 Shodex. A continuación se detallan las especificaciones técnicas de cada una de las

columnas junto con las condiciones de los métodos aplicados en dichas columnas.

- CHO-782 transgenomic
  - Utilizada para la cuantificación de azúcares y celobiosa
  - Fase móvil: agua ultrapura
  - Flujo fase móvil: 0,3 mL/min
  - Temperatura del horno: 68 °C
  - Inyección de muestra: 20 µL
- SH1011 Shodex
  - Empleada en la cuantificación de ácidos, HMF y furfural
  - Fase móvil: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005M
  - Flujo fase móvil: 0,5 mL/min
  - Temperatura del horno: 60 °C
  - Inyección de muestra: 20 µL

El sistema de detección empleado es el índice de refracción puesto que es el detector universal para la medida de azúcares. Detecta cualquier componente con un índice de refracción distinto al de la referencia (fase móvil). Es el detector ideal para identificar y cuantificar elementos que no se absorban en el rango UV-visible tales como hidratos de carbono, lípidos y polímeros. Consta de un intercambiador de calor para termostatar el detector, una lámpara de Tungsteno como fuente de luz, una celda de flujo, lentes y espejos. (García Quevedo, 2013)

- ❖ Protocolo de medida de azúcares e inhibidores en muestras de licor gastado de cocción en HPLC

Antes de introducir un vial de muestra en el cromatógrafo y proceder con el Software LCSolution es necesario seguir un protocolo de actuación que se ha obtenido a partir de la puesta a punto del método de determinación de azúcares e inhibidores por HPLC con detector de índice de refracción. Los pasos a seguir son: (Llano, 2011)

1. Diluir la muestra problema de modo que cada azúcar esté dentro del rango del método que se aplica.
2. Centrifugar las muestras durante 10 minutos a 8000rpm
3. Filtrar el sobrenadante mediante una jeringa y un filtro de jeringa de celulosa de 0,22  $\mu\text{m}$ . Colocar las muestras directamente filtradas sobre los viales.
4. Crear un método de análisis para cada tipo de columna con las condiciones pertinentes.
5. Generar una serie de rectas de calibrado (tantas como compuestos se quieran medir) y asociarlas a cada método de análisis.
6. Una vez que se ha inyectado la muestra después de haber pasado a través del detector abrir "Postrun", seleccionar el método en el que se han guardado las rectas de calibrado y recoger los resultados

#### 2.3.4. Determinación de metales mediante Absorción Atómica

El equipo de adsorción atómica utilizado es el modelo AA7000 de Shimadzu (figura 5). Los metales que se han analizado para todas las muestras detoxificadas mediante intercambio iónico fueron Calcio y Magnesio.



Figura 2.6. Equipo de adsorción Shimadzu AA7000

El primer paso para la puesta a punto del método es saber cuál es el rango de concentración para cada metal en el cual se obtiene una buena regresión entre la absorbancia y la concentración del metal, o lo que es lo mismo, hacer un barrido de absorbancias para saber cuál es la

concentración máxima que se puede medir en cada muestra. Para ello se prueban distintos patrones a diferentes concentraciones y un blanco, obteniendo para cada metal los patrones necesarios para realizar las curvas de calibrado. Una vez se obtienen esos rangos para cada metal se definen los patrones para obtener las rectas de calibrado.

Tabla 2.6. Patrones para recta de calibrado de calcio

	<b>C teórica (ppm)</b>	<b>Abs. Media</b>
<b>Patrones Calcio</b>	0,5	0,022
	1	0,036
	2	0,076
	5	0,196
	10	0,312
	50	1,384
<b>Ecuación de Absorción</b>	$-9,915 \cdot 10^{-5} \cdot \text{Conc}^2 + 0,032 \cdot \text{Conc} + 0,011$	

Tabla 2.7. Patrones para recta de calibrado de Magnesio

	<b>C teórica (ppm)</b>	<b>Abs. Media</b>
<b>Patrones Magnesio</b>	0,1	0,068
	0,2	0,163
	0,4	0,284
	1	0,723
	2	1,385
<b>Ecuación de Absorción</b>	$-0,027 \cdot \text{Conc}^2 + 0,747 \cdot \text{Conc} + 0,0003$	

El blanco se prepara con 1 mL de HNO<sub>3</sub> comercial y se enrasa hasta 100 mL con agua ultrapura.

Se parte de una disolución comercial. En todos los casos se hace una disolución de 100 mL en medio acuoso utilizando como disolvente agua ultrapura, y se incluyen 4 mL de HCl comercial y 4 mL de inhibidor de ruido correspondiente (LaCl<sub>3</sub> 210 g/L para el Calcio y SrCl<sub>2</sub> 99,77 g/L). El HCl se utiliza para asegurar un medio ácido pH<4 el cual interesa para asegurar que no precipiten los metales disueltos.

Antes de iniciar las medidas, será necesario preparar las muestras. Las disoluciones a partir de las muestras detoxificadas se harán en agua ultrapura. En función del volumen preparado se añadirá el inhibidor correspondiente a razón de 25 µL de inhibidor por cada 25 mL de muestra analizada.

Dada la heterogeneidad de las muestras que se tratan, y de que cada metal tiene rangos distintos de concentración, dar con diluciones concretas es difícil, por tanto se trata de un ensayo "prueba-error" hasta dar con ellas. Se puede dar una orientación de dichas diluciones, pero no siempre sirven y habría que comprobarlo viendo si la absorbancia de la muestra está comprendida entre la mínima y la máxima curva de calibrado.

## 3. Resultados

---

# 3. Resultados

## 3.1. Licor gastado

Se han analizado las disoluciones preparadas como muestras de licor gastado antes de ser sometidas a los procesos de detoxificación con el fin de conocer su contenido en azúcares, lignosulfonatos, OH fenólicos, ácidos débiles y furanos. En la tabla 3.1 se encuentran la media de los datos de humedad y densidad, y la composición de azúcares, inhibidores, OH fenólicos y lignosulfonatos en porcentaje sobre el total. Además dentro de los azúcares se separa entre arabinosa, celobiosa, galactosa, glucosa y xilosa representándose en porcentaje sobre el total de los azúcares.

Tabla 3.1. Datos de la disolución de licor de entrada

<b>Humedad (%)</b>	92,07±0,37		<b>Densidad (g/L)</b>	1011,4±12,1	
<b>Composición (%)</b>					
<b>Azúcares totales</b>					
35,73±0,002					
<b>Arabinosa</b>	<b>Celobiosa</b>	<b>Galactosa</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Xilosa</b>	
1,93±1,27	7,1±0,5	16,76±7,24	12,15±2,66	61,25±13,44	
<b>Furanos y ácidos débiles</b>		<b>OH fenólicos</b>	<b>Lignosulfonatos</b>		
1±0,5		2±0,08	56±6,53		

## 3.2. Intercambio iónico

En este apartado se recogen los resultados del proceso de intercambio iónico empleado como método de detoxificación del licor gastado. En los ensayos de resinas tanto la temperatura (temperatura ambiente) como la agitación del rotatorio (12 rpm) son variables que han sido fijadas basadas en bibliografía (Fernandes et al., 2012). Las variables que han sido estudiadas son la relación líquido/sólido (L/S) entre el volumen de muestra y la cantidad de resina empleados, y el tiempo de contacto entre ambos.

Como ya se comentó en el apartado de metodología experimental, se han realizado tres tipos de ensayos diferentes: ensayos con resina catiónica, ensayos con resina aniónica y una combinación entre ambas en serie. En los dos primeros casos, para ambas resinas, se fue probando con diferentes ratios L/S mantenidos a diferentes tiempos de operación hasta conseguir llegar a un punto seleccionado como óptimo. Para la combinación de resinas, se utilizaron los óptimos conseguidos para cada una de las resinas, y se fueron variando diferentes condiciones de operación hasta llegar al óptimo en serie, de ratio L/S y de tiempo de operación.

La resina catiónica se espera que sea capaz de eliminar cationes libres y separar parcialmente los azúcares de los lignosulfonatos de alto peso molecular y derivados de los furanos. Por otro lado, la resina aniónica reduce la concentración de los lignosulfonatos restantes, fenólicos y ácido acético (Fernandes et al., 2012).

### **3.2.1. Resina catiónica Dowex®**

#### **3.2.1.1. Efectividad del tratamiento con el tiempo**

En la figura 3.1 se representa la pérdida de azúcares a diferentes tiempos y relaciones L/S, después de pasar por la resina catiónica. Se observa que para los 4 ratios se sigue más o menos la misma tendencia siendo prácticamente constante esta pérdida, cuanto menor es el ratio L/S, mayor será la pérdida de azúcares.

En la figura 3.2 se representa la eliminación de los lignosulfonatos del licor gastado utilizando la resina catiónica en función de la relación L/S. Los resultados muestran que esta resina es capaz de eliminar hasta un 41% de lignosulfonatos aproximadamente para el ratio de 0,67 mL/g, pero la pérdida de azúcares es muy elevada. Por ello es necesario encontrar un óptimo de compromiso en ambas variables

La importancia de la concentración de azúcares variará en función de cual sea el producto final deseado, si por ejemplo se detoxifica para posteriormente fabricar bioetanol, este biocombustible se obtiene por

hidrólisis de los carbohidratos, seguida de fermentación de los azúcares reductores obtenidos (Prinsen, 2013).

Para la toma de decisión de la relación L/S se ha observado la pérdida de azúcares y la eliminación de lignosulfonatos, intentando minimizar la primera y maximizar la segunda. Para este caso los mejores escenarios serían 4 y 3 mL/g. Como muestran los resultados, no es necesario un elevado tiempo de operación para alcanzar la saturación de la resina, siendo muy similar en todas las relaciones L/S empleadas.

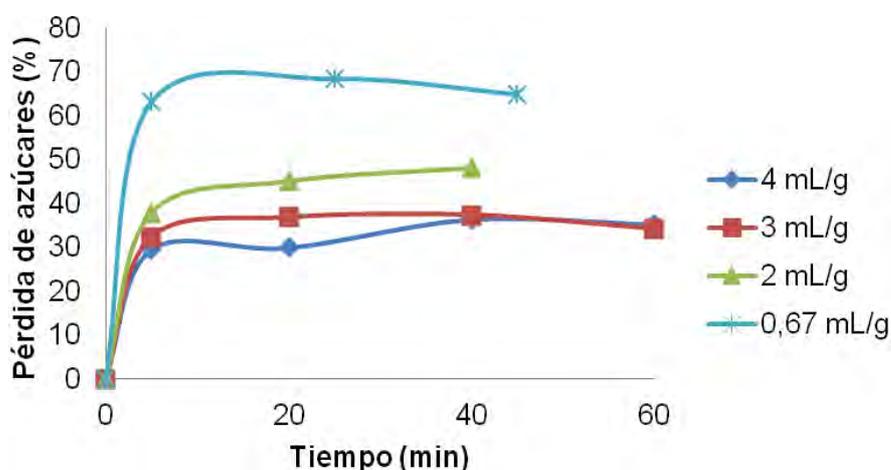


Figura 3.1. Pérdida de azúcares en función del tiempo

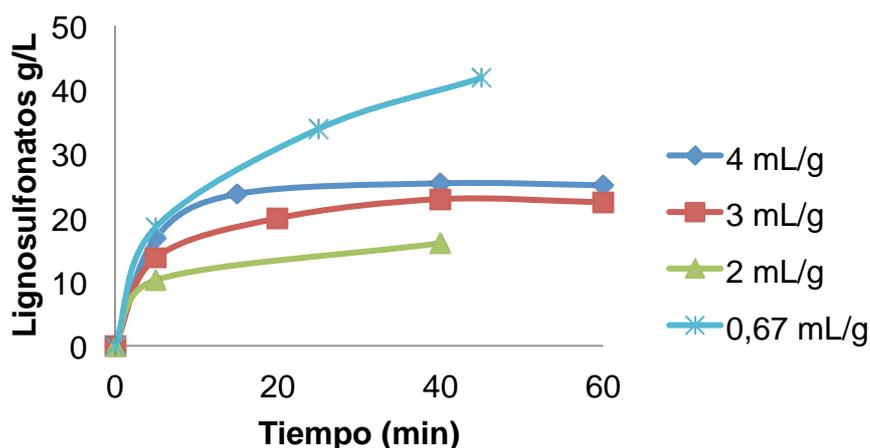


Figura 3.2. Eliminación de lignosulfonatos en función del tiempo

En el proceso al sulfito, la lignina disuelta se puede recuperar en forma de lignosulfonatos. Tradicionalmente, los lignosulfonatos obtenidos de

los licores de cocción del proceso al sulfito se han aprovechado por combustión. Se están desarrollando aplicaciones de ligninas precipitadas para su uso en materiales de alto valor añadido, como en la fabricación de resinas fenol-aldehído, tableros, polímeros de capa fina para envases en la industria alimentaria y para protección de electrodos de grafito en baterías, polímeros espumosos, estabilizadores de plásticos, etc. (Prinsen 2013).

A la vista de los resultados anteriores, y teniendo en cuenta la capacidad de la resina para eliminar lignosulfonatos, que se ha determinado como inhibidor para las cepas que producen bioetanol (Almeida et al., 2007), sin que las pérdidas de azúcares durante dicho proceso sean excesivamente altas, se ha optado porque el ratio que mejor cumple estas condiciones es el de 3 mL/g. Una vez tomada esta decisión, se realiza un análisis más en profundidad de las muestras analizando para esto el resto de inhibidores de la fermentación. La evolución de OH fenólicos, furanos y ácidos, y metales con el tiempo se presenta en las figuras 3.3 a 3.5.

Se observa que la resina catiónica es capaz de eliminar para el ratio establecido hasta un 43% aproximadamente de furanos y ácidos (Figura 3.3). En las muestras analizadas tras pasar por la resina catiónica, solamente se pudo detectar ácido acético, lo cual implica que el resto de componentes que forman este grupo (Furfural, HMF, fórmico y levulínico) han sido prácticamente eliminados, quedando una concentración de los mismos que se encuentra por debajo del límite de detección de los equipos empleados.

Los OH fenólicos (Figura 3.4) son productos de la degradación de lignina y compuestos derivados de los extractivos de madera (Basaras, 2013). Para esta resina y con las condiciones experimentales a las que se ha trabajado, se observado que el porcentaje máximo de eliminación que puede llegar a alcanzarse es del 18% aproximadamente. En cuanto a la eliminación de metales (Figura 3.5), la resina catiónica funciona muy bien para este objetivo ya que se ha eliminado prácticamente la totalidad de magnesio y aproximadamente el 91% de calcio.

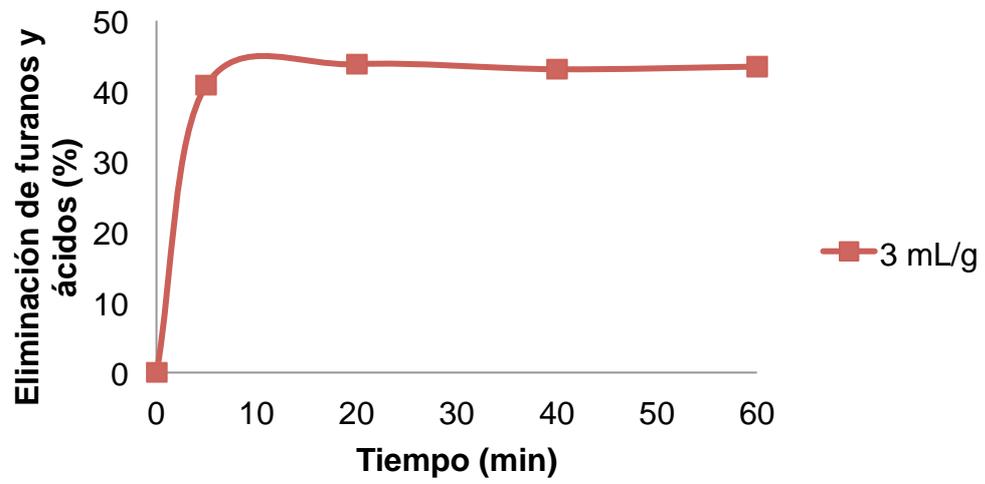


Figura 3.3. Eliminación de furanos y ácidos en función del tiempo

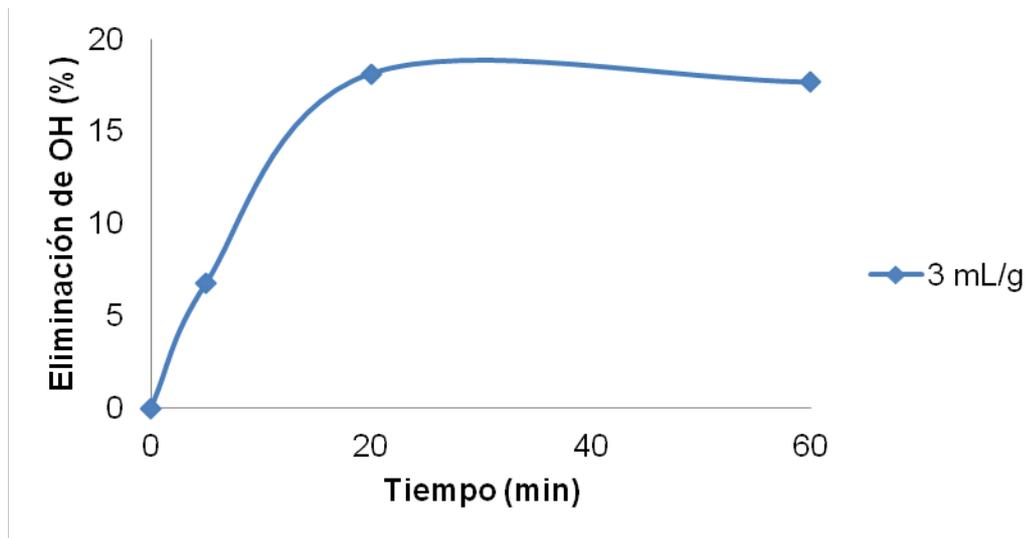


Figura 3.4. Eliminación de OH fenólicos en función del tiempo

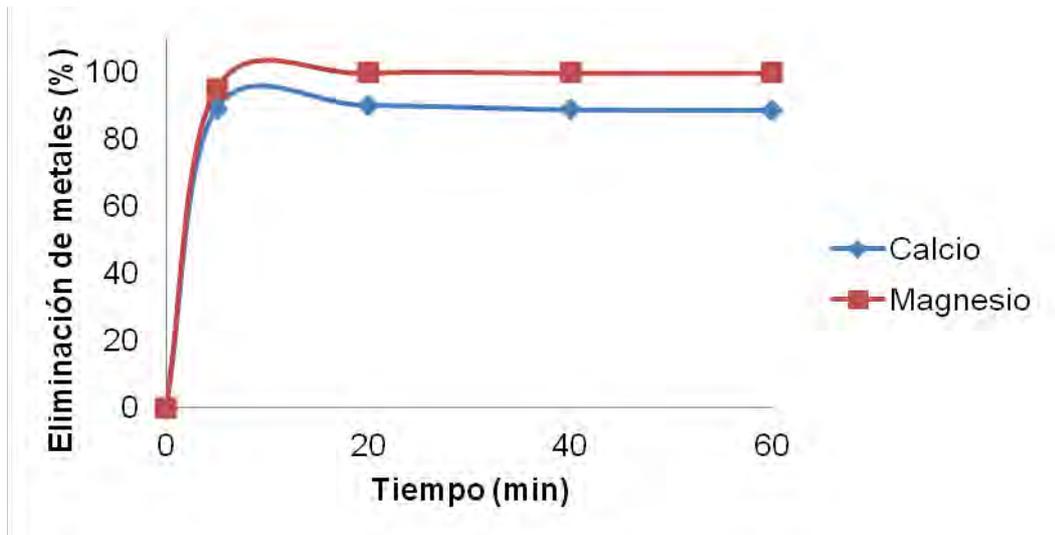


Figura 3.5. Eliminación de metales en función del tiempo

### 3.2.2. Resina aniónica Amberlite®

#### 3.2.2.1. Efectividad del tratamiento con el tiempo

Al igual que se hizo para el caso de las resinas catiónicas, se han analizado las pérdidas de azúcares y eliminación de lignosulfonatos para decidir cuáles serán las condiciones óptimas de trabajo. En la Figura 3.6 y 3.7 se pueden observar los resultados obtenidos para estos dos componentes. En cuanto a la pérdida de azúcares, se observa que a menor ratio, mayor será dicha pérdida, llegando a alcanzarse un valor máximo de aproximadamente un 58% (superior que el máximo alcanzado con la resina catiónica). Lo mismo sucede con los lignosulfonatos, a menor ratio, mayor eliminación, llegándose incluso a valores de un 94% de eliminación de lignosulfonatos. Teniendo en cuenta esto, se ha escogido como mejor comportamiento de la resina, un ratio que elimine o separe la mayor cantidad de lignosulfonatos posible con una pérdida de azúcares medianamente aceptable. Este ratio corresponde con el de 2 mL/g.

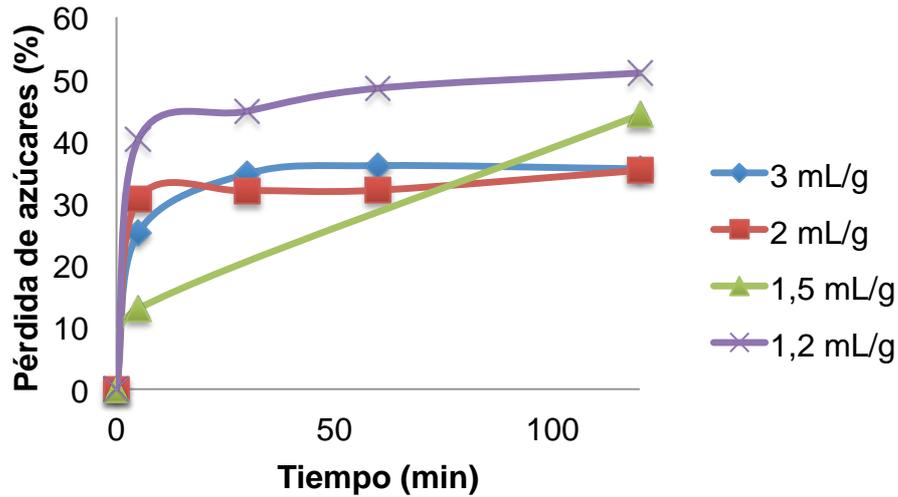


Figura 3.6. Pérdida de azúcares con el tiempo

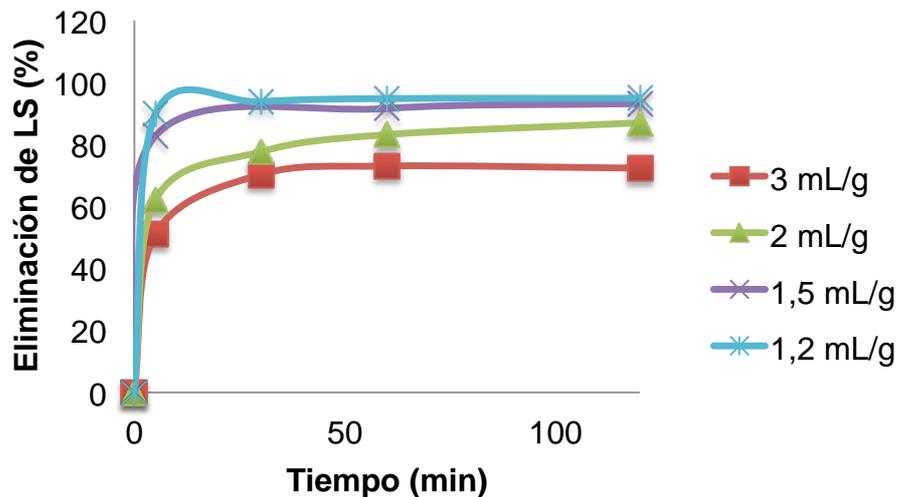


Figura 3.7. Eliminación de lignosulfonatos con el tiempo

A continuación, en las figuras 3.8 y 3.9 se presentan los resultados para el resto de componentes, OH fenólicos, furanos y ácidos que pueden inhibir un posterior paso de fermentación para la relación L/S considerada, 2 mL/g. La eliminación de OH fenólicos por parte de la resina aniónica para el ratio estudiado, corresponde con un valor final de 90,30%, bastante superior al alcanzado con la resina catiónica que era de un 17%. Atendiendo a los resultados de furanos y ácidos, el porcentaje que se ha podido llegar a eliminar de estos componentes resultó ser de un 40% aproximadamente. Particularizando para el grupo de furanos y ácidos presentes en la muestra

tras pasar por la resina, se observa que la mayor parte es ácido acético, y hay una pequeña parte también de furfural. El resto de componentes se encuentran por debajo del límite de detección del equipo, por lo tanto han sido eliminados prácticamente en su totalidad.

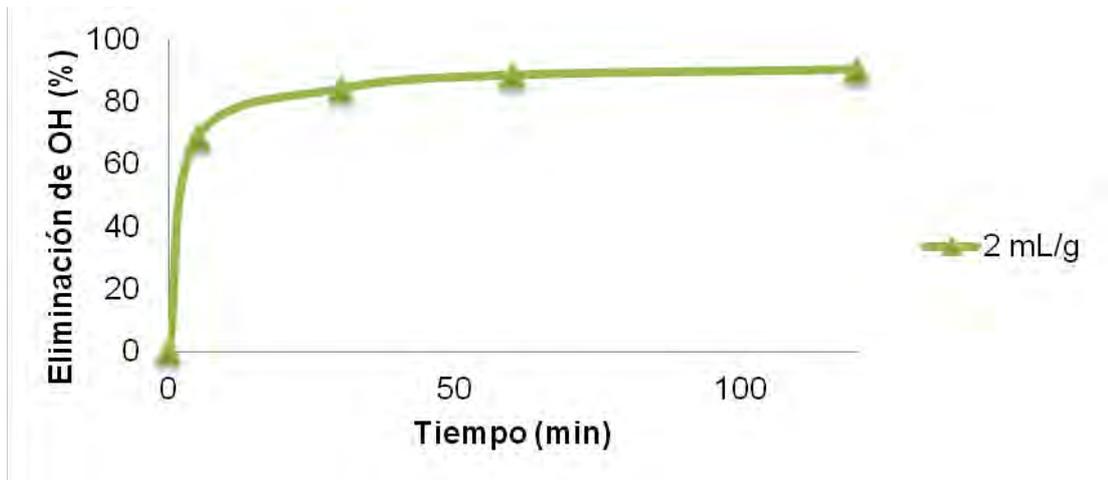


Figura3.8. Eliminación de OH fenólicos con el tiempo

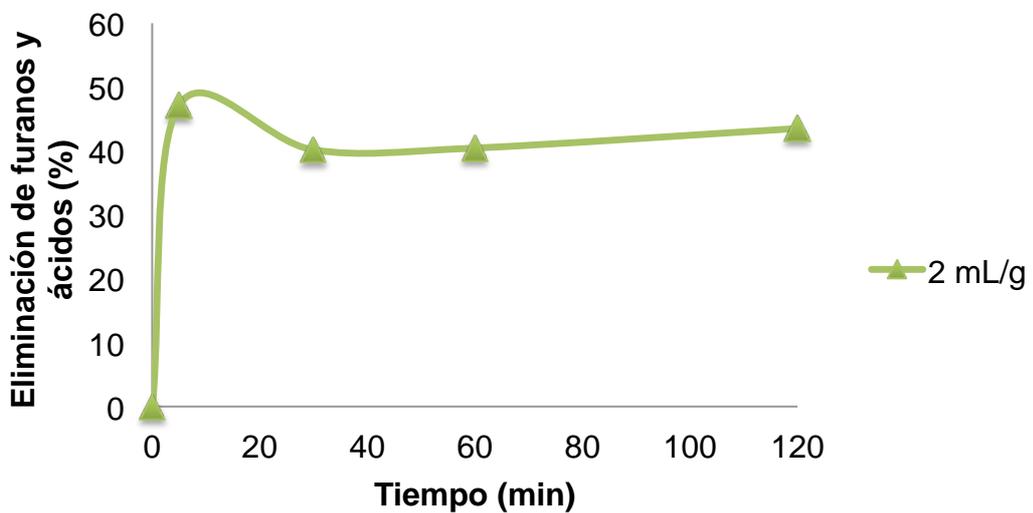


Figura 3.9. Eliminación de ácidos y furanos con el tiempo

### 3.2.3. Combinación de resinas en serie

El procedimiento experimental en este caso es el mismo que en los casos anteriores repitiéndolo dos veces, una para cada resina, y pasando el filtrado de la primera resina a frascos falcon y colocándolo en el rotatorio para la segunda parte del ensayo. A continuación en la figura 3.10 se presenta un esquema conceptual del equipo experimental.

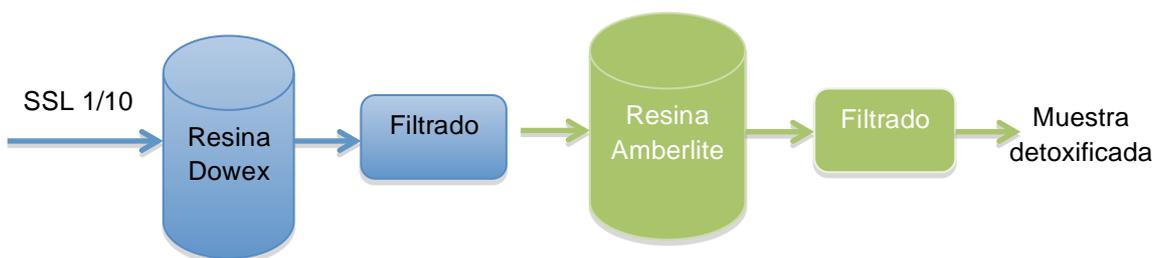


Figura 3.10. Esquema del equipo experimental para la combinación de resinas

Una vez que las muestras han pasado por ambas resinas, se procede a la regeneración de las resinas tal y como se explica en el apartado de método experimental.

Con el objetivo de buscar el óptimo se han realizado varios ensayos para estudiar el comportamiento de los componentes de la muestra en función del tiempo en resinas de intercambio iónico, todos los ensayos se hicieron a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) y a una velocidad de agitación de 12 rpm. En la tabla 8 están las condiciones experimentales con las que se ha trabajado.

Tabla 3.2. Condiciones experimentales en ensayos de resinas en serie

<b>Serie</b>	<b>Resina</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Ratio (v/w)</b>
1	Catiónica	60	3
	Aniónica		2
2	Catiónica	30	3
	Aniónica		6
3	Catiónica	30	5
	Aniónica		6

Tabla 3.3. Resultados de los ensayos con resinas en serie

<b>Serie</b>	<b>Pérdida de Azúcares (%)</b>	<b>Eliminación de ácidos y furanos (%)</b>	<b>Eliminación de Lignosulfonatos (%)</b>	<b>Eliminación de OH (%)</b>
1	65,74±3,73	92,8±0,5	98,76±0,3	100
2	31,05±16,2	88,84±3,45	73,91±1,1	83,79±0,5
3	75,35±0,5	83,09±0,16	71,4±0,99	81,68±0,24

La serie 1 corresponde con los ratios de trabajo establecidos como los más apropiados para cada una de las resinas. La pérdida de azúcares totales a estas condiciones fue de un 65,75%, lo cual es un valor demasiado alto para que estas condiciones sean las óptimas aun teniendo en cuenta que se ha eliminado prácticamente el 100% de los componentes que se consideran inhibidores de un proceso de fermentación. Esta opción sería interesante si las cepas bacterianas que se van a emplear se ven muy

afectadas por la concentración de sustrato para producir el metabolito. Con objeto de disminuir la pérdida de azúcares en las dos siguientes series de experimentos, se variaron los ratios de trabajo así como se disminuyó el tiempo de contacto entre la muestra y la resina, pasando de 60 a 30 minutos. En la serie 2 se aumentó el ratio de la resina aniónica, consiguiéndose una pérdida de azúcares mucho menor que el caso anterior y una eliminación de lignosulfonatos, ácidos y furanos, y OH fenólicos bastante buena. En la serie 3 en cambio se aumentó el ratio de la resina catiónica y se observa que la pérdida de azúcares resultó incluso mayor que en la serie 1, la eliminación del resto de los componentes se mantuvo en valores muy similares a los obtenidos en la serie 2. Cabe destacar en este punto, que del grupo de ácidos y furanos, se han encontrado presentes en los análisis de las muestras, han sido para la serie 1 ácido acético (se da por supuesto aquí que el resto han sido eliminados prácticamente en su totalidad) y para las series 2 y 3 se han detectado ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, siendo el ácido acético el mayoritario en todos los casos.

En función de lo que se desee conseguir con esta muestra, habrá que tener en cuenta que es opción es la más interesante: si una mayor presencia de azúcares o una mayor eliminación del resto de compuestos. A la vista de los resultados obtenidos en este caso, si lo que importa son los azúcares, las mejores condiciones serían las de la serie 2, y si el contenido de azúcares no es tan importante como la eliminación del resto de compuestos, sería conveniente trabajar con las condiciones de la serie 1.

### 3.3. Adsorción

En los ensayos de adsorción se han planteado experimentos a diferentes temperaturas (30 y 50 °C) y a distintos ratios (10 y 5 mL/g). Las variables medidas para determinar la efectividad del tratamiento han sido la pérdida de azúcares y la eliminación de inhibidores. De la bibliografía consultada se ha concluido que los inhibidores que principalmente se eliminan con esta técnica son ácido acético, furanos y OH fenólicos (Sainio et al., 2011; Parajó et al., 1996). En las muestras se medirán estos componentes en primer lugar y en la medida de lo posible, en caso de haber muestra suficiente, se determinará también la concentración de lignosulfonatos que se ha conseguido separar.

#### 3.3.1. Licor neutralizado

Como se comentó en el apartado de metodología experimental que las muestras que se someten a procesos de detoxificación por adsorción, han sido pasadas previamente por un proceso de neutralización (Parajó et al., 1996). Las características del licor neutralizado y que será el que se use en este apartado, se encuentran en la tabla 3.4, donde se encuentran los datos físicos y la composición en porcentaje, además en el apartado de azúcares totales se separa por monómeros expresando su cantidad en porcentaje sobre los azúcares totales.

Tabla 3.4. Datos del licor neutralizado

<b>Humedad (%)</b>	91,56±0,09	<b>Densidad (g/L)</b>	1012,33±1,15		
<b>Composición (%)</b>					
<b>Azúcares totales</b>					
32,19±0,75					
<b>Arabinosa</b>	<b>Celobiosa</b>	<b>Galactosa</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Xilosa</b>	
2,63±0,15	1,22±0,37	13,52±1,5	11,19±1,61	71,4±0,4	
<b>Furanos</b>		<b>OH fenólicos</b>		<b>Lignosulfonatos</b>	
1,29±0,05		1,8±0,08		53,68±0,5	

### 3.3.2. Carbón Activo

#### 3.3.2.1. Efectividad del tratamiento con el tiempo

Para cada ratio estudiado, 5 y 10 mL/g, se han hecho los ensayos a dos temperaturas diferentes, 30 y 50°C. En las figuras 3.11 y 3.12 donde se presenta la pérdida de azúcares con carbono activo, se observa que para un ratio dado, la temperatura solo tiene influencia cuanto mayor sea el ratio ya que a 5 mL/g no se aprecia apenas diferencia entre los resultados alcanzados para ambas temperaturas llegándose a perder hasta un 58%. Por otro lado, para el ratio de 10 mL/g se observa que la temperatura tiene una alta influencia en la pérdida de azúcares, ya que si se trabaja a temperatura de 30°C puede llegar a perderse hasta un 58% mientras que si se trabaja a temperaturas altas, el porcentaje de pérdida es de un 24% como máximo.

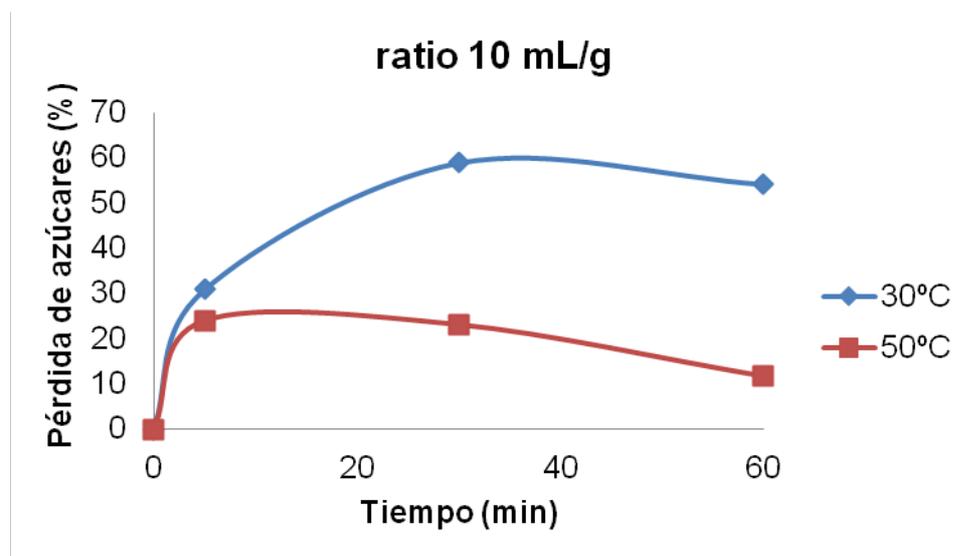


Figura 3.11. Pérdida de azúcares con el tiempo para el ratio 10 mL/g

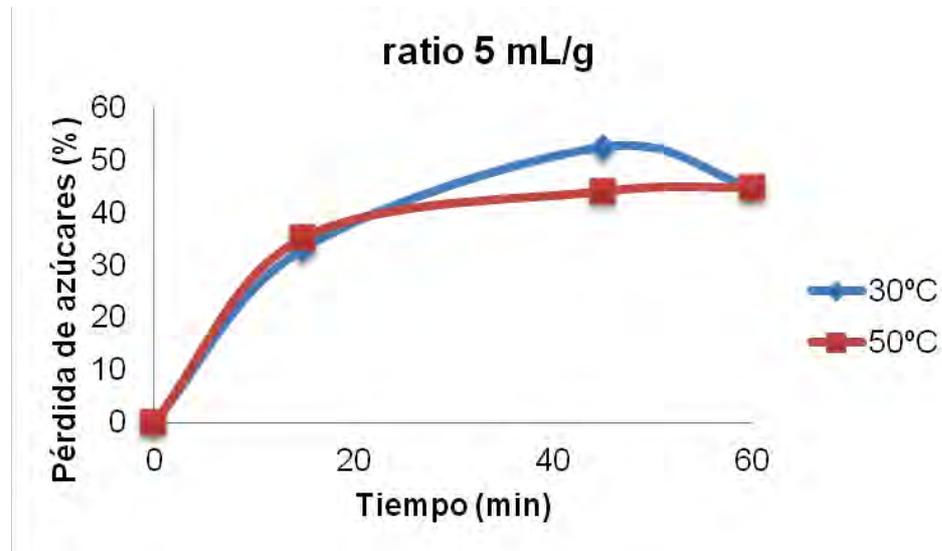


Figura 3.12. Pérdida de azúcares con el tiempo para el ratio 5 mL/g

El comportamiento del carbón activo en cuanto a la adsorción de OH fenólicos es igual que con azúcares, tal y como se puede observar en la figuras 3.13 y 3.14. Para un ratio bajo, la pérdida de OH no se encuentra influenciada por la temperatura ya que se llega a una eliminación máxima de 37% aproximadamente. Para el ratio de 10 mL/g, cuanto menor sea la temperatura mayor será la eliminación de OH fenólicos, a 30°C se llega a eliminar hasta un 40% lo que contrasta con la eliminación de OH a temperaturas más altas, donde el valor máximo alcanzado fue de 12%. El mismo comportamiento sigue también para la eliminación de ácidos y furanos, tal y como se muestra en las figuras 3.15 y 3.16. En estos dos casos, tras haber estado el licor diluido en contacto con el carbón activo, se encontraron ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural. El ácido acético resultó ser el mayoritario para todos los casos, mientras que los otros dos solo se encontraron en algunas muestras y en cantidades muy pequeñas comparadas con el ácido acético. Se considera que el carbón activo ha eliminado prácticamente la totalidad de los ácidos levulínico y fórmico.

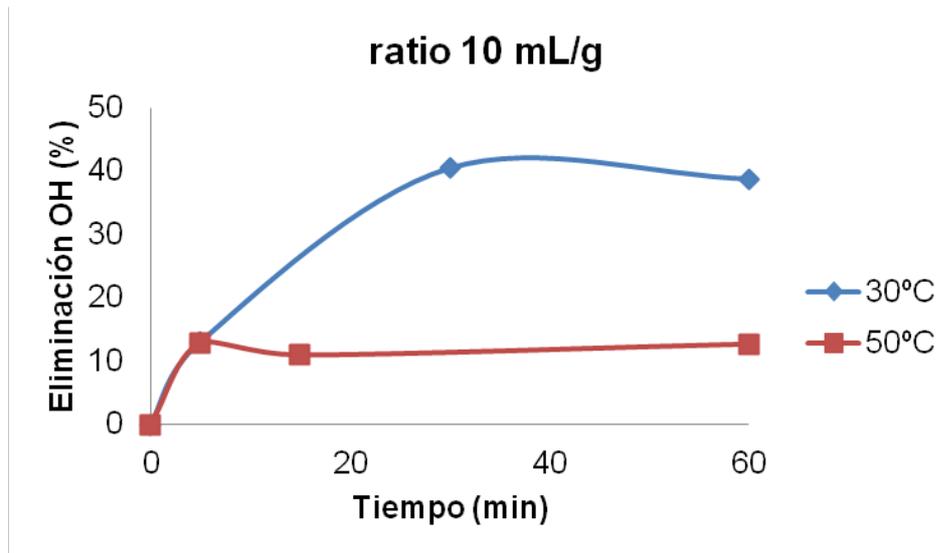


Figura 3.13. Eliminación de OH fenólicos con el tiempo para el ratio 10 mL/g

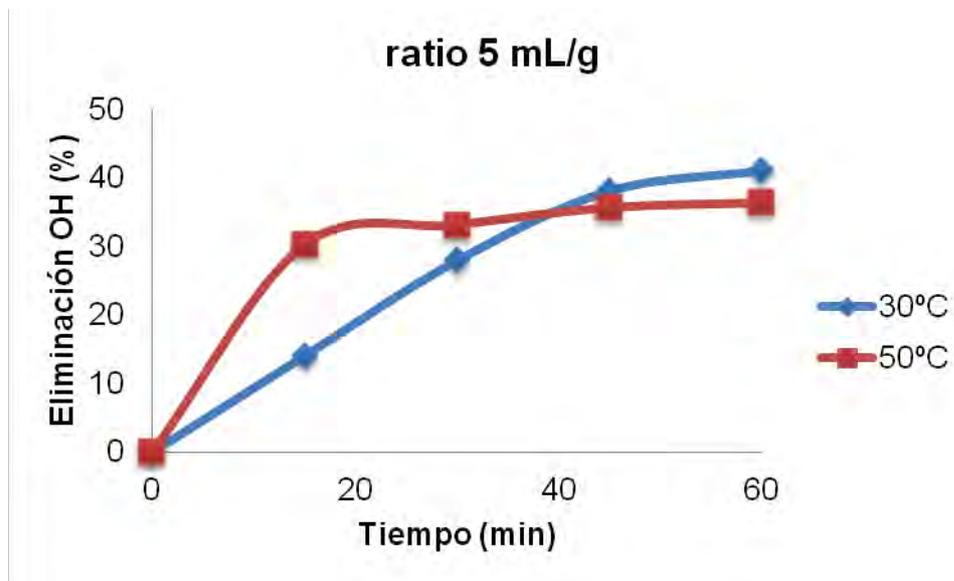


Figura 3.14. Eliminación de OH fenólicos con el tiempo para el ratio 5 mL/g

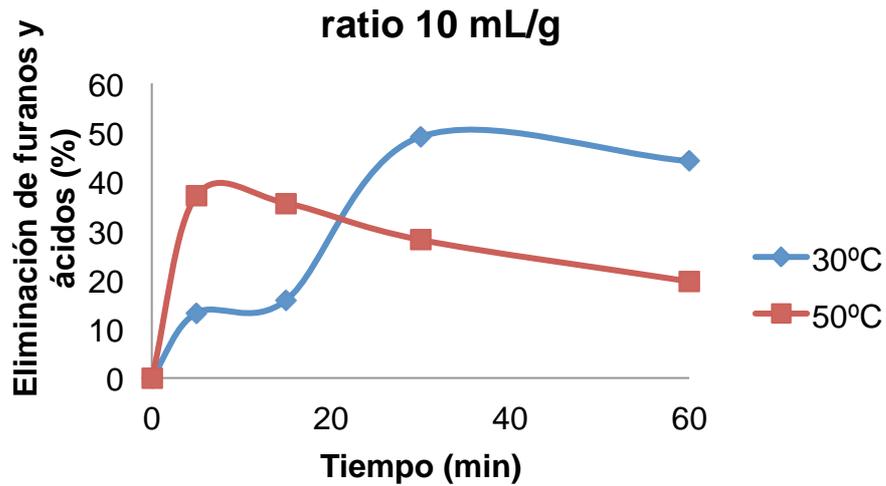


Figura 3.15. Eliminación de ácidos y furanos con el tiempo para el ratio 10 mL/g

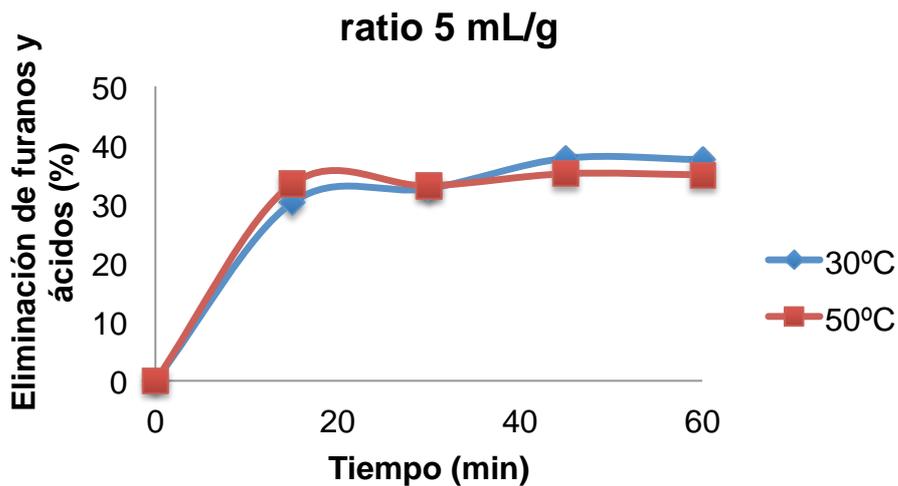


Figura 3.16. Eliminación de ácidos y furanos con el tiempo para el ratio 5 mL/g

A relaciones L/S bajas, 5 mL/g, se ha comprobado que la adsorción no es capaz de separar los lignosulfonatos presentes en las muestras a detoxificar, independientemente de la temperatura a la que se trabaje. Solo se dispone de datos de eliminación de lignosulfonatos para el ratio de 10 mL/g, para ratio de 5 mL/g no se observó que el carbón activo fuese capaz de adsorber lignosulfonatos. A la vista de los resultados que se muestran en la figura 3.17, se observa que para un mismo ratio, la temperatura más baja

favorece la eliminación de lignosulfonatos llegando a eliminarse hasta un 34% aproximadamente a los 60 minutos.

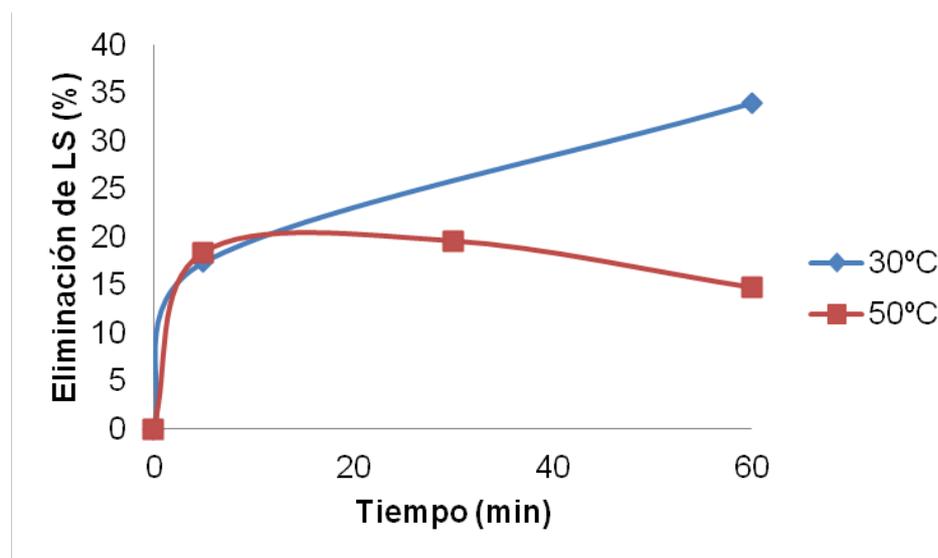


Figura 3.17. Eliminación de lignosulfonatos con el tiempo para el ratio 10 mL/g

### 3.3.3. Negro de Humo

En la bibliografía consultada (Coz, 2001) se ha utilizado el negro de humo como adsorbente en diferentes matrices sólidas. En este trabajo se ha estudiado la capacidad adsorbente de este sólido para eliminar los componentes no deseados en el licor gastado para la posterior etapa de fermentación. Se han planteado las mismas condiciones que para el carbón activo, ratios 5 y 10 mL/g, a 30 y 50 °C. Sin embargo, para las condiciones de 5 mL/g y 50 °C no hay datos ya que la cantidad de líquido era muy pequeña y la muestra se evaporó durante el ensayo.

#### 3.3.3.1. Efectividad del tratamiento con el tiempo

En la Figura 3.18 donde se representa la pérdida de azúcares con el tiempo, se puede concluir que ambos ratios para una misma temperatura siguen la misma tendencia, inicialmente la adsorción es muy alta lo cual corresponde con el salto de la curva, estabilizándose a continuación. Cuanto mayor es el ratio mayor es la pérdida de azúcares y se alcanza una pérdida del 17% para el ratio de 10 mL/g y de un 10% para el ratio de 5 mL/g.

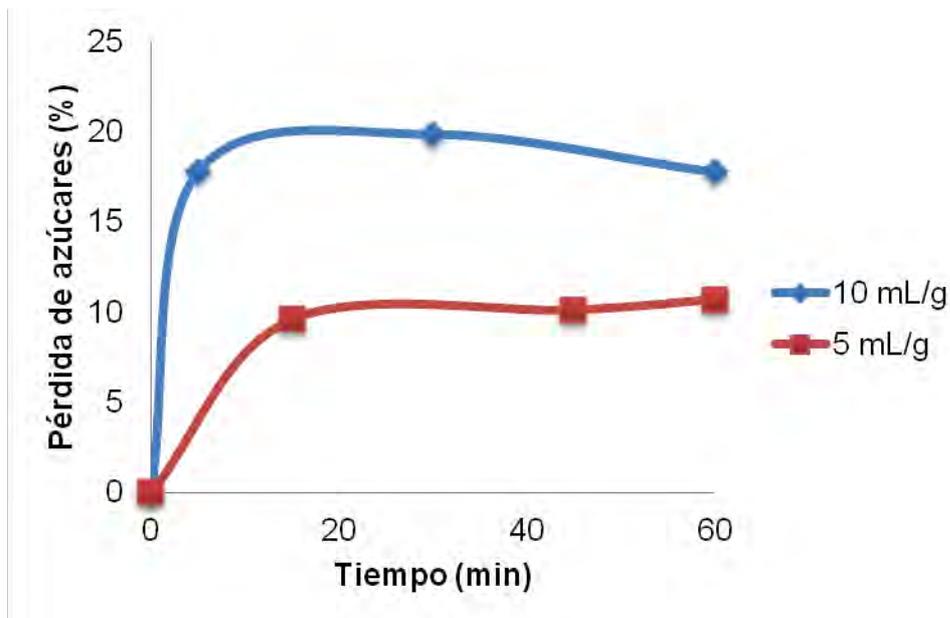


Figura 3.18. Pérdida de azúcares con el tiempo

En el caso de la eliminación de los OH fenólicos (Figura 3.19), teniendo en cuenta el ratio, se observa que la eliminación de OH fenólicos es mayor cuanto mayor es el ratio y si se atiende a la temperatura, se observa que ,para un mismo ratio, a mayor temperatura menor será la eliminación de OH fenólicos.

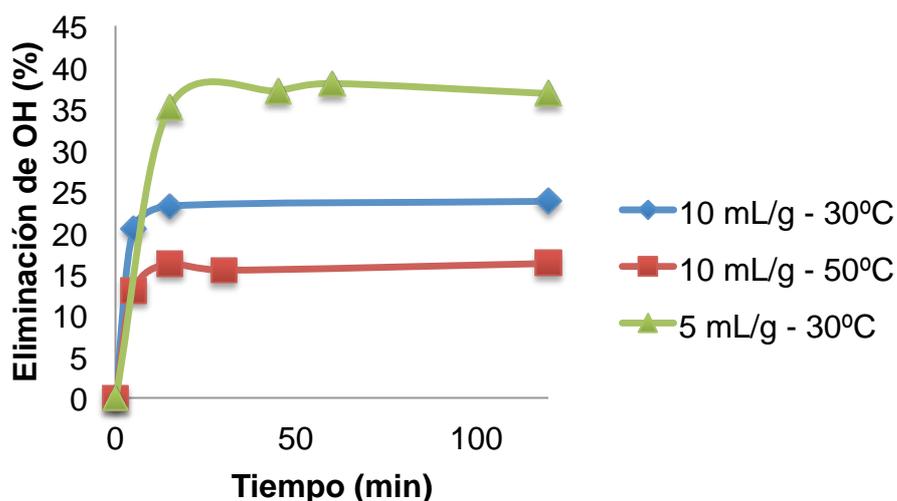


Figura 3.19. Eliminación de OH fenólicos con el tiempo

En la figura 3.20 se representa la eliminación de ácidos débiles y furanos en función del tiempo. Como se puede observar, para un mismo ratio, la temperatura prácticamente no influye a la hora de eliminar estos compuestos y tras una hora en contacto el negro de humo con la muestra, se ha alcanzado un valor máximo de eliminación de aproximadamente 18,5%.

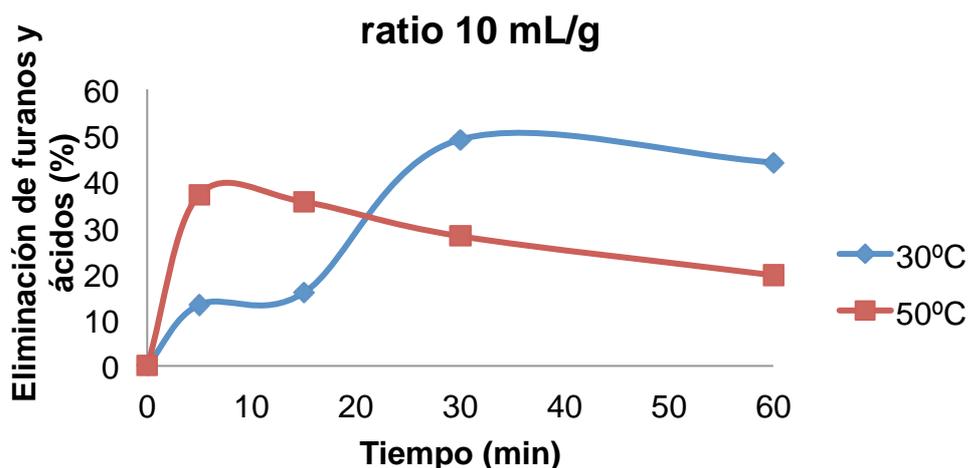


Figura 3.20. Eliminación de ácidos y furanos con el tiempo para el ratio 10 mL/g

La figura 3.21 corresponde a la eliminación de lignosulfonatos para ambas temperaturas estudiadas. Como se puede observar las tendencias entre ambas curvas para las diferentes temperaturas son muy similares, en primer lugar se adsorbe una mayor cantidad y después tiene una tendencia a estabilizarse, eliminándose más a 30°C (26%) que a 50°C (20%).

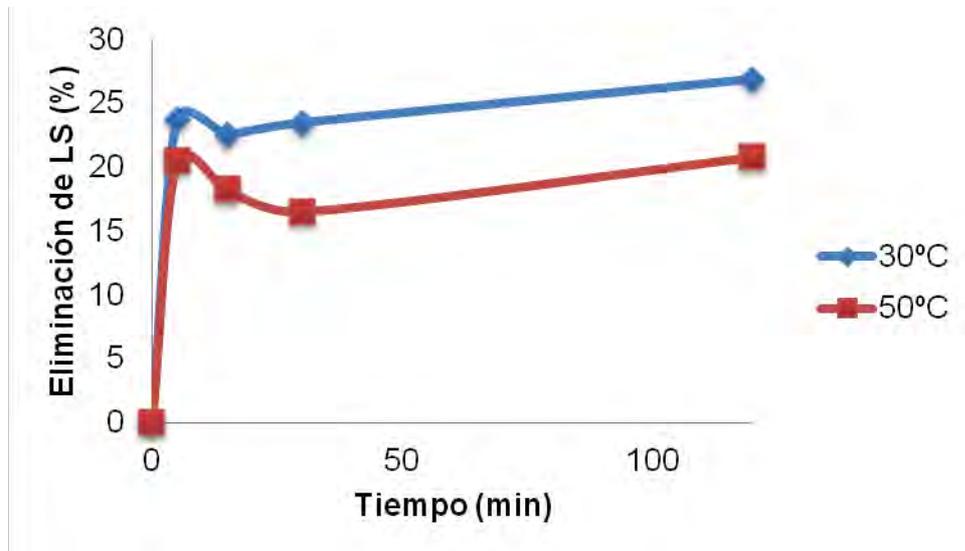


Figura 3.21. Eliminación de lignosulfonatos con el tiempo

### 3.3. Comparación de resultados

En este trabajo se han aplicado dos técnicas diferentes de detoxificación, el intercambio iónico con resinas catiónica, aniónica y combinación de ambas en serie, y la adsorción con carbón activo y negro de humo. A continuación se expone una comparación entre los resultados de resinas entre sí, los adsorbentes utilizados entre si, y una comparación entre ambas técnicas.

#### 3.3.1. Comparación entre resinas catiónica y aniónica.

En la tabla 3.5 se compraran los resultados obtenidos de los ensayos considerados óptimos para cada resina y para las resinas en serie., pudiéndose concluir que:

Entre una resina y otra

- En **azúcares** y **ácidos y furanos** se comportan de manera similar ya que los valores alcanzados se encuentran dentro del mismo rango.
- Si se atiende a la eliminación de **lignosulfonatos** y de **OH fenólicos** puede observarse que la diferencia es considerable, resultando

mucho más eficaz la resina aniónica a la hora de eliminar dichos compuestos.

#### Resinas en serie

- Utilizando las condiciones óptimas de trabajo establecidas para las resinas de forma individual, **serie 1**, se consigue **eliminar prácticamente todos los compuestos que inhiben el proceso**, aunque esto lleva a una **pérdida de azúcares muy elevada**.
- Aumentando el ratio L/S de la resina aniónica, **serie 2**, se consigue **eliminar una gran parte de LS, OH fenólicos ácidos débiles y furanos**, manteniendo una **pérdida de azúcares aceptable**, ya que se encuentra ligeramente por debajo del que se alcanza para cada resina de forma individual.

#### Resinas de forma individual y resinas en serie

- Si se toma la **serie 2** como **las mejores condiciones de trabajo**, se puede decir que de todos los experimentos planteados, presenta los **mejores resultados** ya que se eliminan más compuestos inhibidores y la pérdida de azúcares se mantiene dentro de los mismos valores.

Tabla 3.5. Comparación de resultados entre resinas

(%)	Pérdida de Azúcares	Eliminación de lignosulfonatos	Eliminación de OH fenólicos	Eliminación de ácidos y furanos
Catiónica 3 mL/g	36,14 ±1,66	22,66±0,35	17,37±0,47	43,47±0,36
Aniónica 2 mL/g	32,5±1,97	85,06±2,68	87,67±3,17	45,32±1,28
Serie 1				
C 3 mL/g	65,74±3,73	92,8±0,5	98,76±0,3	100
A 2 mL/g				
Serie 2				
C 3 mL/g	31,05±16,2	88,84±3,45	73,91±1,1	83,79±0,5
A 6 mL/g				

Las condiciones y comparaciones anteriores llevan a establecer que en el caso de trabajar solamente con una de las resinas, la mejor sería la aniónica ya que es la que mejor detoxifica además de que su pérdida de azúcares es ligeramente menor que la que se consigue con la resina catiónica. Si se trabaja en serie, la mejor de todas sería la serie 2.

### 3.3.2. Comparación entre adsorbentes

Para los ensayos de adsorción no se han establecido unas condiciones de trabajo óptimas basándose solo en azúcares y lignosulfonatos, sino que se ha estudiado la evolución de todos los componentes, para todos los casos. En la tabla 3.6 se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los adsorbentes.

Para el ratio de 10 mL/g, se observa que el carbón activo siempre provoca una pérdida de azúcares y que además es mayor cuanto menor sea la temperatura, esto es porque la capacidad de adsorción del carbón activo mejora cuanto menor sea la temperatura (Lenntech, 2014). En el caso del

negro de humo solamente se aprecia pérdida de azúcares cuando se está trabajando a una temperatura de 30°C, a 50°C se observó una pérdida mínima de azúcares para este ratio. En cuanto a los resultados de eliminación del resto de compuestos que se estudian, el carbón activo siempre consigue una mayor eliminación de los mismos. Podría decirse entonces que para un ratio fijado de 10 mL/g, el carbón activo es un mejor adsorbente para procesos de detoxificación, aunque provoca una mayor pérdida de azúcares que el negro de humo. Además esta adsorción se ve favorecida cuando se está trabajando a temperaturas bajas.

En el ratio de 5 mL/g no hay datos de todos los compuestos para negro de humo con lo cual no se puede establecer ninguna comparación entre adsorbentes. Solamente puede decirse trabajando a un ratio de 5 mL/g y a una temperatura de 30°C, se consiguió la misma eliminación de OH fenólicos tanto con un adsorbente como con el otro.

El Carbón Activo como adsorbente en proceso de detoxificación de licor gastado, previamente neutralizado, conlleva siempre una mayor pérdida de azúcares cuanto menor sea la temperatura de trabajo, lo mismo sucede con su poder como adsorbente de componentes indeseados para una posterior fermentación. Para poder establecer cuales serían las mejores condiciones de trabajo para el carbón activo a la vista de los resultados anteriormente expuestos, se seguirá el mismo criterio que para el caso de intercambio iónico, buscando una solución de compromiso entre la menor pérdida de azúcares posibles y la posible mayor eliminación del resto de compuestos. Al no haber datos de eliminación de lignosulfonatos para el ratio de 5 mL/g, finalmente, las condiciones de trabajo que se establecen como las mejores fueron, ratio 10 mL/g y temperatura 50°C, porque se pierde la menor cantidad de azúcares y se eliminan el resto de componentes en valores ligeramente por debajo de los alcanzados a 30°C.

En cuanto al negro de humo, teniendo en cuenta que solo se dispone de datos para el ratio de 10 mL/g, la temperatura de trabajo que se escogió como la mejor fue 50°C porque prácticamente no hay pérdida de azúcares y

la eliminación del resto de compuestos, aunque es menor que a 30°C, son valores ligeramente similares.

Tabla 3.6. Comparación de resultados de adsorción

(%)	Pérdida de Azúcares	Eliminación de Lignosulfonatos	Eliminación de OH Fenólicos	Eliminación de ácidos y furanos
10 mL/g – 30 °C				
Carbón Activo	56,54 ± 3,31	33,95 ± 1,5	39,63±1,2	46,6±3,51
Negro de Humo	18,48±1,2	24,17±1,87	22,5±1,75	16,9±2,04
10 mL/g – 50°C				
Carbón Activo	23,61±0,6	18,98±0,84	12,12±1,02	36,37±1,09
Negro de Humo	2,17±0,6	19,04±2	15,98±0,47	19,1±1,11
5 mL/g – 30°C				
Carbón Activo	48,33±5,36	NM	39,7±2,1	37,67±0,16
Negro de Humo	10,41±0,2	NM	36,77±1,2	NM
5 mL/g – 50°C				
Carbón Activo	41,77±5,33	NM	36,08±0,5	35,06±0,13
Negro de Humo	NM	NM	NM	NM

### 3.3.3. Comparación entre técnicas

En la figura 3.19 se comparan los 5 procesos de detoxificación que se han estudiado. Los datos representados corresponden a las condiciones de operación que se han establecido como las mejores basándose en el objetivo del proyecto en el cual se encuentra enmarcado este Trabajo Fin de Carrera.

Dependiendo de cual sea el objetivo del proceso donde se va a trabajar con la muestra detoxificada, puede resultar más o menos interesante que se eliminen unos u otros compuestos.

Si lo importante es mantener la máxima **concentración de azúcares**, el negro de humo, a las condiciones propuestas como mejores en este trabajo, sería la mejor opción, seguida por el carbono activo, resinas en serie, resina aniónica y resina catiónica.

En cuanto a la **eliminación de lignosulfonatos** del licor gastado, los resultados obtenidos con la resina aniónica y la combinación entre catiónica y aniónica, son mucho mejores que para el resto de procesos, ya que se puede eliminar entre un 85 y un 73% de estos compuestos, el siguiente mejor resultado sería el de la resina catiónica con una eliminación del 17,37%. Si lo importante es que se eliminen la mayor parte de lignosulfonatos la mejor técnica sería la resina aniónica.

Lo mismo sucede con los **OH fenólicos** obteniéndose también una diferencia muy significativa con respecto a las otras técnicas empleadas. En cuanto al **ácido acético y el furfural** se observa que para las resinas en serie se consigue eliminar hasta un 83%, cada resina por separado y el carbón activo se están más o menos en el mismo rango, con una eliminación de entre un 45 y un 36% siendo negro humo la técnica que menos selectividad hacia este compuesto presenta.

Con todo esto, se puede concluir que la técnica de **intercambio iónico** utilizando las resinas en serie, a pesar de que son las que mayor pérdida de azúcares tienen, se consigue **minimizar la presencia de compuestos inhibidores** con lo cual sería la mejor de las técnicas estudiadas en este trabajo.

La jerarquía que se podría establecer para escoger un método de detoxificación u otro, teniendo en cuenta el criterio seguido en este trabajo de *minimizar pérdida de azúcares, maximizar eliminación de lignosulfonatos* sería:

Resinas en Serie > Resina Aniónica>Resina Catiónica>

Carbón Activo>Negro de Humo

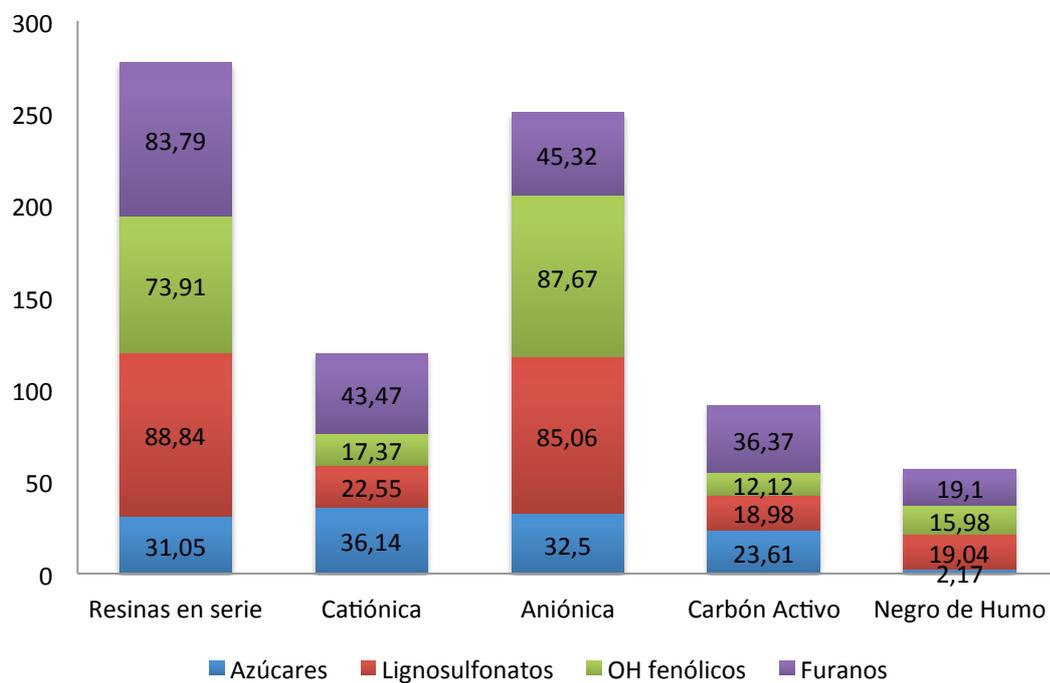


Figura 3.22. Comparación de los resultados entre técnicas

## 4. Conclusiones

---

## 4. Conclusiones

Tras los resultados obtenidos en los experimentos llevados a cabo durante este proyecto, y teniendo en cuenta el criterio seguido durante todo el trabajo para seleccionar las mejores condiciones experimentales: minimizar la pérdida de azúcares, maximizar la eliminación de lignosulfonatos, se establece lo siguiente:

- ✓ Las condiciones óptimas para intercambio iónico:

En la tabla 4.1 se presentan los mejores resultados para todos los casos de resina estudiados.

Tabla 4.1. Mejores resultados de intercambio iónico

Resina	Ratio (v/w)	Pérdida azúcares (%)	Eliminación lignosulfonatos (%)
Catiónica	3 mL/g	36,14 ±1,66	22,66±0,35
Aniónica	2 mL/g	32,5±1,97	85,06±2,68
Catiónica - Aniónica	3 mL/g + 6 mL/g	31,05±16,2	88,84±3,45

La resina catiónica se utiliza principalmente para eliminar metales, y ya se mostró en el apartado dedicado a los resultados que consigue una eliminación mayor al 90% de los mismos. En cuanto a la pérdida de azúcares, para los tres casos se pierden cantidades similares pero si se observa la eliminación de lignosulfonatos la combinación de resinas y la resina aniónica son las que mejor consiguen este objetivo. Con todo esto se puede concluir que **la mejor de todas las técnicas de intercambio iónico es la combinación de resinas en serie.**

- ✓ Las condiciones óptimas para adsorción:

En la tabla 4.2 se presentan los mejores resultados para todos los casos de resina estudiados.

Tabla 4.2. Mejores resultados de adsorción

<b>Adsorbente</b>	<b>Ratio (v/w)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Pérdida de azúcares (%)</b>	<b>Eliminación de lignosulfonatos (%)</b>
Carbón Activo	10 mL/g	50	23,61±0,6	18,98±0,84
Negro de Humo	10 mL/g	50	0	19,04±2

Aunque ya se comentó anteriormente que la capacidad de adsorción del carbón activo mejora a temperaturas bajas, esta mejora de adsorción no es selectiva ya que también provoca una alta pérdida de azúcares. Es por esto que se escogió la temperatura de 50 °C como la mejor para evitar una pérdida de aproximadamente el 50% cuando se trabajaba a 30 °C. Además, también se ha observado que el negro de humo es peor adsorbente que el carbón activo, aunque tiene un comportamiento muy similar a este ya que su capacidad de adsorción es más alta a temperaturas bajas.

- ✓ El orden para seleccionar que técnica de detoxificación sería la mejor para el criterio establecido: Resinas en Serie > Resina Aniónica> Resina Catiónica> Carbón Activo>Negro de Humo

## 5. Bibliografía

---

## 5. Bibliografía

- ❖ Lenntech B.V. [sitio web]. 2014. [consulta: 5 de septiembre de 2014]. <http://www.lenntech.es/adsorcion-carbon-activado.htm>
- ❖ AENOR. 2012. UNE-EN 16109: Determinación de micronutrientes complejados en fertilizantes. Identificación de lignosulfonatos.
- ❖ Ahmed, T.; Souad, A.; Tijani, B. 2014. Energetic byproducts of sugar industry. *1st International Conference on Composite Materials and Renewable Energy Applications*. Sousse, Túnez 22 – 24 Enero 2014.
- ❖ Almeida, J.; Modig, T.; Petersson, A. et al. 2007. Increased tolerance and conversión of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **82** pp. 340 - 349
- ❖ UAM. Universidad Autónoma de Madrid [sitio web]. 2014. [Consulta: 10 de agosto de 2014] *Apuntes de Experimentación en Ingeniería Química*  
[https://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/mgilarra/experimentacionI/QII/Intercambioionico2006.pdf](https://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mgilarra/experimentacionI/QII/Intercambioionico2006.pdf)
- ❖ Basaras, E. 2013. *Estado del arte de los procesos de detoxificación de recursos lignocelulósicos*. Coz, A. director. Trabajo Fin de Carrera. Universidad de Cantabria.
- ❖ Carvalheiro, F.; Duarte, L.C.; Lopes, S. et al. 2004. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Process Biochemistry*. **40** pp. 1215 – 1223.
- ❖ Chandel, A.; Da Silva, S.; Singh Om, V. 2011. Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production. En: Dos Santos, A. (ed.). *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*. ISBN-978-953-307-478-8.
- ❖ Chow, S. 1998. *Petroquímica y sociedad*. 2ª Edición. México: Fondo de Cultura Económica.
- ❖ Converti, A.; Domínguez, J.M.; Perego, P.; et al. 2000. Wood Hydrolysis and Hydrolysate Detoxification for Subsequent Xylitol Production. *Chemical Engineering Technology*. **11** pp. 1013 – 1020.

- ❖ Coz, A. 2001. *Comportamiento ambiental de lodos de fundición estabilizados/solidificados*. Andrés, A.; Irabien, A. directores. Tesis Doctoral. Universidad de Cantabria.
- ❖ Fernandes, D.L.A.; Silva, C.M.; Evtuguin, D.V. et al. 2012. Fractionation of sulphite spent liquor for biochemical processing using ion exchange resins. *Journal of Biotechnology*. Doi:10.1016/j.biotech.2012.03.013.
- ❖ García-Quevedo, N. 2013. *Análisis de polisacáridos en muestras de madera dura y pasta dissolving mediante su hidrólisis ácida y cuantificación con HPLC-IR*. Coz, A.; Llano, T.; directores. Trabajo Fin de Carrera. Universidad de Cantabria.
- ❖ Grzenia, D.; Dong, R.; Jasuja, H. et al. 2012. Conditioning biomass hydrolysates by membrane extraction. *Journal of Membrane Science*. **415-416** pp. 75-84.
- ❖ Llano, T. 2011. *Puesta a punto y análisis de azúcares e inhibidores de los licores gastados del proceso al sulfito*. Coz, A.; Quijorna, N.; directores. Trabajo Fin de Carrera. Universidad de Cantabria.
- ❖ López, F.; García, J.C.; Feria, M.J; et al. 2010. Biorrefinería de materiales lignocelulósicos Eucalyptus Globulus. *Boletín del CIDEU* **8-9** pp. 75 – 82.
- ❖ Mendivil, P. 2013. *Estudio de etapa de evaporación del licor gastado del proceso al sulfito y su utilización para la producción de bioetanol*. Ruiz, G. y Llano, T.; directores. Trabajo Fin de Carrera. Universidad de Cantabria.
- ❖ Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M. 1996. Charcoal adsorption of Wood hydrolysates improving their fermentability: influence of operational conditions. *Bioresource Technology* **57** pp. 179 – 185.
- ❖ Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M. 1997. Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology*. **21** pp. 18 – 24.

- ❖ Prinsen, P. 2013. *Caracterización química y estructural de lignina y lípidos de materiales lignocelulósicos de interés industrial*. Del Río, J.C. y Gutiérrez-Suárez, A., directores. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- ❖ RAE, 2014: Diccionario de la Real Academia Española. [Consulta: 12 de agosto de 2014] <https://www.rae.es>
- ❖ Sainio, T.; Turku, I.; Heinonen, J. 2011. Adsorptive removal of fermentation inhibitors from concentrated acid hydrolyzates of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. **102** pp. 6048 – 6067.