

Análisis de la deslignificación de bagazo de agave por organosol

López Bonilla Argelia, Quintana Vega Miriam Angelina, Campos Mendiola Roberto, Arenas Ocampo Martha Lucía, Jiménez Aparicio Antonio Ruperto, Camacho Díaz Brenda Hildeliza

Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Departamento de Biotecnología.
Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 6, calle Ceprobi No. 8,
Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, México, CP 62731.

alpezb@ipn.mx

Fecha de aceptación: 13 de agosto de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

En la industria de producción de tequila, se generan anualmente miles de toneladas anuales de bagazo de agave, en su mayoría de la especie *Agave tequilana* Weber, el cual es rico en moléculas lignocelulósicas. El presente trabajo describe los resultados obtenidos a partir de la extracción de las fracciones lignocelulósicas utilizando dos disolventes: etanol y ácido acético, al 40% (v/v), durante un tiempo de reacción de 5 h, empleando HCl al 0.1 % como catalizador a una temperatura de ebullición. Después de la cocción se separaron tres fracciones lignocelulósicas (fibra, pulpa y licor), con rendimientos de extracción del 60.77%, celulosa del 29.37% y lignina total en la pulpa del 60.02%, del proceso etanosolv, los grupos funcionales fueron determinados espectroscopía de infrarojo por transformada de Fourier. Por lo que a partir de los desechos de la industria tequilera se puede obtener productos de valor agregado, con posibles aplicaciones en la industria farmacéutica y de alimentos, entre otras.

Palabras clave: deslignificación, bagazo, organosolv.

ABSTRACT

In tequila production industry, are generated annually thousands of tons of agave bagasse, most of the species *tequilana* Weber *Agave*, which is rich in lignocellulosic molecules. This work describes the results obtained from the extraction of lignocellulosic fractions using two solvents: ethanol and acetic acid 40% (v:v), for a reaction time of 5 h, using HCl as a catalyst 0.1% to a boiling temperature. After this stage were obtained three lignocellulosic fractions (fiber, pulp and liquor), with extraction yields of 60.77%, 29.37% cellulose and lignin total 60.02% pulp by the process etanosolv, functional groups were determined spectroscopy separated Fourier transform infrared. As far as waste from the tequila industry can obtain value-added products, with potential applications in the pharmaceutical and food industries, among others.

Key words: deslignification, bagasse, organosolv.

INTRODUCCIÓN

El bagazo de agave es rico en moléculas lignocelulósicas, está conformado por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina. Estos constituyentes por si solos o sus derivados permiten obtener productos de mayor valor añadido y con una amplia variedad de aplicaciones tecnológicas dado que son susceptibles a separarse bajo esquemas de fraccionamiento integral empleando procesos de extracción sólido-líquido, por ejemplo los métodos "Kraft", "del sulfito" y "organosolv", de los cuales, el último es el más amigable con el ambiente (López *et al.*, 2010). Los procesos conocidos como "organosolv" usan disolventes orgánicos como medio de cocción, mezclados con agua y catalizadores ácidos o básicos. El proceso organosolv puede fraccionar al material lignocelulósico en celulosa, monosacáridos (fructanos y glucosa) y lignina.

La lignina es un polímero generado por la condensación al azar de los radicales de alcoholes aromáticos. Su estructura es difícil de definir, sin embargo, se sabe que contiene fundamentalmente tres alcoholes; coniferol, sinapílico y p-cumarílico. Además puede contener ácidos fenólicos, tales como cumárico y ferúlico, que están esterificados por los grupos alcohol. Ya que su degradación es difícil, esta particularidad hace que proteja a la celulosa y hemicelulosa de la hidrólisis enzimática por lo que se considera un compuesto recalcitrante (González *et al.*, 2005).

La síntesis de la lignina es un proceso de polimerización cuyos precursores son los alcoholes p-hidroxicinamílicos. Los enlaces presentes tanto en los anillos aromáticos como en las cadenas propílicas son: a) Enlace tipo éter: Forman grupos de tipo no condensado. Son los más frecuentes, el 40-60% de las unidades de lignina están formadas por enlaces β -o-4, menos frecuentes son las uniones α -o-4 y muy raras las uniones γ -o-4. b) Enlace carbono-carbono: Van a conducir a una alta condensación de la lignina, que no pueden producirse en el anillo aromático de las unidades tipo Siringil (por los grupos metoxilos). Los más frecuentes (5-20%) son las uniones de los carbonos de la posición 5 del anillo aromático. c) Enlace tipo éster: Se producen en la cadena propílica y son menos frecuentes. Las fracciones pueden ser utilizadas en diversas industrias de acuerdo a sus propiedades funcionales. En el presente estudio se realizó la extracción de material lignocelulósico a partir de bagazo de *Agave tequilana* Weber a través de un proceso organosolv.

METODOLOGÍA

Materia Prima

El bagazo de *Agave tequilana* Weber fue adquirido de la destiladora Yautli S.A. De C.V., ubicada en Yautepec, Morelos. El bagazo se secó a la intemperie (luz solar) durante un período de 3 a 4 días hasta obtener una humedad residual (b.s.) del 5%. Posteriormente se disminuyó el tamaño de partícula del bagazo de manera manual, hasta un tamaño de partícula aproximado de 0.8 cm de largo.

Extracción por medio del proceso organosolv

El proceso organosolv consiste en la cocción de la materia prima en disolventes orgánicos con el fin de que parte de la lignina se solubilice y las fibras se disgreguen, formando una suspensión. Se planteó establecer un proceso organosolv, con disolventes orgánicos (etanol y ácido acético) a una concentración de 40 % (v/v), durante 5 h. En cada experimento se utilizaron 10 g de bagazo de agave, empleando un volumen de 200mL de la disolución, utilizando como catalizador HCl al 0.1%; la reacción se llevó a cabo en un sistema de reflujo utilizando temperatura de ebullición. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la suspensión se filtró empleando una malla plástica con un tamaño de poro de aproximadamente 1.5 mm; la torta resultante fue la parte fibrosa (celulosa) del proceso, y en la pulpa se encuentra parte de lignina obtenida.

Rendimiento del proceso

El filtrado se centrifugó durante 45 minutos a 12,096 x g obteniendo una pulpa (lignina y hemicelulosa) y el licor, el cual se empleó para la recuperación del disolvente. Con ello se determinó el rendimiento del proceso utilizando la Ecuación 1.

$$\% \text{ del rendimiento del proceso} = ((1-Pf)/Pi) \dots \text{(Ec. 1)}$$

Donde:

Pf = peso final de la fracción fibrosa.

Pi = peso inicial del bagazo.

Determinación de Número Kappa (K)

Este método se aplicó para la determinación del grado de deslignificación de la pulpa etanosolv y de la pulpa acetosolv ("blanqueamiento"). El Número Kappa se define como el volumen (mL) de permanganato de potasio 0.1N consumidos por 1g de pulpa seca (Tasman y Berzins, 1957). En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se pesaron 0.05 g de la fracción de pulpa (b.s.), se adicionaron 45 mL de agua destilada, y empleando agitación magnética, se obtuvo una suspensión homogénea; posteriormente se inició la reacción adicionando 0.5 mL ácido sulfúrico 4N y 10 mL de permanganato de potasio 0.1 N dejando reaccionar la suspensión por un tiempo de 10 min manteniendo la temperatura constante a 25 °C. La reacción se detuvo adicionando 1 mL de una solución saturada de yoduro de potasio e inmediatamente el iodo liberado se tituló con tiosulfato de sodio al 0.02 N, usando una solución de almidón al 0.2%, como indicador cerca del "punto final" de la titulación, cada experimento se realizó por duplicado. Para el testigo de la reacción se empleó exactamente el mismo procedimiento anterior, pero sin la fracción de la pulpa. El Número Kappa se calculó de acuerdo a las Ecuaciones (2) y (3).

$$P = (((b-a)*N) / 0.1) \dots \text{(Ec. 2)}$$

$$K = ((p*f) / w) \dots \text{(Ec. 3)}$$

Donde:

K = Número Kappa.

f = factor para corregir a 50% al consumo de permanganato de potasio, obtenido de la norma: T 236-cm-85.

w = peso de muestra de pulpa seca (g).

p = cantidad de permanganato de potasio 0.1N consumida por la muestra (mL).

b = cantidad de tiosulfato consumido en la determinación del blanco (mL).

a = cantidad de tiosulfato consumido por la muestra ensayada (mL).

N = normalidad del tiosulfato de sodio.

Espectroscopia por infrarrojo mediante transformada de Fourier

Se analizaron las muestras por espectroscopia en infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR). Se utilizó un Espectrofotómetro Shimadzu, modelo IRAffinity-1, el cual dispone de un accesorio ATR

(Attenuated Total Reflection) con cristal de selenuro de zinc. Con los siguientes parámetros: Modo de medida: Transmitancia, No de Scans: 20, Resolución 4 cm^{-1} , en un intervalo de 600-4000 cm^{-1} .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proceso organosolv

Los resultados del proceso de extracción con los diferentes disolventes, se presentan en la Tabla 1, siendo las variables de respuesta evaluadas: *rendimiento del proceso*, *porcentaje de celulosa* y *porcentaje de lignina total*. Se encontró que la cantidad de lignina y rendimiento de extracción entre los disolventes estudiados presentaron diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 1. Variables de respuesta del proceso organosolv para cada disolvente evaluado.

Disolvente	Rendimiento del proceso (%)	Celulosa (%)	Lignina Total (%)
Etanol	60.77	29.37	60.02
Ácido acético	67.07	47.16	46.19

De acuerdo al estudio el tratamiento con etanol al 40% durante 5 h, presentó las mejores condiciones de extracción, debido a que se obtuvo el mayor porcentaje de lignina total presente en la pulpa, lo que implicó que se está generando un mayor fraccionamiento del material lignocelulósico. Sin embargo el rendimiento del proceso y el porcentaje de celulosa fueron menores. Esto se debe posiblemente a que el bagazo presentó una mayor liberación de lignina y hemicelulosa debido al proceso utilizado. Por lo tanto, las moléculas de celulosa presentes en la parte fibrosa quedaron más expuestas al tratamiento generándose así moléculas más pequeñas que pudieran estar presentes en la pulpa y licor (Saad *et al.*, 2008).

De acuerdo a Bonn *et al.*, (1988), el proceso de extracción organosolv habitualmente genera un mayor fraccionamiento del material lignocelulósico, dando como resultado moléculas más pequeñas de azúcares y de fenilpropano. Estos autores realizaron un análisis de las fracciones obtenidas durante un tratamiento hidrotérmico, seguido de un proceso organosolv de paja de trigo reportando la presencia de moléculas de ácidos orgánicos como: ácido fórmico, ácido glicérico, ácido láctico, ácido acético.

Como se comentó líneas arriba, el etanol en comparación con el ácido acético es un disolvente apropiado para el proceso organosolv, ya que las moléculas constituyentes del material lignocelulósico probablemente sólo presentaron una hidrólisis intermolecular (Ingram *et al.*, 2011), lo que involucró una despolimerización parcial del material lignocelulósico menos "agresiva", generando así moléculas de celulosa, lignina y hemicelulosa con mayor integridad estructural y con posibles distintas aplicaciones industriales.

Por otra parte el material lignocelulósico tratado con ácido acético presentó una hidrólisis que se infiere pudiese ser tanto intramolecular como intermolecularmente por lo cual las moléculas del material lignocelulósico presentaron un mayor grado de fraccionamiento y por lo tanto moléculas de menor tamaño. En este sentido, el análisis FTIR podrá corroborar esta característica.

Análisis espectroscopia infrarroja

Los resultados obtenidos a través del espectro FT-IR, se observa en la Figura 1 (A), para la pulpa Acetosolv como Etanosolv y bagazo de agave, muestran una banda localizada a 3330 cm^{-1} causada por el estiramiento de los grupos hidroxilo, característica de estructura poliméricas (Silverstein *et al.*, 2005). En los tres casos analizados se presentaron bandas 2929 cm^{-1} que corresponden a la vibración del enlace C-H en metil y metileno (CH_3 y $-\text{CH}_2-$) (Toledano, 2012; Iñiguez *et al.*, 2011), la banda a 1726 cm^{-1} representa la vibración del grupo C=O característica de aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos carboxílicos, indica la presencia de p-coumarico y ferulato (Iñiguez *et al.*, 2011; Silverstein *et al.*, 2005). Las bandas características de la lignina aparecen en la región de 1608 , 1512 y 1423 cm^{-1} que corresponde a la vibración de los anillos aromáticos de C=O, C-H. (Toledano, 2012; Iñiguez *et al.*, 2011; Stuart, 2004; Xiao *et al.*, 2001; Goncalves *et al.*, 1998), por lo que la banda 1367 cm^{-1} se da por el estiramiento C-H alifático en CH_3 (Zhao *et al.*, 2010).

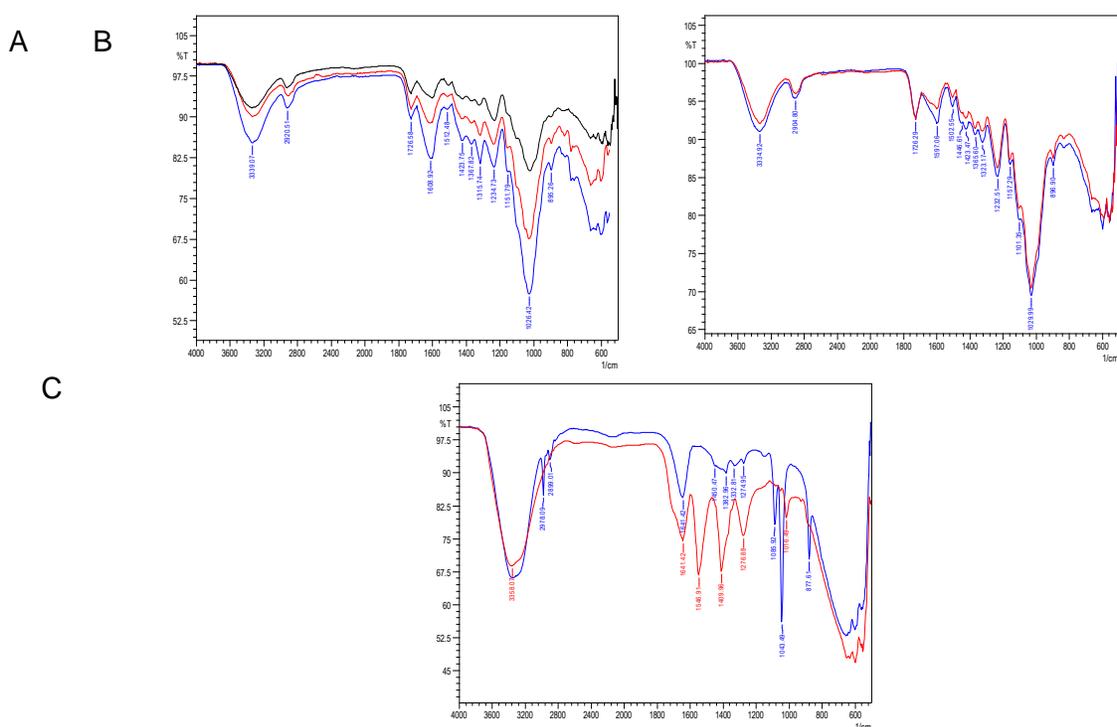


Figura 1. Espectro FT-IR A) bagazo de agave, pulpa acetosolv, etanosolv; B) bagazo acetosolv, etanosolv; C) licor acetosolv, etanosolv.

La banda a 1315 cm^{-1} es originado por la flexión O-H y flexión C-H, (Lan *et al.*, 2011). La banda localizada 1234 cm^{-1} propia del estiramiento C-O aromático. (Hage *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2006). La banda correspondiente a 1151 cm^{-1} denota el grupo C-H aromático en Guayacil (Seca *et al.*, 2000). Alrededor de 1000 y 1100 cm^{-1} comprende la absorción de los enlaces C-O los cuales son distinguibles para la lignina o celulosa (Goncalves *et al.*, 1998). La deformación de los enlaces aromáticos C-H en las subestructuras del guayacil, vibraciones complejas asociadas con C-O, estiramiento C-C y flexión C-OH en los polisacáridos se presenta alrededor de 1026 cm^{-1} . Finalmente la banda a 894 cm^{-1} corresponde a la deformación del enlace glucosídico β (1-4) de los enlaces entre glucosa y celulosa, (Sakdaronnarong y Jonglertjunya, 2012; Wu *et al.*, 2011).

En la figura 1 (B), se observan aún las bandas características de la lignina aparecen en la región de 1597, 1502 y 1426 cm^{-1} que corresponden a la vibración de los anillos aromáticos de C=O, C-H. También se presenta la banda a 1726 cm^{-1} representativa de la vibración del grupo C=O característica de aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos carboxílicos, como indicativo de que en el proceso de extracción no se extrajo completamente la lignina, corroborando así el rendimiento antes mencionado. Por su parte en la figura 1 (C) se presenta una banda alrededor de 3358 cm^{-1} se observa una banda causada por el estiramiento de los grupos hidroxilo, característica del agua y alcoholes además de las estructuras poliméricas, (Silverstein *et al.*, 2005). Las bandas a 2978 y 2899 cm^{-1} corresponden a la vibración del enlace C-H en metil y metileno (CH₃ y -CH₂-) (Toledano 2012; Iñiguez *et al.*, 2011), la banda observada a 1641 cm^{-1} muestra la flexión de OH, característica de la vibración de las moléculas del agua (Lan *et al.*, 2011; Lojewska *et al.*, 2005). Las banda 1276 cm^{-1} es originada por la flexión de -C-H, OH, o -CH₂ en el anillo guayacil y en el anillo siringil en 1332 cm^{-1} , (Buranov *et al.*, 2010). Bandas que se encuentran en el espectro del licor etanosolv, esto indica que hay aún presencia de ligninas solubilizadas en este medio.

CONCLUSIONES

El estudio realizado del proceso organosolv, con respecto al rendimiento del proceso, cuantificación de la lignina total, presente en la pulpa etanosolv / acetosolv, demostró que la mejor condición del proceso fue el uso del disolvente etanol al 40%, sin embargo de acuerdo al análisis FT-IR se observó que el proceso organosolv no fraccionó por completo el material lignocelulósico, ya que hay presencia de bandas características de la lignina en bagazo tratado con etanosolv.

REFERENCIAS

- Bonn G., Oefner, P., Bobleter O. (1988). Analytical determination of organic acids formed during hydrothermal and organosolv degradation of lignocellulosic biomass. *FreseniusZeitschrift für Analytische Chemie*, 331: 46–50.
- Buranov A., Ross K., Mazza G. (2010). Isolation and characterization of lignins extracted from flax shives using pressurized aqueous ethanol. *Bioresource Technology*, 101: 7446–7455
- Goncalves A., Esposito E., Benar P. (1998). Evaluation of *Panus tigrinus* in the delignification of sugarcane bagasse by FTIR-PCA and pulp properties. *Journal of Biotechnology*, 66: 177–185.
- González G. Y., González R. O., Nungaray A. J. (2005). Potencial del bagazo de agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. *e-Gnosis*, 3: 1–18.
- Hage R., Brosse N., Chrusciel L., Sanchez C., Sannigrahi P., Ragauskas A. (2009). Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from miscanthus. *Polymer degradation and Stability*, 94: 1632–1638
- Ingram T., Wormeyer K., Ixcaraguá L. C., Blokemuhl V., Antranikian G., Brunner G., Smirnova I. (2011). Comparison of different pretreatment methods. Parte 1: Conversion of rye straw to valuable products. *Bioresource Technology*, 102: 5521–5228.
- Iñiguez G., Valadez A., Manríquez R., Moreno M. (2011). Utilization of by-products from the tequila industry. Part 10: characterization of different decomposition stages of *agave tequilana* webber bagasse using FTIR. Spectroscopy, Thermogravimetric analysis and scanning electron microscopy. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 27: 61–74.

- Lan X., Liu C. F., Sun R. C. (2011). Fractionation of Bagasse into Cellulose, Hemicelluloses, and Lignin with Ionic Liquid Treatment Followed by Alkaline Extraction. *J. Agric. Food Chem.*, 59: 8691–8701.
- López F., García, J. C., Feria M. J., Zamudio M. A., Pérez A. (2010). Biorrefinería de materiales lignocelulósicos. *Eucalyptusglobulus. Boletín del CIDEU*, 8: 75–82.
- Sakdaronnarong C., Jonglertjanya W. (2012). Rice straw and sugarcane bagasse degradation mimicking lignocellulose decay in nature: An alternative approach to biorefinery. *ScienceAsia*, 38: 364–372.
- Saad M. B., Oliveira L. R., Candido R. G., Quintana G., Rocha G. J., Goncalves A.R. (2008). Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane Straw for organosolv pulping. *Enzyme and Microbial Technology*, 43: 220–225.
- Seca M. L. A., Cavaleiro A. S. J., Domingues M. J. F., Silvestre J. D. A., Dmitry E., Neto C. P. (2000). Structural Characterization of the Lignin from the Nodes and Internodes of *Arundo donax* Reed. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 817–824
- Silverstein R., Webster F., Kiemle. (2005). Spectrometric Identification of Organic Compounds. John Wiley & Sons Inc. p. 502.
- Stuart B. (2004). Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications. John Wiley & Sons, Ltd. p. 203.
- Tasman, J. E., Berzins, V. (1957). The permanganate consumption of pulp materials. *Pulp paper Mag. Canada* 58: 145.
- Toledano A. (2012). Lignin extraction, purification and depolymerization study. Memoria. Escuela Politécnica de San Sebastián.
- Xiao B., Sun X., Sun R. (2001). Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polymer Degradation and Stability*, 74: 307–319.
- Xu F., Sun J. X., Sun R., Fowler P., Baird M. (2006). Comparative study of organosolv lignins from wheat Straw. *Industrial Crops and Products*, 23: 180–193.
- Zhao X., Heide E., Zhang T., Liu D. (2010). Delignification of sugarcane bagasse with alkali and peracetic acid and characterization of the pulp. *BioResources*, 5: 1565–1580.