



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Degradación hidrotérmica del olote en
condiciones subcríticas y la identificación
de los productos químicos de valor
agregado**

Tesis

que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias en Biosistemática,
Ecología y Manejo de Recursos Naturales y
Agrícolas**

Presenta

Jhon Alexander Córdoba Arias

CO-DIRECTORES

Dr. Eduardo Salcedo Pérez

Dr. Ezequiel Delgado Fornué

ASESORES

Dr. Ramón Rodríguez Macías

Dr. Ricardo Manríquez González

Dr. Juan Francisco Zamora Natera

Zapopan, Jalisco

(20 de noviembre de 2014)

Albert Einstein dijo:

“No se debe pensar en el futuro, ya que llega demasiado pronto y es una locura hacer la misma cosa una y otra vez esperando obtener diferentes resultados. Finalmente la imaginación es más importante que el conocimiento”

Cuando terminé la licenciatura, soñé con ser doctor en un futuro no muy lejano y cuando ya comencé desarrollar mi tesis de doctorado, pensé que sería muy difícil lograr los objetivos planteados y veía que mi sueño de ser PhD, se cumpliría en un futuro muy lejano, sin embargo se cumplió más pronto de lo que yo pensé. En los momentos experimentales de mi tesis doctoral, estuve a punto de desfallecer porque repetí muchas veces los experimentos esperando encontrar algo diferente y fue allí cuando descubrí, que cuando hago todo bajo las mismas condiciones no puedo esperar a obtener resultados diferentes, independientemente de que todo era nuevo y desconocido para mí. Por último siempre imagine que no hay nada difícil de alcanzar y que con la ayuda de Dios y el apoyo de muchas personas, sobre todo la de mi familia, mi sueño finalmente se pudo hacer realidad, con la satisfacción y el deber cumplido.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este logro al Dios todo poderoso, por darme salud, inteligencia y perseverancia para alcanzar otro objetivo en mi vida, el de ser ¡Doctor en Ciencias!, ya que éste es el comienzo de una larga pero maravillosa carrera, en donde la dedicación y la persistencia son unas de las tareas que me ayudarán a ser grande en el campo de la investigación.

Con todo el cariño a mis padres Rufina Arias y José C. Córdoba, por ser los pilares de mí vida, por sus sabios consejos y la formación para realizarme como persona, además del constante espíritu de fe inquebrantable de mi madre, con el que me ha trasmitido su apoyo moral y espiritual para seguir adelante.

A mis hermanos Yenny, Jesús y en forma especial a José Alberto, también a mis tíos y demás familiares, quienes siempre estuvieron a las expectativas de mi desempeño académico-científico en un país que me hizo sentir como en casa, en donde nunca los defraude. A mis hijos Itzya Yarley y Daniel Alexander, que siempre ha sido mi motor de arranque y mi motivación para alcanzar mis metas, a Brenda Cisneros, que con su muestra de amor incondicional me reconfortó día tras día, con su tolerancia y paciencia para tratar de construir una familia, de verdad gracias por ser mi motivación. A todas aquellas personas y en especial a mi comité tutorial, por su apoyo incondicional, por su voluntad para realizar trámites no correspondientes a su labor. También, a la señora Rosa Ortiz, mis amigos y amigas, que siempre estuvieron a mi lado apoyándome, con sus oraciones y apoyo moral, gracias de todo corazón.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por no dejarme desfallecer y haber permitido que se cumpliera otro de mis más grandes sueños. A mi familia por estar siempre conmigo, en especial a mis padres José y Rufina. A mis hermanos: José Alberto, Yenny Patricia y Jesús Orlando. A mis encantadores sobrinos: Alex David, Lina Marcela, Alejandra y Carlos Santiago. Un agradecimiento muy especial a Lisneider Hinestroza, mi adorable cuñada y comadre, por su colaboración y apoyo moral desde la distancia, a Lida Martínez, por ese amor sincero, por tu lealtad y respeto que siempre me mantuvieron fortalecido en la distancia.

A al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar los cuatro años en que adelante mis estudios de Doctorado, a la Universidad de Guadalajara y el Doctorado BEMARENA por darme la oportunidad de crecer profesionalmente.. A la Universidad Tecnológica del Chocó, en cabeza del señor Rector Eduardo Antonio García Vega, por el respaldo y apoyo, además de brindarme un futuro laboral. A los mexicanos que los siento parte de mi familia, Juan Manuel (y familia) José Miguel Aceves (y familia), Oscar Bravo Jr. (y padres), Fernando Villarruel.

A mis profesores y amigos guías Dr. Ezequiel Delgado y Dr. Ricardo Manríquez, Dr. Eduardo Salcedo, Dr. Ramón Rodríguez, Dr. Juan Francisco Zamora, por su paciencia, ayuda y tiempo incondicional, los nuevos conocimientos adquiridos han sido gracias a todos ustedes. Al M.C. Héctor Contreras y el Dr. Alfredo Escalante y el Dr. Jorge Robledo, por toda experiencia transmitida incondicionalmente durante mi formación como estudiante de doctorado, que mi Dios les pague... A todos los profesores y personal de los laboratorios del DMCyP y el CUCBA, que contribuyeron en mi formación: Dr. José Anzaldo, Dra. Yolanda, Angélica Iturría, Lourdes Arellano. A mis lectores por su ayuda, tiempo, comprensión y valiosas aportaciones... A los trabajadores del DMCyP en especial a Polo (mi apá) por la elaboración de los reactores, prestamos de herramientas y los buenos momentos compartidos, el Ruso por suministrar la materia prima (olote) y Memo (carnal) por su colaboración y amistad... A Graciela, encargada del centro de documentación por su ayuda y apoyo incondicional... Gracias a todos. Además expresarles mi gratitud a todos los estudiantes tesis, servicio social e integrantes del grupo de biomateriales encabezado por Ángel Andrade y Carlos Ramírez y a mis compañeros de estudios que me brindaron su ayuda incondicional.

CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
CONTENIDO.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ANTECEDENTES.....	3
1.2. Tratamiento hidrotérmico.....	3
1.3. Parámetro de severidad.....	10
1.4. Alcance del estudio.....	10
2. HIPÓTESIS.....	12
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo general.....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
4.1 Diagrama metodológico.....	14
4.1.1 Obtención de materia prima, molienda y clasificación por tamaño de partículas.....	14

4.2 Caracterización química del olote.....	15
4.2.1. Determinación del contenido de humedad	15
4.2.2 Determinación de cenizas.....	15
4.2.3 Determinación de lignina Klason en muestra de olote	16
4.2.4. Determinación de holocelulosa.....	16
4.2.5. Determinación de pentosanos.....	17
4.2.6. Determinación de celulosa Cross Bevan (α -celulosa) en holocelulosa.....	18
4.2.7. Determinación de carbohidratos del olote mediante HPLC.....	18
4.3. Aislamiento de lignina Björkman de olote.....	20
4.3.1. Aislamiento de xilana de olote a partir de holocelulosa.....	20
4.3.2. Análisis de RMN- ¹³ C de xilana aislada de olote.....	21
4.4. Determinación de las condiciones de hidromódulo, temperatura y tiempo de reacción, para la degradación hidrotérmica del olote.....	21
4.4.1. Diseño estadístico para el tratamiento hidrotérmico del olote.....	22
4.4.2. Cuantificación de grupos carboxílicos y concentración de carbohidratos.....	23
4.5. Análisis de la fracción insoluble del olote mediante FTIR-ATR.....	24
4.5.1. Evaluación del factor de severidad.....	25
4.5.2. Relación de la concentración de azúcares totales generados en el hidrolizado de olote con las variables de reacción.....	25
4.6. Tratamiento hidrotérmico y condensación con urea de los biopolímeros xilana y celulosa del olote.....	25

4.7. Tratamiento hidrotérmico del olote y condensación con urea- ¹⁵ N.....	26
4.7.1. Técnicas analíticas empleadas para el análisis del olote condensado con urea.....	26
4.7.1.1. Análisis de Nitrógeno Total Kjeldahl (TKN) mediante espectrofotometría UV vis.....	26
4.7.1.2. Análisis Elemental de las muestras de olote condensadas con urea.....	28
4.7.1.3. Análisis de infrarrojo FTIR-ATR a muestras de olote condesando con urea.....	28
4.7.1.4. Análisis de RMN- ¹³ C y ¹⁵ N del olote condensado con urea marcada al 10% con ¹⁵ N.....	28
5. RESUSLTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
5.1. Caracterización química del olote.....	30
5.2. Análisis de FTIR-ATR.....	33
5.2.1. FTIR-ATR de la xilana aislada de olote.....	33
5.2.2. FTIR-ATR de lignina de olote aislada mediante extracción con dioxano.....	34
5.2.3. RMN- ¹³ C de la xilana aislada de olote.....	34
5.3. Degradación hidrotérmica del olote.....	37
5.4. Evaluación de la eficiencia del tratamiento hidrotérmico en el olote para la generación de grupos carboxílicos en la fracción soluble mediante FTIR-ATR.....	38
5.4.1. Factor de severidad (R0).....	39
5.4.2. Rendimientos de solidos insolubles en la generación de grupos carboxílicos.....	40
5.4.3. Concentración de grupos carboxílicos en la fracción soluble de olote.....	41
5.4.4. Azúcares totales en la fracción soluble de olote después del tratamiento hidrotérmico.	42

5.5. Análisis de la xilana y celulosa de olote después del tratamiento hidrotérmico y condensación con urea, mediante FTIR-ATR y RMN- ¹³ C.....	44
5.5.1. Análisis utilizando la técnica FTIR-ATR para xilana de olote tratada hidrotérmicamente y condensada con urea.....	44
5.5.2. Análisis utilizando la técnica FTIR-ATR para celulosa de olote condensada con urea...	44
5.5.3. Análisis de RMN- ¹³ C de sólidos de xilana de olote tratada hidrotérmicamente y condensada con urea.....	46
5.5.4. Análisis de RMN- ¹³ C de sólidos de celulosa de olote tratada hidrotérmicamente y condensada con urea.....	46
5.6. Análisis de nitrógeno total Kjeldahl (TKN) en los productos de los tratamientos hidrotérmicos de olote seguidos de condensación con nitrógeno marcado (isótopo ¹⁵ N) H ₂ NCONH ₂	48
5.6.1. Análisis Elemental.....	49
5.6.2. FTIR-ATR del olote condensado con urea marcada.....	49
5.6.3. Análisis de RMN- ¹³ C de sólidos del producto condensado con urea.....	50
5.6.4. Análisis de RMN- ¹⁵ N sólidos del producto condensado con urea.....	51
6. CONCLUSIONES.....	53
7. LITERATURA CITADA.....	55
ANEXO A: Artículo científico de la tesis doctoral “Caracterización y valoración química del olote: Degradación hidrotérmica bajo condiciones subcríticas”, en la <i>Revista Latinoamericana de Química</i> . Vol. 41(3): 173-184 (2013).	171-184
ANEXO B: Artículo científico de la tesis doctoral “Aislamiento, caracterización química y uso potencial de la xilana de olote de maíz” en la <i>Revista investigación, biodiversidad y desarrollo</i> Vol. 32 (1): 49-59- (2013).	60-68

INDICE DE FIGURAS

No.	Títulos	Pág.
1	Diagrama de metodológico de las etapas del proceso de investigación.....	14
2	Equipo para la determinación de pentosanos.....	17
3	Tratamiento hidrotérmico del olote en mufla y reactores tipo bala.....	22
4	Equipo detector de carga polielectrolítica PCD-03 Mütek.....	23
5	Tratamiento hidrotérmico y condensación del olote en una etapa en un reactor Parr.....	26
6	Distribución del tamaño de partícula de olote molido.....	30
7	Carbohidratos presentes en holocelulosa de olote analizados mediante HPLC de un hidrolizado ácido.....	32
8	Espectro FTIR- ATR de xilana aislada de olote mediante hidrólisis alcalina.....	33
9	Espectro FTIR-ATR de lignina al dioxano de olote.....	35
10	Espectro RMN-13C de xilana de olote con ampliación de la zona entre 110 a 55ppm.....	36
11	Rendimiento de la fracción insoluble del olote después del tratamiento hidrotérmico (primer diseño experimental).....	37
12	Espectros FTIR-ATR de olote: a) sin tratar; b) olote tratado hidrotérmicamente a 230°C/45 min/30 mL de agua; c) 300°C/45 min/20 mL y d) 300°C/45 min/25 mL.	39
13	Rendimiento de sólidos insolubles resultante del tratamiento hidrotérmico del olote y su relación con el factor de severidad (Ro).....	40
14	Rendimiento de la fracción insoluble del olote después del tratamiento	

	hidrotérmico (segundo diseño experimental).....	41
15	Concentración de grupos carboxílicos en fracción soluble de olote tratado hidrotérmicamente (meq/100 g).....	42
16	Azúcares totales en la fracción soluble de olote después del tratamiento hidrotérmico (mg/mL).....	43
17	Espectro de FTIR-ATR de xilana de olote sin tratar y xilana condensada con urea.	45
18	Espectro de FTIR-ATR de celulosa de olote sin tratar y celulosa tratada hidrotérmicamente condensada con urea.....	45
19	Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹³ C xilana de olote condensada con urea.....	46
20	Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹³ C celulosa de olote condensada con urea.....	47
21	Espectro de FTIR-ATR olote condensado con urea- ¹⁵ N granulada.....	50
22	Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹³ C de sólidos del olote condensado con urea marcada.....	51
23	Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹⁵ N de sólidos del olote condensado con urea marcada granulada.....	52

INDICE DE TABLAS

No.	Títulos	Pág.
1	Comparación de la composición química del olote (%) del presente estudio (en el recuadro rojo) con datos reportados por otros autores.....	31
2	Bandas (cm-1) de FTIR para el olote modificado hidrotérmicamente.....	38

RESUMEN

En la presente investigación se estudió el efecto de un pretratamiento hidrotérmico del olote bajo condiciones subcríticas (160, 230 y 300°C, presión de 1.2, 3.7 y 84.8 atm y tiempos de 30, 45 y 60 min) con el propósito de solubilizar la porción de hemicelulosas, principalmente xilanas, y generar grupos carboxilos y aldehídos, útiles para la fijación de nitrógeno en una posterior reacción de condensación con urea. Se determinó el rendimiento en masa de la fracción insoluble del olote y la concentración de grupos carboxílicos en la fracción soluble. También fueron aislados y caracterizados los principales biopolímeros (lignina, celulosa y xilanas). Finalmente se estudió la fijación de nitrógeno, mediante la condensación de urea sobre olote tratado hidrotérmicamente. El estudio indicó que el olote contiene celulosa 45%, lignina 15.8% (p-hidrofenoilo, guaiacilo y siringilo) y hemicelulosas 33.6% de las cuales el 94% es xilana. En la degradación hidrotérmica, los factores que tuvieron efectos significativos sobre el rendimiento fueron la temperatura y el tiempo de reacción, mientras que la temperatura es el único factor que tuvo influencia directa sobre la generación de grupos carboxílicos, mostrando un contenido máximo en la fracción soluble de 29.3 meq/100 g de olote. En este proceso aproximadamente el 50% del olote fue convertido a productos solubles en agua. El producto tratado hidrotérmicamente fue condensado con urea-¹⁵N (14% con respecto al olote base seca). La matriz sólida se analizó utilizando TKN (Nitrógeno Total Kjeldahl), análisis elemental, FTIR y RMN- ¹³C y ¹⁵N. El TKN indicó que el 7% que se fijó correspondió a 49,5% del total de ¹⁵N. La relación C/N varió de 19,5 a 20,8. Espectros FTIR y RMN demostraron la presencia de ¹⁵N en diferentes formas. En RMN-¹³C, se observaron señales de grupos carbonilo formados durante el proceso de condensación y de especies nitrogenadas en la celulosa, que pueden ser atribuidas a carbamatos o uretanos. Estas especies de nitrógeno también fueron corroboradas por RMN-¹⁵N, además de amidas y grupos amino. Las especies representan 83,9% de amidas y 16,1% de aminas del total de nitrógeno (7%) de la muestra. Este estudio demostró la factibilidad de enriquecer con urea el olote tratado hidrotérmicamente, en el cual el nitrógeno fue incorporado a través de varias formas químicas. Este producto podría mejorar los aspectos físicos, químicos y biológicos del suelo cuando se utilice como fertilizante orgánico de liberación lenta de nitrógeno.

Palabras Claves: Olote, matriz polimérica, fertilizantes, RMN-¹³C y ¹⁵N.

ABSTRACT

In this research we studied the effect of a hydrothermal pretreatment of corncob under subcritical conditions (160, 230 and 300 ° C, pressure of 1.2, 3.7 and 84.8 atm and times of 30, 45 and 60 min) with the purpose of solubilizing the portion of hemicelluloses, mainly xylans, and generate carboxyl groups and aldehydes, useful for nitrogen fixation in a subsequent condensation reaction with urea. Yields of the insoluble and soluble fraction of the corncob were determined, as well as the concentration of carboxylic groups in the soluble fraction. The main biopolymers (lignin, cellulose and xylans) were also isolated from corncob and characterized. Finally we studied the fixation of nitrogen onto the pretreated corncob by condensation with urea. The study indicated that the cob contained 45% of cellulose, lignin 15.8% and hemicelluloses 33.6%, of which 94% was xylan. In the hydrothermal degradation, factors that had significant effects on performance were the temperature and reaction time, while the temperature was the only factor that had direct influence on the generation of carboxylic groups, showing a maximum content in the soluble fraction of 29.3 meq/100 g. In this process, approximately 50% of the corncob was converted to water-soluble products. Samples of hydrothermally-treated product was condensed with urea ^{15}N (14% with respect to the corncob dry basis). The solid matrix was analyzed using TKN (Total Kjeldahl Nitrogen), elemental analysis, FTIR and NMR- ^{13}C and ^{15}N . The TKN results indicated that total nitrogen was 7%, which corresponded to 49.5% of the total ^{15}N added to the reactor. The C/N ratio varied from 19.5 to 20.8. FTIR and NMR Spectra showed the presence of ^{15}N in different chemical forms. From NMR- ^{13}C spectra, it was observed the presence of carbonyl group signals, probably formed during the process of condensation and of nitrogen species in cellulose, which can be attributed to carbamates or urethanes. These nitrogen species were also corroborated by NMR- ^{15}N , besides amides and amino groups. Amides constituted 83.9% and amine groups 16.1% of the total nitrogen fixed (7%). This study demonstrated the feasibility of enriched corncob hydrothermally-treated corncob with urea, in which nitrogen was incorporated through various chemical forms. This product could improve the physical, chemical, and biological aspects of soil when it is used as a slow-release-organic nitrogen fertilizer.

Key words: Corn cob, polymer matrix, fertilizers, ^{13}C and ^{15}N -NMR.

I. INTRODUCCIÓN

Los materiales lignocelulósicos no maderables son interesantes porque constituyen una fuente abundante y renovable, como materia prima alternativa para la producción de biocombustibles (Ingram y *col.*, 1998; Dien y *col.*, 2003). También son atractivos por su bajo costo y alta disponibilidad en diversos climas y localidades. Entre esos materiales está el olote, proveniente del cultivo de maíz (*Zea Mays*), el cual es una gramínea anual originaria de América e introducida en Europa en el siglo XVI.

Actualmente, el maíz, es el cereal con mayor volumen de producción en el mundo, superando al arroz y el trigo. Según datos de la FAOSTAT (2012), su producción en el mundo fue de 844.405.181 toneladas, lo que representa una alta generación de residuo de olote, calculada en 144 millones de toneladas, si se tiene en cuenta que por cada tonelada de maíz que se produce se generan 170 kg de olote (CIMMYT, 1995). México ocupa el cuarto lugar en producción en el mundo. La producción de maíz en México ocupa el 34.3% de la superficie agrícola y para el 2010, se reportó una cosecha de 23 millones de toneladas (FAOSTAT, 2012).

Particularmente en México se están generando miles de toneladas de este residuo en la producción agrícola, lo que en promedio representa cerca de 4 millones de toneladas anuales de olote, que pudieran ser aprovechados mediante la conversión en productos químicos de valor agregado.

El término residuo hace alusión a aquellas materias originadas en las actividades de producción y consumo que no han alcanzado, en el contexto en que se producen, ningún valor económico; ello puede deberse tanto a la falta de tecnología adecuada para su aprovechamiento, como a la inexistencia de un mercado para los productos recuperados (Costa y *col.*, 1991).

Desde el punto de vista de la composición química, el olote es interesante, teniendo en cuenta que tiene, aparte de celulosa (65%) y lignina (16%), altos contenidos de hemicelulosas (31%) (Córdoba y *col.*, 2010).

Entre los usos y aplicaciones que se le ha dado al olote, se encuentran la utilización como forraje para rumiantes, soporte para disminuir la erosión en la tierra y también como sustratos para la producción de la enzima xilanasas (Knob and Cano-Carmona, 2010). Sin embargo, hay pocos reportes en la literatura sobre su potencial para la obtención de compuestos orgánicos (Córdoba y *col.*, 2010, Radlein y *col.*, 1997) u otros productos de uso industrial (Ingram y *col.*, 1998, Dien y *col.*, 2003, Gray y *col.*, 2006).

Se ha señalado que el camino hacia un desarrollo sostenible, debería estar basado en la búsqueda y utilización de nuevas fuentes de recursos diferentes a la madera y el petróleo, entonces el olote como residuo agroindustrial, se destaca de manera relevante por su componente lignocelulósico. Sin embargo, el principal impedimento para su utilización es la falta de una tecnología de bajo costo para degradar la fracción recalcitrante de la biomasa.

Tradicionalmente para la conversión de los materiales lignocelulósicos y la obtención de productos químicos de valor agregado, se ha recurrido a métodos químicos (hidrólisis con ácidos minerales) y/o enzimáticos (Duff y Murray, 1996), explosión con vapor (Clark y Mackie, 1987), tratamientos con ozono, peróxido alcalino y la oxidación húmeda (Córdoba y *col.*, 2010). Destaca entre estos la explosión con vapor, como uno de los métodos más investigados y utilizados, llevado ya a escala piloto y comercial. En este método el proceso es catalizado con agentes químicos (gases o líquidos) tales como SO₂, H₂SO₄, CO₂, ácido oxálico, etc., con los que se impregna la biomasa previamente al tratamiento con vapor (Puri y Mamers, 1983).

Los métodos anteriores de conversión, incluyendo la explosión con vapor, presentan algunos inconvenientes y son costosos en materia de reactivos y consumo de energía,

teniendo en cuenta que frecuentemente incluyen etapas de neutralización y separación (en los casos donde se utilizan catalizadores) y/o problemas de corrosión, entre otros. El proceso de tratamiento hidrotérmico que se presenta en esta investigación es interesante por su simplicidad, eficiencia, bajo costo y beneficios ambientales. En este contexto, se propone estudiar el tratamiento hidrotérmico bajo condiciones subcríticas en el olote, para generar productos solubles en agua que contengan grupos ácidos y aldehídos, los cuales serían los productos de interés para fijar nitrógeno en una posterior etapa de reacción, mediante la condensación con urea.

1.1 Antecedentes

1.2 Tratamiento hidrotérmico

La utilización de agua a condiciones subcríticas como medio de reacción ofrece una amplia variedad de posibilidades en el campo de la química, debido a las grandes variaciones de sus propiedades físico-químicas alrededor del punto crítico con cambios moderados de temperatura y presión o densidad (González, 2003). Las propiedades de densidad, capacidad calorífica y de conductividad térmica son cercanos a la fase líquida, siendo la presión una propiedad importante para mantener la estabilidad térmica en la operación del reactor, mientras que la conductividad térmica indica una mayor transferencia de energía en el medio de reacción respecto de lo que ocurriría con un solvente en fase vapor (González, 2003).

En general, el agua cuando está cerca al punto crítico tiene una constante dieléctrica (ϵ) de 78.5, que permite llevar a cabo reacciones que habitualmente se desarrollan en solventes orgánicos (muchos de los cuales están siendo prohibidos por normas medioambientales que regulan las emisiones de desechos).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, se piensa que el agua alrededor del punto crítico presenta bondades con un potencial promisorio como medio para efectuar diversos tipos de reacciones. Desde el punto de vista químico, se ha dicho que cuando se trabaja por

debajo del punto crítico del agua (punto crítico 374°C y 218 atm), las reacciones hidrotérmicas de la biomasa presentan un mecanismo de reacción principalmente de iones y radicales libres (Savage, 1999). Mientras que, cuando se trabaja por encima del punto crítico, la biomasa se depolimeriza principalmente por un mecanismo de radicales, que predomina sobre mecanismos iónicos a medida que incrementa la temperatura (Siskin y Katritzky, 2000).

De acuerdo a lo anterior, cuando la temperatura está por debajo de los 330°C, no ocurre solubilización de los polímeros de la biomasa celulósica (Bobleter, 1986; Mok, 1992). Un ejemplo típico puede ser el caso de la conversión hidrotérmica de celulosa, donde la hidrólisis (Sasaki, 2002) empieza débilmente desde los 190°C, pero solo es verdaderamente apreciable cerca de 330°C (Bobleter, 1986; Sasaki, 2002). Cuando ocurre esta autohidrólisis, se producen altos rendimientos de oligómeros y monosacáridos en cortos tiempos de reacción (González, 2004).

Sin embargo, la despolimerización de la biomasa celulósica, solo empieza cuando la temperatura está por encima de los 330°C para convertirse en hexosas y oligosacáridos. Mientras procede esta despolimerización de la biomasa, se forman radicales que poseen una energía de enlace inferior a 209 kJ/mol; estos pueden transferir su átomo de hidrógeno a otro radical orgánico que compite por estabilizarse (Stein, 1985). Si la conversión se realiza en condiciones subcríticas predominan las reacciones de degradación y desoxigenación de los productos de hidrólisis. Esta hidrólisis hidrotérmica produce oligosacáridos hidrosolubles mayormente de las hemicelulosas y de las fracciones de celulosa accesible (amorfa) y monómeros de azúcares, así como fracciones derivadas de la fragmentación de la lignina.

A condiciones subcríticas el agua actúa simultáneamente como solvente, catalizador y reactante (Kuhlmann, 1994; Katritzky, 1996). La ruta de ataque parece ser ocasionada por mediación de los iones hidronio, que provoca reacciones químicas en los sitios con

densidad electrónica positiva, donde hay ausencia o presencia de un grupo carbonilo (Gierer, 1985).

Una primera ruta de reacción genera especies reactivas como los iones hidronios (mediante la autoionización del agua) y ácidos generados *in situ* (estructuras de grupos urónicos y acetilos de hemicelulosas) (Sarkanen y Ludwing, 1971) y en la segunda ruta, si el proceso continua, se da el rompimiento de esas estructuras y la producción de oligosacáridos y oligómeros de lignina de bajo peso molecular (Casey, 1990; Savage, 1999; Siskin y Katritzky, 2000). La ventaja que tiene la acción del ion hidronio, es la eliminación de grupos, sin degradar ni disolver el material de interés (Andrews y Singh, 1979). Sin embargo, las reacciones que ocurren no se conocen muy bien en detalle, debido a la complejidad de los mecanismos (García, 2003; García y col., 2004).

Ahora bien, la implementación de tratamientos hidrotérmicos dentro de una economía basada en biomasa tienen sus ventajas, si se considera que a partir de olote, se podrían producir combustibles, energía y productos químicos de valor. Además existe la posibilidad de realizar los tratamientos en instalaciones separadas o bien en una sola instalación en la que además de energía y biocombustibles (biorrefinería) se produzcan, al igual que en las refinerías actuales, una serie de productos químicos orgánicos base, que sirvan a su vez de plataforma para obtener otros compuestos de interés.

Surge así de manera natural un concepto de biorrefinería integrada que al igual que las refinerías actuales más avanzadas, operando con biomasa en lugar de petróleo, produzcan combustibles, energía y diferentes líneas de productos químicos, de tal forma que se incremente la rentabilidad económica con respecto a las instalaciones que produzcan exclusivamente biocombustibles y energía. A menudo, los conceptos de conversión de biomasa se construyen a partir de la idea de la "Biorrefinería", en el que la biomasa sólida se descompone primero en materias primas químicas básicas y luego se reorganizan en productos químicos de valor (Varadarajan y Miller, 1999). El uso de la biomasa como

materia prima renovable para la producción de combustibles y productos químicos de valor es un trabajo en progreso.

Las principales ventajas de estas biorrefinerías son que las materias primas son baratas y que, en teoría, es posible obtener una gran variedad de bioproductos. Sin embargo, para su desarrollo es preciso superar una serie de barreras tecnológicas relacionadas con la separación de sus tres componentes básicos (celulosa, hemicelulosas y lignina) y el desarrollo de tecnologías que permitan la escisión de la lignina en sus componentes básicos.

La lignina tiene un gran contenido de hidrocarburos aromáticos cuyo aislamiento daría lugar a una multiplicidad de productos e incrementaría sustancialmente el valor añadido de este tipo de biorrefinería. Sin embargo, al contrario que para los hidratos de carbono naturales, no existe ninguna enzima natural que lleve a cabo la descomposición de la lignina en sus componentes básicos (Ringpfeil, 2001).

Según el grado de integración, las biorrefinerías se clasifican en:

- a) Biorrefinerías de primera generación.
- b) Biorrefinerías de segunda generación.
- c) Biorrefinerías de tercera generación.

De acuerdo a la anterior clasificación, una planta de fabricación de etanol por molienda del grano en estado seco, constituye un ejemplo de biorrefinería de primera generación. La planta usa como materia prima grano procedente de cereales, con una capacidad de procesado fija y produce una cantidad determinada de etanol, co-productos para alimentación animal y dióxido de carbono. Casi no tiene ninguna flexibilidad de procesado.

La actual tecnología de molienda del grano en estado húmedo constituye un ejemplo de biorrefinería de segunda generación. Al igual que en el ejemplo anterior, esta tecnología

usa como materia prima grano procedente de cereales, fundamentalmente maíz, pero, al contrario que una biorrefinería de primera generación, tiene la capacidad de producir una variedad de productos finales bajo demanda. Tales productos incluyen almidón, jarabe de maíz con alta concentración de fructosa, etanol, aceite de maíz, además de gluten de maíz y harina. Este tipo de biorrefinería es susceptible de conectar líneas de productos industriales con las unidades existentes de producción agrícola.

Las biorrefinerías de tercera generación producirían, mediante un conjunto de tecnologías múltiples, líneas de productos (biocombustibles, productos químicos, plásticos, etc.) partiendo de biomasa de origen agrícola o forestal. Actualmente, no existen muchas en funcionamiento y constituyen el objetivo común de todas las actuales corrientes de pensamiento centradas en el concepto de biorrefinería

En este sentido, la degradación hidrotérmica en condiciones subcríticas, estaría enmarcada dentro de las biorrefinerías de tercera generación (biorrefinerías basadas en biomasa lignocelulósica, biorrefinerías de aprovechamiento integral de cultivo y las biorrefinerías verdes), porque están provistas de mayor flexibilidad a todos los niveles (Kamm y Kamm, 2004). Con estos procesos de conversión eficientes, se podrán emplear diversas materias primas, y generar un amplio abanico de productos finales. De este modo, se podrán aprovechar todas las posibilidades que ofrecen el olote, reduciendo la generación de residuos y haciendo más sostenible su utilización, con tratamientos amigables o de bajo impacto con el ambiente.

En este sentido, el mayor interés del olote se centra en los productos que se puedan obtener de la degradación de sus principales polímeros (lignina, celulosa y hemicelulosas). Se ha planteado que los polisacáridos de la pared celular de algunos vegetales que no son solubilizados por el agua por si sola o agentes quelantes (sustancia que forma complejos con iones de metales pesados), podrían ser solubilizados en medio alcalino (Selvendran y O'Neill, 1985) o tratamientos hidrotérmicos (Miyazawa y *col.*, 2008). Las hemicelulosas están definidas químicamente como polisacáridos que son estructuralmente homólogos a la

celulosa, ya que tienen una columna vertebral compuesta por unidades de D-azúcares en enlaces β 1,4 (O'Neill y York, 2003). En esta definición se incluyen el xiloglucano, glucomanano, manano, pero principalmente los xilanos y compuestos de arabinosa.

Las xilanas, que incluyen a las glucuronoxilanas y glucuronoarabinoxilanas, son cuantitativamente los componentes menores de las paredes primarias de las dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas, pero son abundantes en las paredes de las gramíneas y paredes secundarias de las plantas leñosas (Darvill y *col.*, 1980, Ebringerova y Heinze, 2000). Estos polisacáridos tienen una columna vertebral compuesta por unidades de D-xilosa vinculadas mediante enlaces β 1,4. Asociados a la cadena principal de glucosa se encuentran residuos de arabinosa que pueden estar esterificados con ácido ferúlico o cumárico.

En los últimos 10 años, se ha tratado una variedad de biopolímeros en agua supercrítica, generando un gran interés como un método potencial para obtener combustibles gaseosos y líquidos, así como otro tipo de compuestos de alto valor energético. Entre esos casos, se puede mencionar que la hidrólisis de la celulosa en agua alrededor del punto crítico, produce altos rendimientos de oligómeros y monosacáridos en cortos tiempos de reacción, así mismo la glucosa, cuando se encuentra completamente gasificada ($2C_6H_{12}O_6 + 7H_2O \leftrightarrow 9CO_2 + 2CH_4 + CO + 15H_2$), da origen a una mezcla de gases, principalmente dióxido de carbono, hidrógeno y metano (González, 2003).

Palm y Zacchi (2003), realizaron extracción de oligosacáridos de hemicelulosa de abeto en un horno de microondas o bajo tratamientos con vapor, que pueden ser utilizados para la obtención de polímeros (p. ej. hidrogeles), en sustitución de reactivos basados en combustibles fósiles. El mayor rendimiento de los oligosacáridos, expresados como mananas fue del 70% obtenida con el tratamiento en el horno de microondas a 200 °C durante 5 min. La cantidad de oligosacáridos extraídos fue de 12.5 g/100 g de madera seca. El peso molecular mínimo fue de 3400 g/mol y máximo de 12000 g/mol. Los oligosacáridos con pesos moleculares más altos se obtuvieron en promedio a condiciones

más suaves, pero el rendimiento fue considerablemente menor. En este estudio se demostró la viabilidad del uso de los oligosacáridos extraídos de hemicelulosa de abeto para la síntesis de hidrogeles.

Caparrós y *col.*, (2006) estudiaron el *Arundo donax* L. en un proceso de autohidrolisis isotérmico en el rango de temperatura de 150-195 °C, por períodos entre 0 y 15 horas, con una relación líquido/sólido de 8 (peso/peso), con el fin de hidrolizar oligómeros y monómeros de las hemicelulosas (compuestos que son de interés para la industria alimentaria). En este trabajo, bajo un modelo cinético convencional, los autores trataron de explicar la evolución en el tiempo del rendimiento de hemicelulosas y sus productos de degradación. Realizaron la cinética de modelado, utilizando el enfoque del factor de severidad y los parámetros cinéticos obtenidos.

Garrote y *col.*, (2007) evaluaron los efectos de la madera de *Eucalyptus globulus* bajo diferentes condiciones de autohidrólisis sobre los productos de reacción, donde determinaron la composición del licor, la influencia de las condiciones de severidad en la distribución de los pesos moleculares de xilo-oligosacáridos, además del tipo y cantidad de monosacáridos. Ellos concluyeron que el parámetro de severidad puede ser utilizado para predecir las proporciones relativas de las fracciones que se obtienen bajo ciertas condiciones.

Otro caso experimental fue el de Miyazawa y *col.*, (2008) quienes degradaron hidrotérmicamente polisacáridos (ácido péptico y almidón) en un reactor de flujo continuo y un reactor de tapón de flujo conectado en serie, encontraron una correlación, entre los valores del parámetro de severidad, a diferentes temperaturas y tiempo de residencia con el rendimiento de los productos de degradación.

La degradación hidrotérmica de la biomasa se ha estudiado en rangos de temperatura que van desde 160-410°C y hasta 300-500 bares, con tiempos de reacción desde 6 a 66 minutos y estas condiciones se han estado probando en compuestos modelos, como, por ejemplo, el

ácido péptico, almidón, la glucosa o la celulosa entre otros, con el fin de identificar las vías reacción química (Kruse y Gawlik, 2003, Garrote y *col.*, 2007, Miyazawa y *col.*, 2008). Los principales compuestos identificados son la fructosa, el levoglucosano, fenoles (fenol y cresoles), furfurales, ácidos (ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y el ácido levulínico) y aldehídos (formaldehído y acetaldehído) (Kruse y Gawlik, 2003).

1.3 **Parámetro de severidad.**

La distribución de productos de degradación generados en el tratamiento hidrotérmico depende en gran medida de la temperatura de reacción y el tiempo, que son consideradas variables importantes (Xiang y Lee, 2000, Xiang y Lee, 2001, Garrote y *col.*, 2007, Miyazawa y *col.*, 2008). Otros parámetros a considerar son la energía de activación que puede estar sujeta a los equipos experimentales, el tipo de experimento (isotérmicos o dinámicos), condiciones experimentales (temperatura, velocidad de calentamiento y la presión alcanzada), como también a las características físicas del material (tamaño de partículas, densidad y humedad). Ahora bien, considerando los criterios de temperatura y tiempo, algunos autores han propuesto utilizar un parámetro de severidad, también conocido como la reacción de coordenadas (R_o), que se puede definir fenomenológicamente como los efectos combinados de la temperatura y el tiempo de reacción sobre los tratamientos (Xiang y Lee, 2001; Miyazawa y *col.*, 2008). El parámetro de severidad se ha utilizado para predecir la distribución de productos y comparar la reactividad de los polisacáridos a diversas condiciones (Xiang y Lee, 2000, Xiang y Lee, 2001, Garrote y *col.*, 2007, Miyazawa y *col.*, 2008).

1.4 **Alcance del estudio.**

Con base en estos conceptos teóricos y experimentales, se propone en esta investigación tratar el olote hidrotérmicamente (solo con agua como reactivo) en condiciones subcríticas, esto es, a temperaturas menores a 300 °C y presiones menores a 100 atmósferas (Castro y *col.*, 2007, Miyazawa y *col.*, 2008, Sánchez y *col.*, 2012), como un proceso de conversión

alternativo para degradar la forma recalcitrante del olote e identificar los productos químicos con potencial valor agregado (lignina, celulosa, xilana, azúcares totales y concentración de grupos carboxílicos). Las investigaciones sobre este tipo de tratamiento para el olote llevan como objetivo preparar el olote (entre otras fuentes de biomasa de interés) para utilizarlo en una etapa subsecuente de condensación con fuentes de nitrógeno NH_4OH y/o H_2NCONH_2 (40% y 46% en peso respectivamente), como principio para la formulación de diferentes productos químicos nitrogenados de aplicación en procesos de fertilización.

II. HIPÓTESIS

La degradación hidrotérmica del olote bajo condiciones subcríticas, favorecerá la fragmentación y degradación de las hemicelulosas mediante autohidrólisis, para convertirlas en azúcares fermentables, además del rompimiento estructural de la lignina y la alteración del ordenamiento cristalino de la celulosa para liberar la glucosa, lo que finalmente generará una fracción sólida rica en fragmentos de lignina y celulosa, además de una fracción líquida rica en derivados ácidos de hemicelulosas (principalmente xilana), que son los responsables de reaccionar en una etapa subsecuente de condensación con una fuente de nitrógeno, para obtener una matriz orgánica enriquecida con nitrógeno.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Degradar el olote hidrotérmicamente bajo condiciones subcríticas para generar fracciones ricas en celulosa, lignina y hemicelulosas (xilanas), y aprovechar los grupos ácidos y aldehídos generados en esta reacción, para fijar nitrógeno mediante condensación con urea, obteniendo finalmente una matriz polimérica rica en nitrógeno que puede ser aplicado como fertilizante orgánico nitrogenado de larga duración.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Caracterizar químicamente el olote, para degradarlo hidrotérmicamente bajo condiciones subcríticas.

3.2.2. Aislar los principales biopolímeros del olote: lignina, hemicelulosas (xilana) y celulosa del olote, para su posterior caracterización química.

3.2.3. Determinar las condiciones de hidromódulo, temperatura y tiempo de reacción para la degradación hidrotérmica del olote, bajo condiciones subcríticas en la concentración de carbohidratos y cuantificación de grupos carboxílicos de la fracción soluble.

3.2.4. Evaluar la eficiencia del tratamiento hidrotérmico bajo condiciones subcríticas en el olote integral, para la generación de grupos carboxílicos en los hidrolizados, rendimientos de sólidos insolubles y carbohidratos.

3.2.5. Analizar la xilana y celulosa de olote, mediante FTIR-ATR y RMN después de tratarlos hidrotérmicamente bajo condiciones subcríticas y condensarlas con urea.

3.2.6. Obtener una matriz polimérica rica en nitrógeno con ^{15}N a partir de la degradación hidrotérmica del olote y la subsecuente condensación con una fuente de nitrógeno (H_2NCONH_2), identificando la correspondiente naturaleza química de los compuestos nitrogenados (sales de amonio, aminas, amidas, etc.), mediante FTIR-ATR y RMN- ^{13}C y ^{15}N .

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

OBJETIVO 1

Caracterizar químicamente el olote, para degradarlo hidrotérmicamente bajo condiciones subcríticas.

4.1. Diagrama metodológico

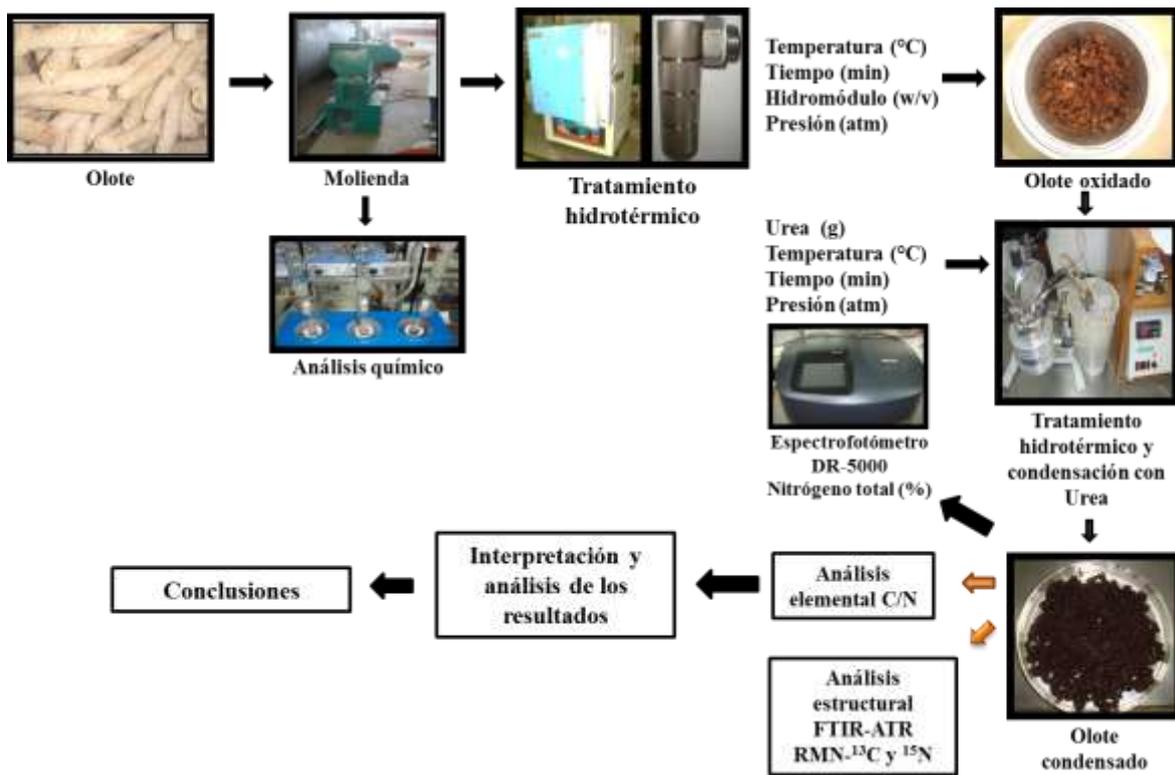


Figura 1. Diagrama metodológico de las etapas del proceso de investigación

4.1.1. Obtención de materia prima, molienda y clasificación por tamaño de partículas

El material utilizado en este estudio fue olote de maíz y se obtuvo de la región agrícola de Nextipac, municipio de Zapopan, Jalisco, México. El olote fue lavado para quitar impurezas y se molió en un molino de navajas con 4800 μm de diámetro en la perforación de la criba. Posteriormente, se tamizó el material en un clasificador de astillas Modelo Helsinki Sf-00561, marca Lorenszen & Wettre AB, con mallas de 425 μm , 250 μm , 180 μm y 150 μm . La clasificación se realizó a partir de un lote aproximadamente de 10.3 kg.

4.2. Caracterización química del olote

El material retenido en la malla 60 (tamaño de partícula de 250 μm) se utilizó para determinar la composición química del olote, siguiendo las normas de la Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI): extraíbles (T 204, 1997, T 207, 1999), cenizas (T 211, 1993), lignina klason (T 222, 1998), pentosanos (T 223, 1984), α -celulosa (T 9, 1954). También se utilizaron otros métodos de aislamiento reportados en la literatura para lignina estructural (Björkman, 1956), holocelulosa (Wise y *col.*, 1946) y hemicelulosas (xilana) (Timell, 1961), nitrógeno total en el olote integral (AOAC 954.04., 1984), además de análisis de carbohidratos mediante cromatografía HPLC.

De acuerdo con la norma (T 264, 97), el material utilizado para la mayor parte de los análisis químicos debe estar libre de extractivos, para lo cual se pesaron varios lotes de 100 g de olote previamente molido y se sometieron a un proceso de extracción con diclorometano (8 horas) y acetona (8 horas), además de agua caliente (6 horas). Todas las extracciones se llevaron a cabo en un equipo Soxhlet, manteniendo el líquido hirviendo de manera que el sifón de extracción no fuera inferior a cuatro o seis ciclos por hora. Después de la extracción con cada solvente, se extendió el olote extraído en una caja de cartón ubicado bajo una campana de extracción para eliminar el exceso de disolvente.

4.2.1. Determinación del contenido de humedad

Siguiendo la norma T 264 (1997), se determinó el contenido de humedad en el olote libre de extractos. Esta determinación consistió en pesar aproximadamente 1.3 g de muestra en una caja petri de peso conocido. Posteriormente la muestra se secó en un horno a 105 ± 3 °C durante 2 horas, se dejó enfriar en un desecador y se volvió a pesar. Se continuó secando en el horno por un período de 1 hora hasta que se obtuvo un peso constante y la humedad se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ humedad} = \frac{\text{Peso muestra húmeda} - \text{peso muestra seca}}{\text{Peso muestra húmeda}} \times 100\%$$

4.2.2. Determinación de cenizas

Para la determinación de cenizas se siguió la norma T 211 (1993). Se tomaron 2 g de olote integral, y se colocaron en un crisol de peso conocido. La muestra se secó hasta obtener un peso

constante. Después se inició la combustión sobre una flama de mechero, para introducirla posteriormente en una mufla a $525 \pm 25^\circ\text{C}$ durante un período de 6 horas, hasta que todo el carbón se quemó, indicado por la desaparición de partículas negras. La muestra se dejó enfriar en un desecador y se pesó hasta peso constante. Esta determinación también se llevó a cabo con la muestra libre de extracto en diclorometano, acetona y agua caliente, utilizando muestras de 1g. El porcentaje de cenizas se calculó con base al peso seco de la muestra.

% cenizas = A/B (100) donde:

(A) = peso de la ceniza (g)

(B) = peso de la muestra base seca (g).

4.2.3. Determinación de lignina Klason en muestra de olote

Se utilizó la norma T 222 (1998) para determinar gravimétricamente el contenido de lignina en el olote. A una muestra de 1 g de olote seco (libre de extractos en diclorometano, acetona y agua caliente) se le agregaron 15 mL de ácido sulfúrico al 72% (21.63 N), manteniéndose en agitación en baño maría a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2 horas. Después se transfirió a un matraz con agua desionizada (560 mL), enjuagando y diluyendo con agua hasta alcanzar una concentración de ácido del 3% y un volumen de 575 mL. Posteriormente fue hervido en un sistema de reflujo por 4 horas para asegurar que se mantuviera un volumen constante de agua. La solución se decantó manteniendo el matraz en una posición inclinada hasta que el material estuvo finalmente dividido. Entonces, se filtró a través de un crisol tipo Gooch de porosidad fina, se lavó con agua caliente y se secó a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, hasta alcanzar un peso constante. El porcentaje de lignina se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lignina} = (\text{Peso de lignina} \times 100) / \text{Peso seco de olote libre de extractos}$$

4.2.4. Determinación de holocelulosa

La holocelulosa se determinó siguiendo el procedimiento de Wise y *col.*, (1946). Se pesaron 5 g de olote libre de extractos, 1.5 g de clorito de sodio (NaClO_2) y se transfirieron a un matraz con 60 mL de agua que contenían 10 gotas de ácido acético (CH_3COOH). Luego de preparar

esta disolución en cada matraz (4 matraces), se colocaron en un baño de agua caliente entre 70-80 °C y cada hora se le añadieron 1.5 g NaClO_2 y 10 gotas de CH_3COOH con agitación, hasta cumplir cuatro horas. Todos los pesos y volúmenes de los reactivos fueron ajustados con respecto a los 5 g que establece la norma. Al cumplirse este tiempo, los matraces se dejaron enfriar a temperatura ambiente por varios minutos para poder ser manipulados. Posteriormente sobre un filtro de vidrio de porosidad media, se hizo pasar el contenido del matraz, aplicando vacío. El residuo obtenido es holocelulosa, la cual representa el total de carbohidratos en el material.

4.2.5. Determinación de pentosanos

En un matraz de destilación que contenía 1.1 g de muestra de olote libre de extracto, se le añadieron 20 g de cloruro de sodio NaCl , 100 mL de ácido clorhídrico HCl (3.85 N) y unas cuantas perlas de ebullición. Mediante un embudo de separación se le añadieron 250 mL de HCl (3.85 N). Luego se calentó la mezcla y se destiló el furfural, producto de la hidrólisis de los azúcares pentosanos y su modificación cuantitativa a aldehído, por arrastre de HCl (g) a una temperatura tal, que tuviera una velocidad uniforme de destilado de aproximadamente 2.5 mL/min. El destilado se colectó en un matraz volumétrico de 250 mL sumergido en un baño de hielo. Durante la destilación se mantuvo un volumen constante de 100 mL en el matraz de ebullición, añadiendo HCl gota a gota desde el embudo de separación que contenía 250 mL de HCl (3.85 N). La destilación se realizó por un tiempo total de 90 min (Fig. 2).



Figura 2. Equipo para la determinación de pentosanos.

Todo el destilado se transfirió a un frasco de 1000 mL, al cual se le añadieron 250 g de hielo triturado de agua destilada, que mantuvo una temperatura máxima de 0 °C. También se le agregaron 20 mL de bromuro bromato de potasio 0.2 N con agitación mínima, se tapó y se dejó reposar por 5 min., luego se le quitó el tapón y se agregó 10 mL KI al 10% y se volvió a tapar después de agitarlo vigorosamente. Se procedió a titular esta mezcla con una solución estándar 0.1 N de Tiosulfato de sodio, usando almidón como indicador. Se repitió el proceso con el blanco (HCl 3.85 N sin destilar) y se tituló añadiendo todos los reactivos utilizados con la solución de destilado. El porcentaje de pentosanos se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de pentosanos} = [7.50 (V2 - VI) N / W] - 1.0$$

N= Normalidad de la solución de Tiosulfato de sodio.

VI= Volumen de la solución de Tiosulfato de sodio usado en el espécimen de prueba (mL).

V2= Volumen de la solución de Tiosulfato de sodio usado en la titulación del blanco (mL).

W = peso base seca de la muestra (g).

4.2.6. Determinación de celulosa Cross Bevan (α -celulosa) en holocelulosa

Se colocaron en un matraz de 250 mL entre 1 y 2 g de holocelulosa base seca (secada al vacío a 60°C), más 100 mL de ácido sulfúrico al 1.3% y se mantuvo dentro de un baño de agua en ebullición a 96 °C, controlando que el nivel del medio coincidiera con el de la solución en el recipiente, mediante adición de agua destilada al baño. Esta hidrólisis fue llevada a cabo por un periodo de 2 horas. Después de hidrolizar el material, se transfirió a un crisol de fondo poroso para filtrar la mezcla ácida, luego se lavó el residuo hidrolizado de holocelulosa con agua destilada bajo vacío. Posteriormente el material fue secado hasta peso constante a 105°C aproximadamente. El porcentaje de α -celulosa fue determinado sobre la base seca de la muestra.

4.2.7. Determinación de carbohidratos del olote mediante HPLC

En un vaso precipitado de 50 mL se colocó una muestra de holocelulosa (300 mg base seca) y se añadieron 3 mL de H₂SO₄ (72%) a la temperatura ambiente. La mezcla se agitó con una varilla de vidrio por un período de una hora, luego los hidrolizados se transfirieron a un matraz de 250 mL y se les añadió 84 mL de agua destilada. En seguida, se neutralizaron a un pH que

osciló entre 5.7 y 6.7, mediante la adición de hidróxido de bario $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (13.5 g aproximadamente), aplicando una agitación rigurosa mediante placa de agitación magnética. Después de esto, se diluyó la solución hasta alcanzar un volumen de 100 mL y se conservó en refrigeración. Esta determinación se efectuó también en una muestra de olote libre de extractos.

Para analizar el tipo y concentración de azúcares, cada hidrolizado se neutralizó con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ y se centrifugó a 3100 rpm, durante 40 minutos. Después se procedió a concentrar la muestra en un rotavapor bajo vacío. Luego se pasó la solución a un matraz volumétrico de 10 mL de capacidad y se obtuvieron volúmenes de 15-20 mL del hidrolizado concentrado y se conservaron en refrigeración, para luego ser analizados por cromatografía HPLC y comparado con estándares de carbohidratos (glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, celobiosa y manosa). La fracción soluble se recuperó por filtración a través de una membrana Millipore de 0.2 μm , y se purificó pasándola por un cartucho Millipore Seppak C18. De esta muestra se inyectaron 20 μL a un cromatógrafo con una columna Aminex HPX-87P, 300 mm \times 7.8 mm, con una presión de 272 psi (19 kg/cm²) a 85°C; donde la fase móvil fue agua grado HPLC a un flujo de 0.60 mL/min. Para el análisis se empleó una bomba Waters 6000 y un detector de índice de refracción Modelo 401 (Waters Associated Inc.). El porcentaje de cada azúcar se calculó con la ecuación (1):

$$\% \text{ Glucosa} = \left[\frac{\left(\frac{A_g}{A_s} \right) \left(\frac{W_s}{V_s} \right) (V_h) \left(\frac{V_{Is}}{V_{Ig}} \right) \left(\frac{V_f}{V_c} \right)}{W_m} \right] \times 100 \quad (1)$$

Donde: A_g corresponde al área del pico de glucosa, A_s es el área del estándar, W_s es el peso del estándar, V_s es el volumen del estándar, V_h es el volumen del hidrolizado, V_{Is} es el volumen inyectado del estándar, V_{Ig} es el volumen inyectado de Glucosa, $V_{f/c}$ corresponde a la relación del volumen final y volumen concentrado, W_m es el peso de la muestra

OBJETIVO 2

Aislar los principales biopolímeros del olote: lignina, hemicelulosas (xilana) y celulosa del olote, para su posterior caracterización química.

4.3. Aislamiento de lignina Björkman de olote

Para estudiar la estructura de la lignina de olote se aisló el biopolímero mediante el procedimiento desarrollado por Björkman (1956). Una muestra molida de olote libre de extractos se extrajo con dioxano-agua (9:1) durante 12 h (250 mL de solución por cada 10 g de muestra). Posteriormente, la muestra se centrifugó (25 min, 4°C y 11000 rpm) y se recogió el sobrenadante (que contiene la lignina) en un matraz, repitiéndose este proceso dos veces, para posteriormente obtener los sólidos disueltos en un rotavapor a 40°C. A continuación, el residuo seco se disolvió en una mezcla de ácido acético: agua (9:1), añadiéndose 20 mL por cada gramo de residuo seco. Esta disolución se añadió lentamente a un vaso precipitado con agua destilada (225 mL por cada gramo de lignina) en constante agitación.

La lignina se precipitó y se recuperó mediante centrifugación. Una vez seco el residuo, se trituró en un mortero para facilitar su disolución en una mezcla 1,2- dicloroetano-etanol (2:1) y de nuevo se volvió a centrifugar a baja velocidad (5000 rpm durante 5 min) recuperando el sobrenadante que contiene la lignina. El sobrenadante se dispersó gota a gota, sin agitar, en éter dietílico (225 mL es suficiente para 0.5-1 g de lignina), precipitando la lignina. La muestra se volvió a centrifugar (5000 rpm durante 5 min) y el residuo se suspendió nuevamente en éter de petróleo durante 12 horas. Finalmente, la suspensión se centrifugó y el residuo se secó bajo corriente de nitrógeno y se conservó a 4°C, preservándola de la luz y el aire para evitar su oxidación hasta el momento del análisis.

$$\% \text{ Lignina} = (\text{Peso de lignina} / \text{Peso seco de olote}) \times 100$$

4.3.1. Aislamiento de xilana de olote a partir de holocelulosa

La xilana fue aislada mediante la técnica descrita por Timell (1961) con algunas modificaciones. Se tomaron 83.83 g base seca de holocelulosa y se colocaron en un vaso de precipitados de 1000 mL. Luego se le añadieron 600 mL de una solución de KOH al 24% (aproximadamente 7.15 mL por cada gramo de holocelulosa) y se dejó reaccionar bajo agitación durante 24 horas. El producto de la reacción anterior se filtró en un filtro de vidrio de fondo poroso y se separó en dos partes; una parte soluble (hemicelulosas) y otra parte insoluble (α -Celulosa). La parte soluble se precipitó gota a gota en una solución de etanol y ácido acético

(cuatro partes de etanol y 0.4 partes de ácido acético por cada mL de hidrolizado) y se filtró en un papel filtro de gramaje No. 2 bajo succión y se dejó secar en una estufa de vacío a 60 °C.

De las hemicelulosas recuperadas se tomaron 13.04 g base seca y se disolvieron en una solución de 250 mL de KOH al 10% bajo agitación; posteriormente las mananas se precipitaron gota a gota en una solución de 500 mL de BaOH al 5% y se recuperaron mediante centrifugación a 4000 rpm. La fracción de xilana se recuperó a partir del sobrenadante de la centrifugación mediante precipitación en 3300 mL de la solución de etanol-ácido acético ya descrita. El precipitado se lavó con etanol y se filtró mediante vacío y finalmente se secó en una estufa de vacío a 60°C. A la xilana obtenida se le determinó el rendimiento (en masa) y se almacenó para caracterizarla químicamente mediante FTIR-ATR y RMN-¹³C.

4.3.2. Análisis de RMN-¹³C de xilana aislada de olote

La muestra de xilana aislada se analizó por resonancia magnética nuclear de líquidos (RMN-¹³C). La muestra se preparó en un tubo de RMN disolviendo 20 mg de xilana en 0.75 mL de DMSO-d₆. El espectro de ¹³C se obtuvo en un espectrómetro de RMN de 200MHz Varian Gemini 2000 de banda ancha, con una frecuencia de análisis para el ¹³C de 50.29 MHz.

OBJETIVO 3

Determinar las condiciones de hidromódulo, temperatura y tiempo de reacción para la degradación hidrotérmica del olote, bajo condiciones subcríticas en la concentración de carbohidratos y cuantificación de grupos carboxílicos de la fracción soluble.

4.4. Determinación de las condiciones de hidromódulo, temperatura y tiempo de reacción, para la degradación hidrotérmica del olote

La degradación hidrotérmica se llevó a cabo con muestras de 0.5 g de olote integral, en reactores de acero inoxidable que tiene una capacidad máxima de 35 mL con tapa rosca interna y empaquetadura de teflón externa. El tratamiento se llevó a cabo en una Mufla marca TE-M12D, equipada con un panel de control que permite explorar en un intervalo la temperatura de 50°C A 1100°C (Fig. 3).



Figura 3. Tratamiento hidrotérmico del olote en mufla y reactores tipo bala.

Los ensayos de degradación hidrotérmica se llevaron a temperaturas de 160, 230 y 300°C con tiempos de 30 a 60 min (30, 45 y 60 min) (Kilzer y Broido, 1965; Clark y Mackie, 1987; Flaig y Söchtig, 1973; Flaig, 1972; Miletzky y Schiene, 1985; Meier y *col.*, 1994). El tiempo de reacción se contabilizó a partir de que la mufla alcanzó la temperatura de operación deseada y se calculó la presión alcanzada bajo estas condiciones (1.2, 3.7 y 84.8 atm respectivamente), las cuales se encuentra por debajo del punto crítico del agua (punto crítico 374 °C y 218 atm). Todos los reactores fueron ajustados con torquímetro a una presión de 20 libras.

El hidromódulo (w/v) se ajustó de acuerdo a los requerimientos de la experimentación agregando agua destilada grado HPLC previamente al material dentro del reactor, antes de introducirlo a la mufla. La cantidad de agua agregada se calculó sobre el material base seca, por lo que el material integral se trabajó con 20, 25 y 30 mL de agua que representan una relación aproximada de 1:40, 1:50 y 1:60 equivalentes a 2.5%, 2.0% y 1.7% (w/v) con respecto al peso del olote. Después de tratar el material, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró utilizando membranas de 0.45µm. Posteriormente, el residuo se secó en un horno a 45°C hasta tener un peso constante y se determinó el rendimiento de los sólidos insolubles mediante la ecuación (2).

$$\text{Rendimiento sólidos insolubles (\%)} = \frac{P_2}{P_1} \times 100\% \quad (2)$$

***P₁** = Peso base seca del olote antes del tratamiento (g)

***P₂** = Peso base seca del olote después del tratamiento hidrotérmico (g).

4.4.1. Diseño estadístico para el tratamiento hidrotérmico del olote

Para analizar de manera simultánea los factores que podrían estar influyendo en la degradación hidrotérmica del olote, se planteó un diseño factorial multinivel 3^k ($3^3= 3 \times 3 \times 3$) con 2 repeticiones para el primer tratamiento y un 3^k ($3^2= 3 \times 3$) para el segundo tratamiento hidrotérmico, donde sólo se consideraron los factores de temperatura y tiempo, ya que estos fueron los que tuvieron mayor influencia en la primera parte del experimento y se evaluó su influencia en la generación de grupos carboxílicos. Para analizar las variables estudiadas se empleó el programa Statgraphics® plus 5.1.

4.4.2. Cuantificación de grupos carboxílicos y concentración de carbohidratos

Los grupos carboxílicos generados en la degradación hidrotérmica se determinaron mediante titulación polielectrolítica, utilizando la técnica del potencial de flujo. Bajo este procedimiento se obtiene la demanda aniónica de los hidrolizados del olote. Las mediciones se realizaron en un equipo detector de carga polielectrolítica PCD-03 Mütek (Fig. 4). Para este análisis, las muestras se prepararon utilizando la técnica T 237 (1993), donde se pesaron 0.5 g base seca de olote integral y se trataron hidrotérmicamente a temperaturas de 160, 230 y 300 °C, tiempos de 30, 45 y 60 min con un volumen de agua de 25 mL grado HPLC. Posteriormente el producto de la reacción se filtró en membranas de 0.45 µm, para obtener la fracción soluble del producto de la reacción. Del filtrado se tomaron muestras de 5 mL, diluidas con 5 mL de agua grado HPLC y se colocaron en la celda de medición del Mütek, la cual contenía un pistón en movimiento, produciendo un potencial de transmisión reflejado en el panel de lectura.



Figura 4. Equipo detector de carga polielectrolítica PCD-03 Mütek

La concentración aniónica del filtrado se calculó mediante la ecuación (3), utilizando un polielectrolito catiónico Poly-DADMAC (Cloruro de polidialildimetil amonio) en la neutralización, a una concentración de 0.001 mol/L y un flujo potencial de 0 mV.

$$C_f = \frac{V_{FP} C}{v} \times 1000 \quad (3)$$

C_f es la concentración de carga (Meq /100 g), v es el volumen de la muestra que se titula (mL), y V_{FP} y C son el volumen de solución (mL) y su concentración (N), respectivamente.

La cuantificación de la concentración de carbohidratos de la fracción soluble después del tratamiento hidrotérmico se llevó a cabo posteriormente mediante HPLC.

OBJETIVO 4

Evaluar la eficiencia del tratamiento hidrotérmico bajo condiciones subcríticas en el olote integral, para la generación de grupos carboxílicos en los hidrolizados, rendimientos de sólidos insolubles y carbohidratos.

4.5. Análisis de la fracción insoluble del olote mediante FTIR-ATR

Las fracciones insolubles del olote tratado hidrotérmicamente se analizaron mediante FTIR-ATR, para evidenciar las modificaciones realizadas durante el tratamiento, utilizando un espectrómetro Perkin-Elmer, modelo Spectrum GX. Se obtuvieron espectros por duplicado en una ventana espectral de 4000 a 550 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 16 barridos.

4.5.1. Evaluación del factor de severidad

La eficiencia del tratamiento hidrotérmico en relación al rendimiento de la fracción insoluble se evaluó utilizando un factor de severidad, calculado como se muestra en la ecuación (4). El factor de severidad se definió como la combinación de los efectos de la temperatura y el tiempo de reacción sobre el rendimiento de los tratamientos de degradación hidrotérmica en condiciones subcríticas.

$$R_o = t \times \exp\left(T - \frac{100}{\omega}\right) \quad (4)$$

t es el tiempo expresado en minutos, T la temperatura expresada en °C y ω es una constante numérica, cuyo valor es de 14.75, determinada experimentalmente en estudios de degradación de carbohidratos (Garrote y *col.*, 2007, Miyazawa y *col.*, 2008).

4.5.2. Relación de la concentración de azúcares totales generados en el hidrolizado de olote con las variables de reacción

En esta parte se evaluó la concentración de azúcares totales generados en los hidrolizados del olote, bajo las condiciones de temperatura y tiempo de reacción de esta investigación.

OBJETIVO 5

Evaluar la xilana y celulosa de olote, mediante FTIR-ATR y RMN después de tratarlos hidrotérmicamente bajo condiciones subcríticas y condensarlas con urea.

4.6. Tratamiento hidrotérmico y condensación con urea de los biopolímeros xilana y celulosa del olote

Para este tratamiento, se pesaron 0.5 g de xilana y 2.0 g de celulosa y suspendieron en 20 mL y 30 mL de agua respectivamente, y se trataron hidrotérmicamente a 160°C (xilana) y 285°C (celulosa) con tiempos de 60 minutos y una presión de 7 y 40 bares respectivamente. El producto de la reacción en cada caso se hizo reaccionar posteriormente con urea (H_2NCONH_2 , 99.5% de pureza) a 165 °C y 60 minutos, alcanzando una presión de 14 bares. Luego el producto fue congelado y liofilizado para su posterior caracterización mediante FTIR-ATR y RMN de sólidos de ^{13}C para determinar su naturaleza química.

OBJETIVO 6

Obtener una matriz polimérica rica en nitrógeno con ^{15}N a partir de la degradación hidrotérmica del olote y la subsecuente condensación con una fuente de nitrógeno (H_2NCONH_2), identificando la correspondiente naturaleza química de los compuestos nitrogenados (sales de amonio, aminas, amidas, etc.), mediante FTIR-ATR y RMN- ^{13}C y ^{15}N .

4.7. Tratamiento hidrotérmico del olote y condensación con urea-¹⁵N

Para llevar a cabo esta reacción se cargó un reactor Parr con 10 g de olote y 34-50 mL de agua y se calentó a 160°C y una presión de 7 bares realizando corridas a 60, 90 y 120 minutos. Estas condiciones de tiempo y temperatura se seleccionaron de los tratamientos que tuvieron mejores rendimientos en los estudios de la generación de grupos carboxílicos en el material soluble. Tanto el material sólido como la fracción soluble que se generaron en el tratamiento hidrotérmico se sometieron a una condensación con urea (H_2NCONH_2 al 99.5% de pureza y urea marcada al 98% con ¹⁵N). De tal manera que el reactor se cargó con 3 g de urea con 10% de ¹⁵N (siendo 2.7 g de urea sin marcar y 0.3 g de urea marcada). Esto es 0.3 g urea por cada gramo de olote agregado al reactor, equivalente a 1.4 g de nitrógeno contenido en la urea y 14% de nitrógeno. La condensación se llevó a cabo a una temperatura de 165°C y presión de 14 bares, durante un periodo de 60 minutos, el cual se contabilizó una vez que el reactor alcanzó las condiciones de operación deseada (Fig. 5).



Figura 5. Tratamiento hidrotérmico y condensación del olote en una etapa en un reactor Parr.

4.7.1 Técnicas analíticas empleadas para el análisis del olote condensado con urea

4.7.1.1. Análisis de Nitrógeno Total Kjeldahl (TKN) mediante espectrofotometría UV vis.

El contenido total de nitrógeno en el producto de las condensaciones con urea marcada al 10% con ¹⁵N se determinó mediante el método de Kjeldahl (Nessler, 2005). Este método se basa en la transformación del nitrógeno contenido en la muestra a sulfato de amonio, mediante la digestión con ácido sulfúrico en presencia de peróxido de hidrógeno.

Se pesaron muestras de 0.3 g base seca del olote condensado con urea en un matraz de 100 mL. Se le agregó 5 mL de ácido sulfúrico y se llevó a cabo la digestión a una temperatura de 460°C; después de 5 minutos, se añadieron 10 mL de peróxido de hidrógeno al 50% vía capilar a través de un embudo ubicado en la columna y se completó la digestión por 4 minutos más, hasta que se observó un medio transparente. Luego se removió el vaso y se dejó enfriar el producto de la digestión a temperatura ambiente. Para diluirse posteriormente con agua desionizada a 100 mL.

Después de la digestión, se tomaron muestras de 0.2, 0.3 y 0.5 mL para ser preparadas y analizadas en un espectrofotómetro DR5000 marca HACH, con una longitud de onda de 460 nm. La preparación consistió en tomar una muestra de la mezcla digerida (0.2, 0.3 y 0.5 mL) y colocarla en un cilindro graduado de 25 mL, al cual se le añadió una gota del indicador (anaranjado de metilo) y gotas de hidróxido de potasio 8N hasta que dio un color amarillo claro, luego se diluyó hasta cerca de 20 mL con agua desionizada.

Se añadieron 3 gotas de estabilizador mineral a la muestra contenida en el cilindro, al igual que al blanco preparado y se taparon los cilindros para ser agitados manualmente. También se agregaron 3 gotas de alcohol polivinílico como agente dispersante en cada cilindro y se llenó hasta la marca con agua desionizada y se homogenizó la mezcla. Por último se le añadió 1 mL de reactivo de Nessler (21194-49), se tapó y se invirtió por un minuto, para luego ser analizada en el espectrofotómetro. Se corrió un blanco con todos los reactivos mencionados pero sin la muestra resultante de la digestión.

El cálculo del nitrógeno total se llevó a cabo de acuerdo a la ecuación (5) para muestras sólidas:

$$\%N = \frac{0.0075 \times A}{B \times C} \quad (5)$$

Donde

A = Lectura de la muestra en el espectro, concentración en mg/L.

B = Muestra de olote condensando digerida en g.

C = Muestra (alícuota) de la digestión analizada en el espectro en mL.

0.0075 = Constante para el cálculo de porcentaje de nitrógeno en ppm.

4.7.1.2. Análisis Elemental de las muestras de olote condensadas con urea

Con este análisis se determinaron los porcentajes de carbono (C), hidrógeno (H) y nitrógeno (N), presentes en la matriz polimérica obtenida. Esta técnica destructiva consiste en pesar entre 2 y 4 miligramos de muestra y someterla a una oxidación térmica entre 1,600-1,800 °C, en ambiente de oxígeno, con lo que se consigue la conversión total y cuantitativa de los componentes en la forma de CO₂ (C), H₂O (H) y N₂ (N). Estos productos gaseosos son arrastrados al módulo de separación donde se produce la adsorción selectiva de CO₂ (en columna de cobre), H₂O (columna de Plata) y se miden individualmente por el detector de conductividad térmica (TCD). El primero en ser medido es el nitrógeno, que no es retenido y el de gran interés para el presente estudio, y posteriormente se produce la desorción térmica del CO₂ y por último el H₂O. Esta técnica es imprescindible para la determinación de la pureza de una muestra y por tanto es necesario que esté libre de disolventes e impurezas, las cuales afectarían los porcentajes teóricos de carbono, hidrógeno y nitrógeno.

4.7.1.3. Análisis de infrarrojo FTIR-ATR a muestras de olote condesando con urea

Se obtuvieron los espectros infrarrojo tanto de las fracciones insolubles del olote (sólida) tratado hidrotérmicamente a condiciones subcríticas y ricas en fracciones de celulosa y lignina, como de los biopolímeros aislados del olote (xilana, celulosa y lignina) y tratados hidrotérmicamente. También fueron analizados mediante esta técnica todos los productos condensados con urea. El equipo utilizado fue un espectrómetro Perkin-Elmer, modelo Spectrum GX, usando un aditamento PIKE MIRacle de reflectancia total atenuada horizontal (HATR) de reflexión simple y con cristal de diamante. Se obtuvieron espectros por duplicado en una ventana espectral de 4000 a 550 cm⁻¹ con una resolución de 4 cm⁻¹ y 16 barridos. A los espectros obtenidos se les corrigió la línea base, se suavizaron y normalizaron utilizando el software Spectrum de Perkin-Elmer, versión 3.02.01 (Spectrum 2000).

4.7.1.4. Análisis de RMN-¹³C y ¹⁵N del olote condensado con urea marcada al 10% con ¹⁵N

Las muestras de olote, proveniente del tratamiento hidrotérmico bajo condiciones subcríticas y la subsecuente condensación con nitrógeno, se analizaron mediante RMN-¹³C de sólidos mediante un espectrómetro de RMN Joel de 600 MHz (14 Teslas) modelo ECA 600, con una

frecuencia de análisis para ^{13}C de 150 MHz y de 60 MHz para el ^{15}N , equipado con una sonda DOTY de sólidos H-X de temperatura variable. Los análisis de ambos núcleos se realizaron mediante el experimento de CP-MAS (polarización cruzada de giro de ángulo mágico) con tiempos de relajación de 5s y tiempo de contacto de 3 ms para el ^{13}C y 6s y 5ms para el ^{15}N .

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJETIVO 1

Caracterizar químicamente el olote, para degradarlo hidrotérmicamente bajo condiciones subcríticas.

5. 1. Caracterización química del olote

La distribución del tamaño de partícula del olote molido se muestra en la Fig. 6. A la fracción retenida en la malla de 250 μm se le determinó la composición química en términos de los biopolímeros más importantes (celulosa, hemicelulosas y lignina) y otros componentes de bajo peso molecular (extraíbles y material inorgánico). La suma de holocelulosa (H_{ol}), lignina total (L_t), extractivos (E_x) y cenizas (C_z) hacen aproximadamente el 100% del olote integral (Tabla 1). El contenido de cenizas y extraíbles totales arrojaron valores que coinciden con los reportados en la literatura (Rowell y *col.*, 2000, Yang y *col.*, 2006, Rodríguez y *col.*, 2008, Córdoba y *col.*, 2010, Tappi 204 cm, 1997, Tappi 207 cm, 1999).

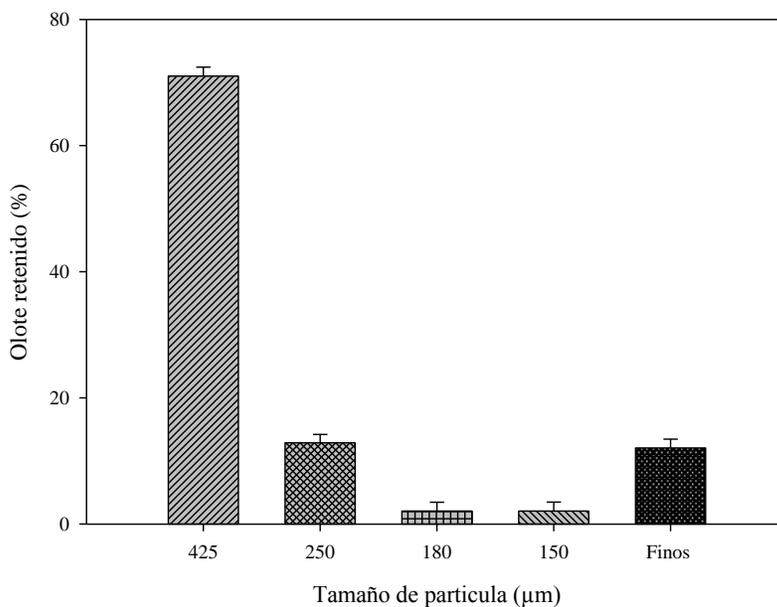


Figura 6. Distribución del tamaño de partícula de olote molido.

En cuanto al contenido de celulosa existe una discrepancia comparada con lo reportado por otros autores, la cual obedece probablemente a la retención de trazas de lignina y hemicelulosas, ya que no se practicó una corrección al respecto.

En el análisis de la composición de azúcares en el producto de la hidrólisis ácida de holocelulosa obtenido mediante HPLC que se reporta en la Fig. 6, se tiene una concentración de glucosa del 41%, xilosa 35% y en menor proporción arabinosa y celobiosa con un 5% respectivamente (Fig. 7). Si a la concentración de estos componentes se le sumaran los valores de lignina y cenizas, la sumatoria arrojaría un valor cercano al 100%. Hay que destacar que en este particular análisis apareció celobiosa, lo cual indica que la hidrólisis del material pudo no haber sido completa. De manera general, estos resultados confirman que el olote es un material lignocelulósico con un alto contenido de hemicelulosas, particularmente xilosa (Córdoba y col., 2010, Rowell y col., 2000, Yang y col., 2006, Samanta y col., 2012, Oliveira y col., 2010).

Tabla 1. Comparación de la composición química del olote (%) del presente estudio (en el recuadro rojo) con datos reportados por otros autores.

Componentes (%)	Olote*	Referencias		
		(Garrote et al., 2007a)	(Rivas et al., 2004)	(Thompson, 1995)
Pentosanos	40.6	No reporta	No reporta	No reporta
Hemicelulosas	33.6	31.1	39.0	33.7 - 41.2
Celulosa	45 ⁺	34.3	34.3	30.0 – 41.7
	50 ⁺⁺			
Lignina Klason	15.8	18.8	14.4	4.5 – 15.9
Cenizas	2.0	No reporta	No reporta	No reporta
Nitrógeno Total	0.5	No reporta	No reporta	No reporta

*= presente investigación; +(Determinado según Timell, 1961); ++(Determinado según Tappi 9m, 1954).

Es posible efectuar un cálculo del contenido de celulosa en el olote integral, utilizando los valores de los azúcares obtenidos mediante el análisis HPLC del hidrolizado de holocelulosa. Para ello tomamos el porcentaje de glucosa (41%) y le sumamos el doble del contenido de celobiosa (6%), ya que la celobiosa contiene dos unidades de glucosa, para obtener un total de 53%. Si partimos de un contenido de holocelulosa del olote integral del 78.7% obtenido por el método de Wise et al. (1946), la multiplicación de $53/100$ por 78.7% nos da un contenido de celulosa de aproximadamente 42%. Procediendo de manera similar, la suma de los porcentajes de xilosa (35%) y arabinosa (6%) en el hidrolizado, deben corresponder al total de hemicelulosas presentes en la holocelulosa. Así, la multiplicación de $(53/100)$ por 78.7%, arroja un valor de hemicelulosas del 32%. Este último valor es muy similar al contenido de hemicelulosas reportado por Garrote et al. (2007) y Rivas et al. (2004) y dentro del rango que reporta Thompson (1995). En el caso de la celulosa, estos valores son notoriamente menores a los contenidos de celulosa reportados en el cuadro 1 según el método de Timell (Timell, 1961) y Tappi (T9m-54).

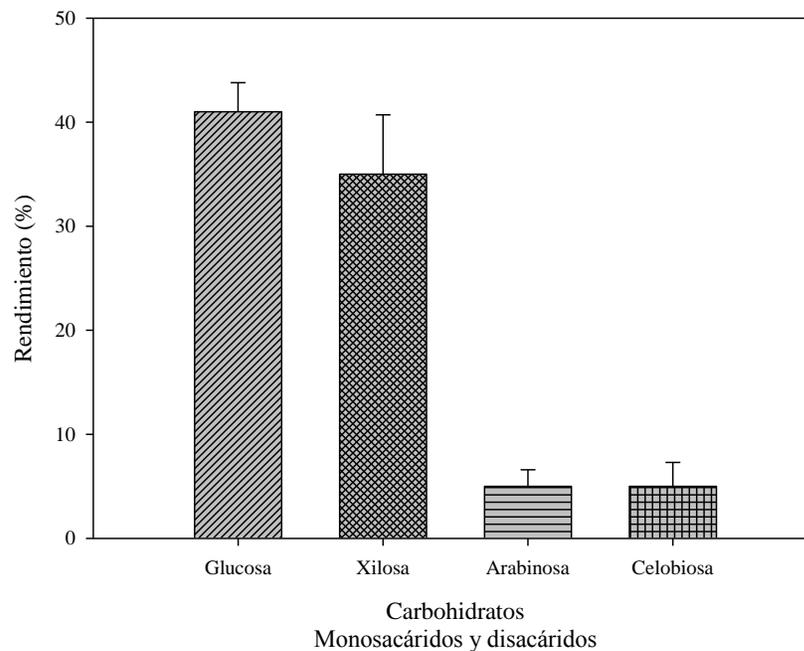


Figura 7. Carbohidratos presentes en holocelulosa de olote analizados mediante HPLC de un hidrolizado ácido.

OBJETIVO 2

Aislar los principales biopolímeros del olote: lignina, hemicelulosas (xilana) y celulosa del olote, para su posterior caracterización química.

5.2. Análisis de FTIR-ATR

5.2.1. FTIR-ATR de la xilana aislada de olote

El espectro de la preparación de xilana aislada según Timell en medio alcalino (Fig. 8) muestra bandas típicas de azúcares en 3422, 2927, 1421, 1228, 1049, 986 y 897 cm^{-1} , las cuales están asociadas con las señales características de la xilana (Samanta y *col.*, 2012, Oliveira y *col.*, 2010). La banda en 1161 cm^{-1} junto a la banda fuerte a 1045 cm^{-1} son debidas a las vibraciones de estiramientos C-O, la cual es característica de grupos glicosídicos como el presente en hemicelulosas (Sánchez y *col.*, 2012, Sun y *col.*, 2002, Oliveira y *col.*, 2010).

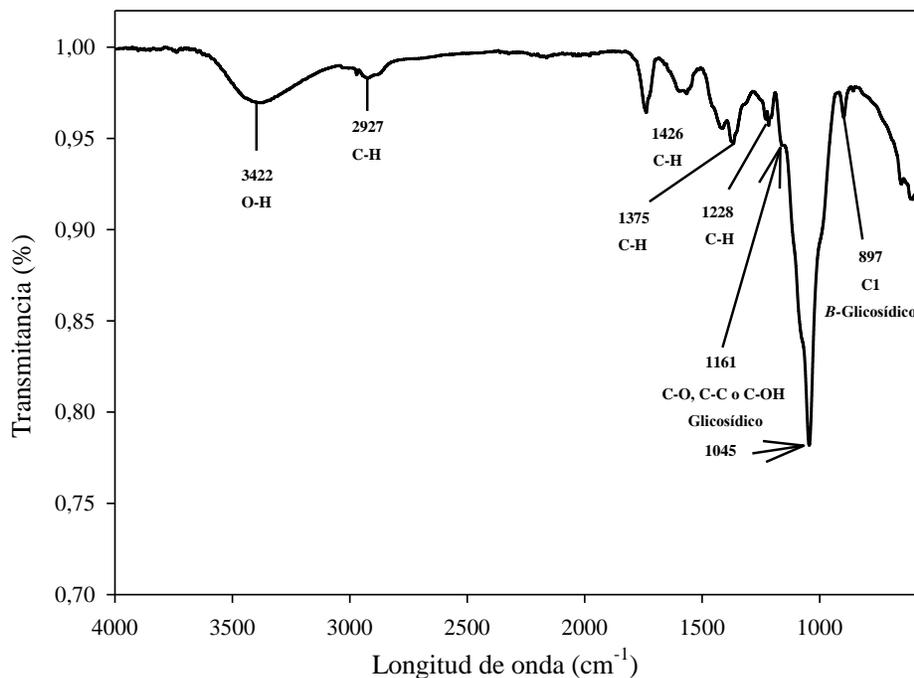


Figura 8. Espectro FTIR- ATR de xilana aislada de olote mediante hidrólisis alcalina.

5.2.2. FTIR-ATR de lignina de olote aislada mediante extracción con dioxano

En el caso de la lignina aislada al dioxano (Fig. 9), se observan señales atribuibles a los monómeros de la lignina, esto es p-hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) y siringilo (S), reflejados en señales a 1603 y 1513 cm^{-1} debidas a vibraciones del esqueleto aromático (Lapierre y *col.*, 1995, Baucher y *col.*, 1998, Buranov y Mazza, 2008).

Además se aprecian bandas a 1425 y 1328 cm^{-1} que corresponden la deformación en el plano del enlace C-H de la parte alifática de la cadena de fenilpropano. Las señales en la región de 1300 a 1000 cm^{-1} corresponden a estiramientos del tipo C-O provenientes de grupos fenólicos y alcóxidos presentes en las unidades H, G y S (Fig. 8). La banda alrededor de 833 cm^{-1} es típica de los enlaces C-H fuera del plano y se relaciona directamente con los grupos H, G y S (Faix, 1992, Monteil-Rivera y *col.*, 2013).

5.2.3. RMN- ^{13}C de la xilana aislada de olote

En el espectro de la xilana de olote (Fig. 10) se observan señales características de hemicelulosas (Kumar and Negi, 2012). Este espectro muestra cinco señales de carbonos y entre estas se puede ver, en el campo más bajo (δ 101.7 ppm), la señal característica de carbonos acetálicos (C-1) correspondiente a la D-xilopiranososa de unidades de xilana.

Las tres señales siguientes en δ 75.4, 74 y 72.6 ppm, corresponden a los carbonos C-2, C-3 y C-4, del anillo piranósico respectivamente, así como la última señal a 63.2 ppm que es atribuida al C-5 de este mismo sistema. Este resultado demuestra claramente que la xilana aislada se logró obtener bastante purificada mediante el proceso de extracción alcalina, mientras que frecuentemente las preparaciones de xilanas pueden presentar otros azúcares en las cadenas laterales (Ebringerova y Hromadkova, 1999, Garcia y *col.*, 2000, Karučáková y *col.*, 1994, Silva y *col.*, 1998, Whistler y Smart, 1953). Según estos resultados, junto con el análisis de carbohidratos del hidrolizado de holocelulosa, permiten concluir que la xilana del olote reportada en esta investigación pertenece al tipo arabinoglucuronoxilana (Fig. 8 y 10).

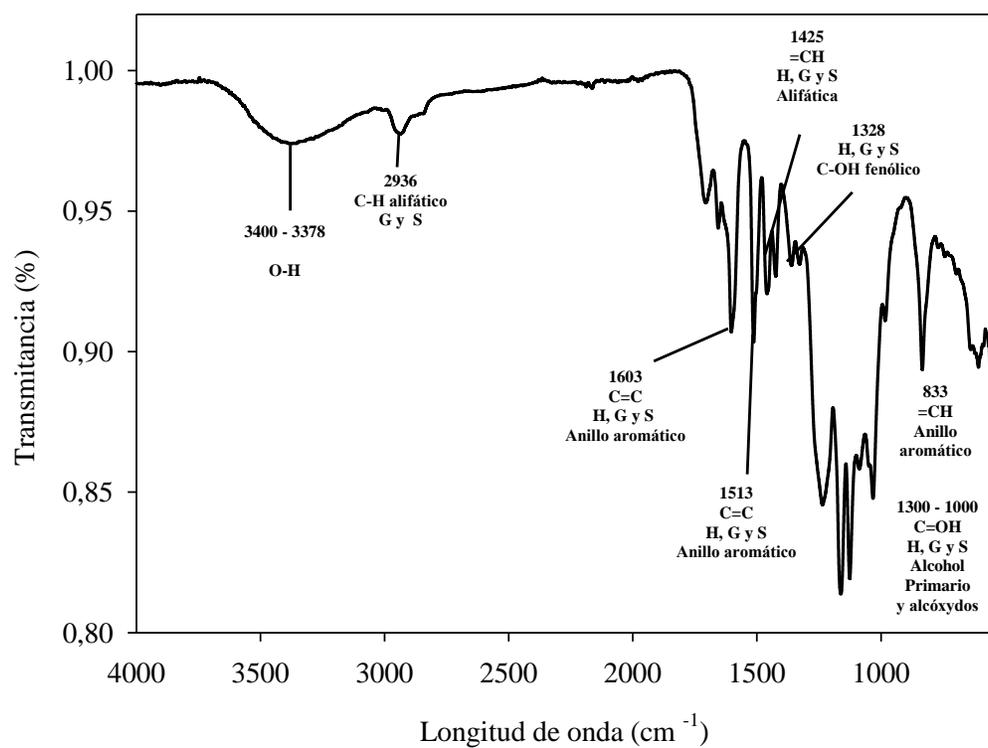


Figura 9. Espectro FTIR-ATR de lignina al dioxano de olote.

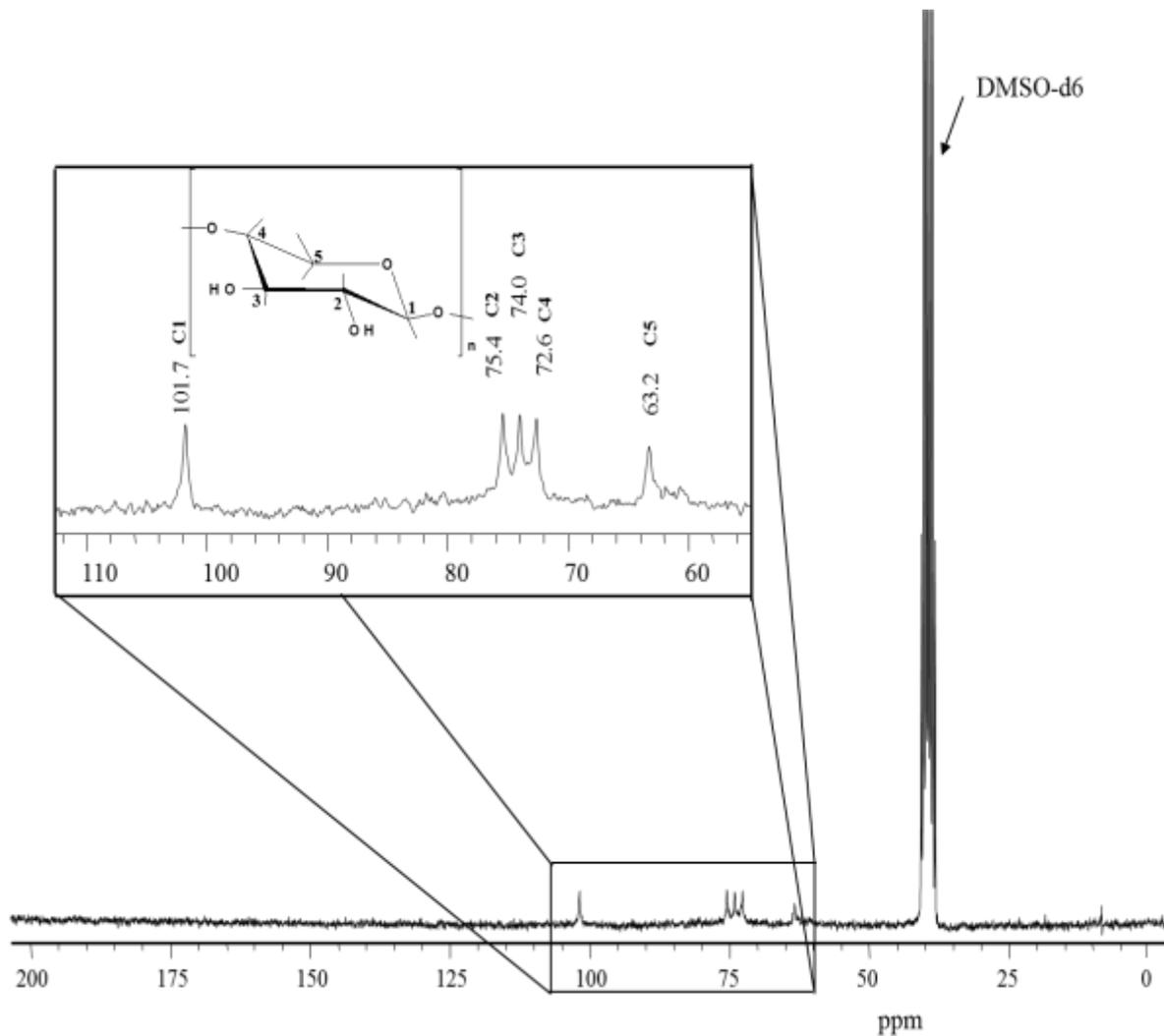


Figura 10. Espectro RMN- ^{13}C de xilana de olote con ampliación de la zona entre 110 a 55ppm.

OBJETIVO 3

Determinar las condiciones de hidromódulo, temperatura y tiempo de reacción para la degradación hidrotérmica del olote, bajo condiciones subcríticas en la concentración de carbohidratos y cuantificación de grupos carboxílicos de la fracción soluble.

5.3. Degradación hidrotérmica del olote

Las variables con impacto en la solubilización de materia orgánica del olote por efecto de tratamientos hidrotérmicos se estudió en dos etapas. En la primera etapa, se aplicó el diseño factorial multinivel 3^k ($3^3= 3 \times 3 \times 3$) con 2 repeticiones. Los factores que tuvieron efectos significativos fueron la temperatura y el tiempo (nivel de confianza de 95%). El rendimiento de los sólidos insolubles (43%, 44% y 49%) puede considerarse satisfactorio, ya que fue posible degradar más del 50% del olote a temperaturas entre 230°C y 300°C en un intervalo de tiempo de 45 a 60 min (Fig. 11).

El hidromódulo, como efecto simple, no mostró influencia directa apreciable sobre el rendimiento de los sólidos insolubles en el olote, pero al combinarlo con el tiempo, el efecto es apreciable. Sin embargo, de manera individual, estos factores pueden ser importantes en las reacciones de modificación de los biopolímeros del olote (hemicelulosas, lignina y la celulosa).

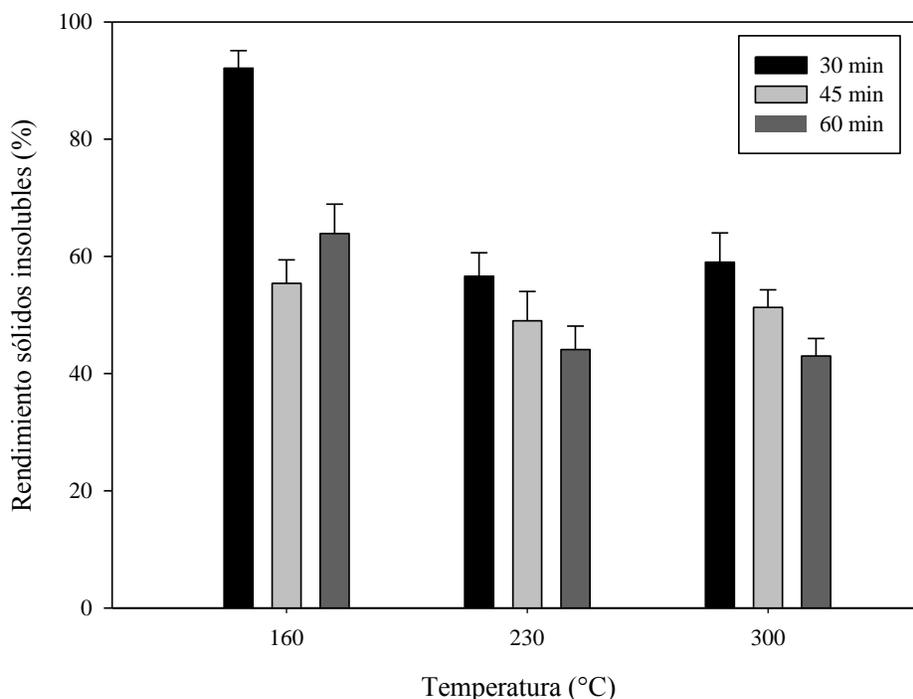


Figura 11. Rendimiento de la fracción insoluble del olote después del tratamiento hidrotérmico (primer diseño experimental).

OBJETIVO 4

Evaluar la eficiencia del tratamiento hidrotérmico bajo condiciones subcríticas en el olote integral, para la generación de grupos carboxílicos en los hidrolizados, rendimientos de sólidos insolubles y carbohidratos.

5.4. Evaluación de la eficiencia del tratamiento hidrotérmico en el olote para la generación de grupos carboxílicos en la fracción soluble mediante FTIR-ATR

Mediante este análisis se evaluó la eficiencia de la generación de grupos carboxílicos del tratamiento hidrotérmico sobre el olote. La asignación de las principales bandas en el espectro se muestra en el Tabla 2. La comparación de espectros FTIR del olote tratado hidrotérmicamente con respecto al olote sin tratar (Fig.12 a-d) muestra que las bandas en 1603 y 1106 cm^{-1} se encuentran mejor definidas después del tratamiento. En principio, estas bandas corresponden a la vibración asimétrica C-O-C del anillo hemiacetal de las unidades monoméricas de los carbohidratos (Fig. 12 b, c, d).

Tabla 2. Bandas (cm^{-1}) de FTIR para el olote modificado hidrotérmicamente.

Asignación	Olote modificado (Longitud)	Referencia
O-H estiramientos de los grupos hidroxilos	3300-3640	(Fengel y Ludwig, 1991, Sánchez y col., 2012)
C-H estiramientos en CH_2 y CH_3	3000-2850	
C-O-C vibración asimétrica del anillo hemiacetal de las unidades monoméricas de los carbohidratos	1320 y 1000	
C-H vibración del esqueleto aromático 3 bandas característica de lignina	1603, 1513 y 1455	(Monteil-Rivera y col., 2013, Faix, 1992,
C=O Carbonilos	1760-1600	Hergert, 1971, Heitner
C=O-R grupos carboxilos	1710 a 1690	y col., 1941)

Se pudo observar en los tratamientos a 300°C, 45 minutos y 20 mL (Fig. 12 c), un incremento significativo entre las bandas 1690-1710 cm^{-1} correspondiente a grupos carboxilos, a la vez que se observa una reducción marcada entre las bandas 950-1115 cm^{-1} correspondientes a estiramientos C-O de grupos OH y éteres de azúcares presentes en las muestras. Esta reducción está relacionada con la oxidación de grupos OH a grupos carbonilos (ácidos carboxílicos, aldehídos y cetonas) como resultado del tratamiento térmico.

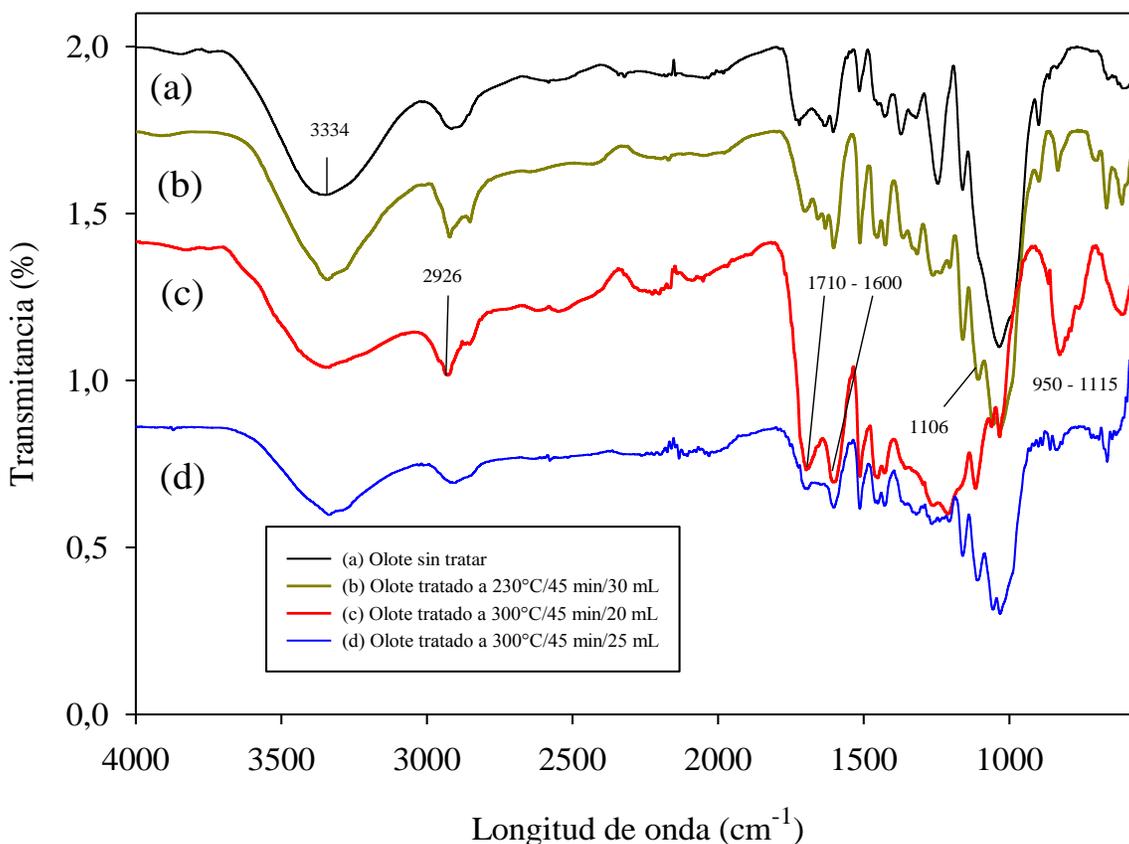


Figura 12. Espectros FTIR-ATR de olote: a) sin tratar; b) olote tratado hidrotérmicamente a 230°C/45 min/30 mL de agua; c) 300°C/45 min/20 mL y d) 300°C/45 min/25 mL.

5.4.1. Factor de severidad (R_0)

El factor de severidad es un valor numérico que representa la combinación de los efectos de la temperatura y el tiempo de reacción sobre el rendimiento de los tratamientos de degradación hidrotérmica en condiciones subcríticas. Se obtuvo mayor rendimiento de la fracción soluble,

cuando los valores del factor de severidad fueron superior a 3.55×10^5 (Ejemplo: combinaciones de 230°C con 60 y 45 min y 300°C con 45 y 60 min con R_o [min] de 4.68×10^5 min, 3.55×10^5 min, 4.37×10^7 min y 5.89×10^7 min respectivamente) (Fig. 13). En general se observó que a mayor temperatura, el R_o [min] también se incrementa proporcionalmente. Sin embargo, el olote sigue siendo muy recalcitrante a pesar de haber tenido un tratamiento hidrotérmico severo. Algunos autores reportan que esta recalcitrancia es atribuida a los vestigios de ferulatos de la lignina estrechamente ligada con heteroxilanas o complejos carbohidratos de arabinosilana (Ralph y *col.*, 1998a, Lapierre et al., 2001). Fue interesante observar que a 160°C y 45 minutos se obtuvo uno de los rendimientos más bajos (55.4%) de la fracción insoluble empleando un R_o [min] de 3.45×10^3 (Fig. 13).

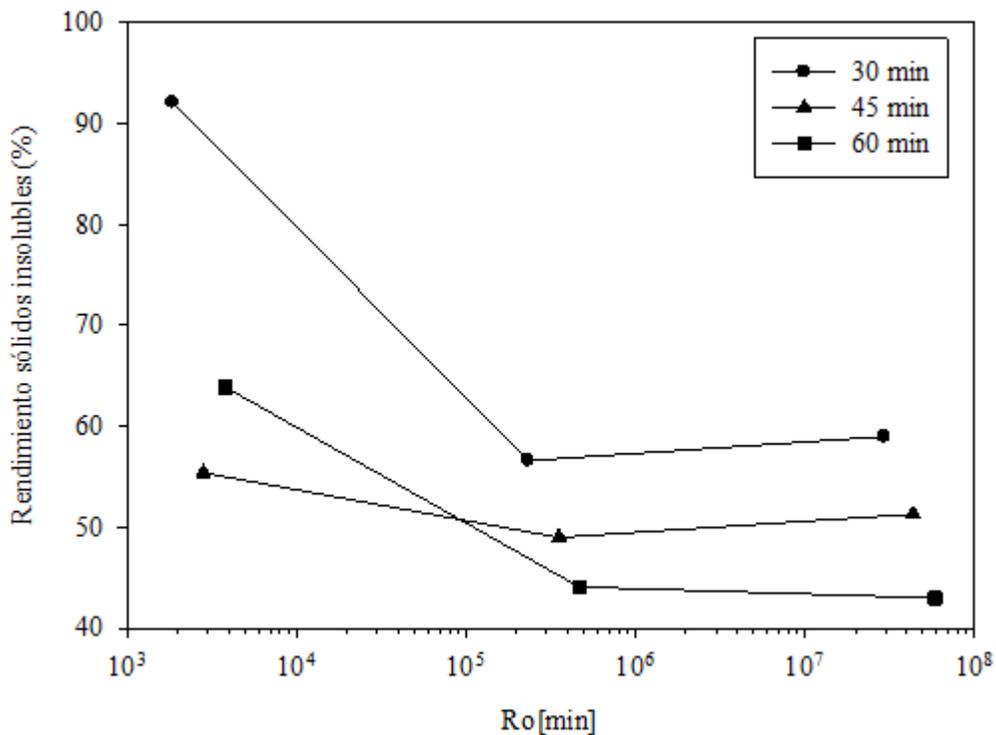


Figura 13. Rendimiento de sólidos insolubles resultante del tratamiento hidrotérmico del olote y su relación con el factor de severidad (R_o).

5.4.2. Rendimiento de sólidos insolubles en la generación de grupos carboxílicos

Para el segundo tratamiento hidrotérmico se aplicó el diseño experimental 3^k ($3^2= 3 \times 3$), donde sólo se consideraron los factores de temperatura y tiempo de reacción. Se pudo observar que para este experimento, la temperatura fue el único factor que influyó significativamente con $p < 0.05$ y tuvo influencia apreciable sobre el rendimiento de los sólidos insolubles (Fig. 14). El rendimiento de sólidos insolubles fue satisfactorio si se tiene en cuenta que en la mayoría de los tratamientos fue posible degradar más del 50% del carácter recalcitrante del olote. El rendimiento más bajo de la fracción insoluble después del tratamiento hidrotérmico del olote fue de 42.8% obtenido a una temperatura de 300°C y 60 min.

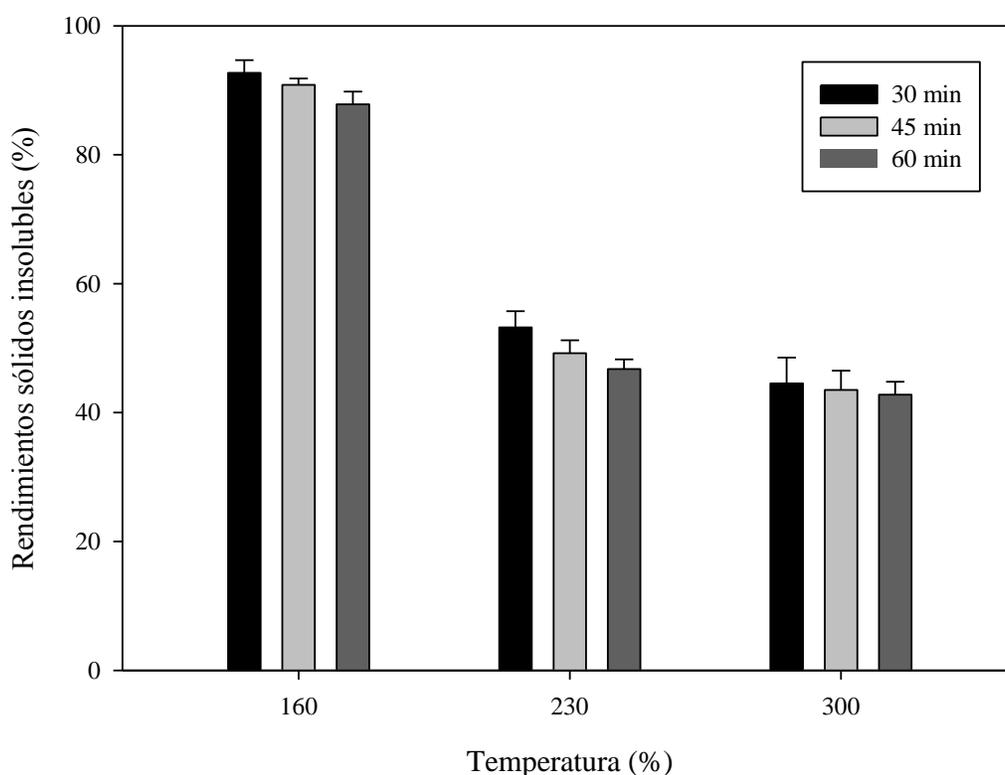


Figura 14. Rendimiento de la fracción insoluble del olote después del tratamiento hidrotérmico (segundo diseño experimental).

5.4.3. Concentración de grupos carboxílicos en la fracción soluble de olote

Se observó una mayor concentración de grupos carboxílicos cuando se trabajó con temperaturas de 160°C en todos sus tiempos (30, 45 y 60 minutos); esto era de esperarse, si se tiene en cuenta

que a esta temperatura comienza la degradación de las hemicelulosas y la porción amorfa de la celulosa, conduciendo a la formación de fragmentos de cadena corta, conteniendo grupos carboxílicos (Fig. 15). El objetivo del diseño experimental fue lograr la generación de una gran cantidad de estos grupos, para utilizarlos en la fijación de nitrógeno en un etapa subsecuente de condensación con urea (Bhargava y *col.*, 2006). En resultados de investigaciones de pirólisis sobre diversos tipos de biomasa (Radlein y *col.*, 1997) se reportan entre 6 y 11 moles de grupos carboxilo, carbonilo y grupos fenólicos, los cuales parecen estar disponibles para reacciones posteriores. En nuestra investigación, los grupos carboxílicos generados estuvieron presentes mayormente en la fracción soluble resultante del tratamiento hidrotérmico, constituida presumiblemente de fragmentos de xilana y lignina con una apreciable concentración de 29.3 meq/100g de olote (Fig. 15).

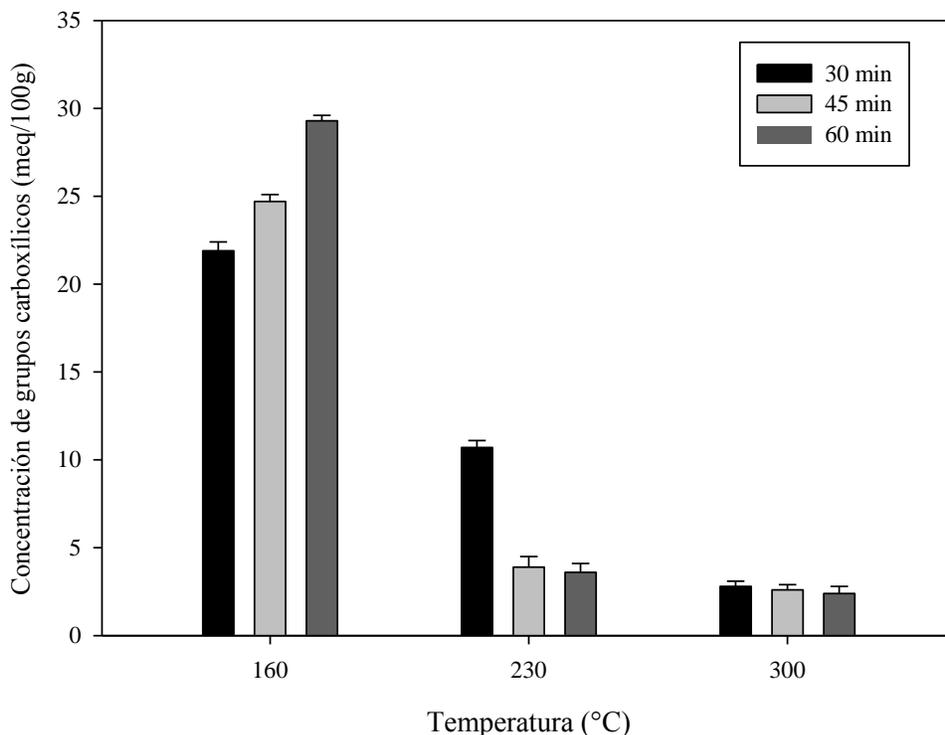


Figura 15. Concentración de grupos carboxílicos en fracción soluble de olote tratado hidrotérmicamente (meq/100 g).

5.4.4. Azúcares totales en la fracción soluble de olote después del tratamiento hidrotérmico

La mayor concentración de azúcares totales en la fracción soluble de los tratamientos se obtuvo a temperaturas de 230 °C en todos los tiempos evaluados (30, 45 y 60 min), obteniendo concentraciones de 12.78 mg/mL, seguida de 2.88 mg/mL, y 1.91 mg/mL respectivamente. Esto contrasta con los menores rendimientos a 160°C en todos sus tiempos (2.82 mg/mL, 1.66 mg/mL y 0.81 mg/mL respectivamente) (Fig. 16). Sin embargo, a una temperatura mayor a los 230°C, la concentración de azúcares totales disminuyó (1.87 mg/mL). Esto puede ser debido a que la degradación de los carbohidratos, sobre todo las hemicelulosas, ocurre a todas las temperaturas; sin embargo a temperaturas muy altas, los azúcares solubilizados se degradan a otro tipo de compuestos no estudiados en esta investigación, como pueden ser furfural e hidroximetilfurfural. De los resultados de esta etapa se puede aseverar que los mejores rendimientos en cuanto a la concentración de carbohidratos en la fracción soluble se obtienen a temperaturas que van de 160°C a 230°C y tiempos de 30 a 60 min.

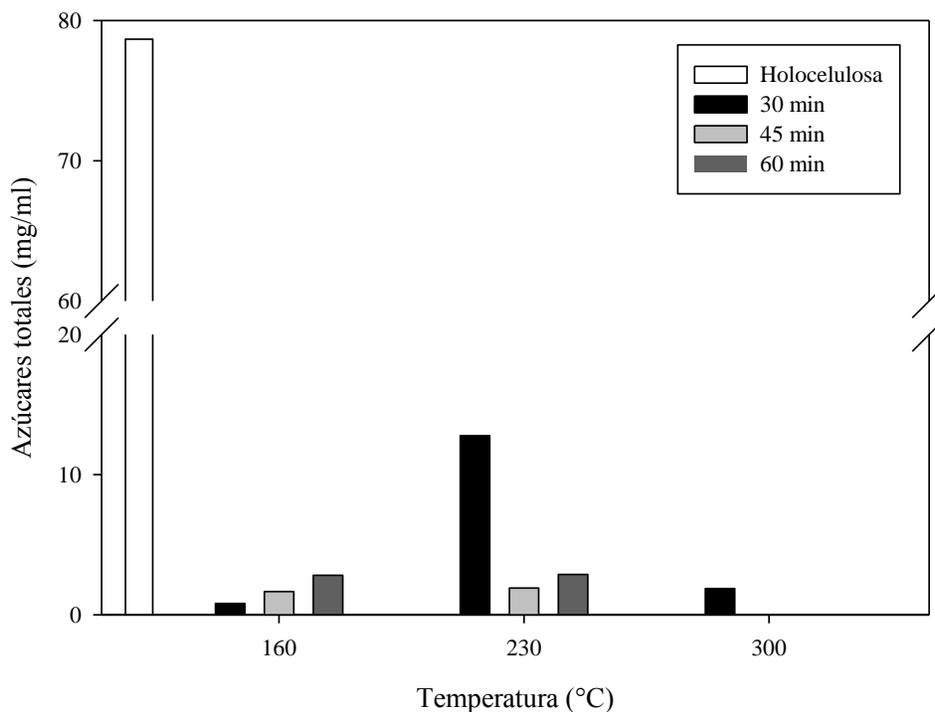


Figura 16. Azúcares totales en la fracción soluble de olote después del tratamiento hidrotérmico (mg/mL).

OBJETIVO 5

Analizar la xilana y celulosa de olote, mediante FTIR-ATR y RMN después de tratarlos hidrotérmicamente bajo condiciones subcríticas y condensarlas con urea.

5.5. Análisis de la xilana y celulosa de olote después del tratamiento hidrotérmico y condensación con urea, mediante FTIR-ATR y RMN-¹³C

Los productos de estos tratamientos se analizaron solo de manera cualitativa mediante FTIR-ATR y RMN-¹³C, con el fin de investigar la naturaleza química de las especies nitrogenadas después de someter estos polímeros individualmente al tratamiento hidrotérmico y condensación con urea.

5.5.1. Análisis utilizando la técnica FTIR-ATR para xilana de olote tratada hidrotérmicamente y condensada con urea

En la Fig. 17 se observan estiramientos de N-H en 3211, 3336 y 3428 cm^{-1} , que se atribuyen a amidas, y aminas primarias y secundarias. Entre los 1583-1656 cm^{-1} se encuentran estiramientos que se atribuyen a C=O o C=C de aromáticos. Otra evidencia de la presencia de nitrógeno en forma de amina primaria C-N se encuentra a 1456 cm^{-1} y en 1314 cm^{-1} (C-N aminas aromáticas y alifáticas respectivamente), mientras que la señal a 893 cm^{-1} , correspondiente a flexiones de grupos N-H, se redujo y se desplazó a 780 cm^{-1} .

5.5.2. Análisis utilizando la técnica FTIR-ATR para celulosa de olote condensada con urea

En la Fig. 18 para el caso de la celulosa de olote, no se pudo observar de manera clara la presencia de señales de nitrógeno. Sin embargo, se observó una pequeña modificación a 3428-3216 cm^{-1} que son estiramientos de N-H, correspondientes a señales de amidas y aminas. Entre 1590-1543 cm^{-1} se observan flexiones que se atribuyen a N-H de amidas secundarias. Otra evidencia de la presencia de nitrógeno en forma de amina primaria N-H en flexión se encontró a 1456 cm^{-1} . Ahora bien, este análisis no aporta información puntual de cómo las especies nitrogenadas están enlazadas en el material, por lo que para obtener más información sobre esto, se recurrió a la técnica de RMN-¹³C y ¹⁵N.

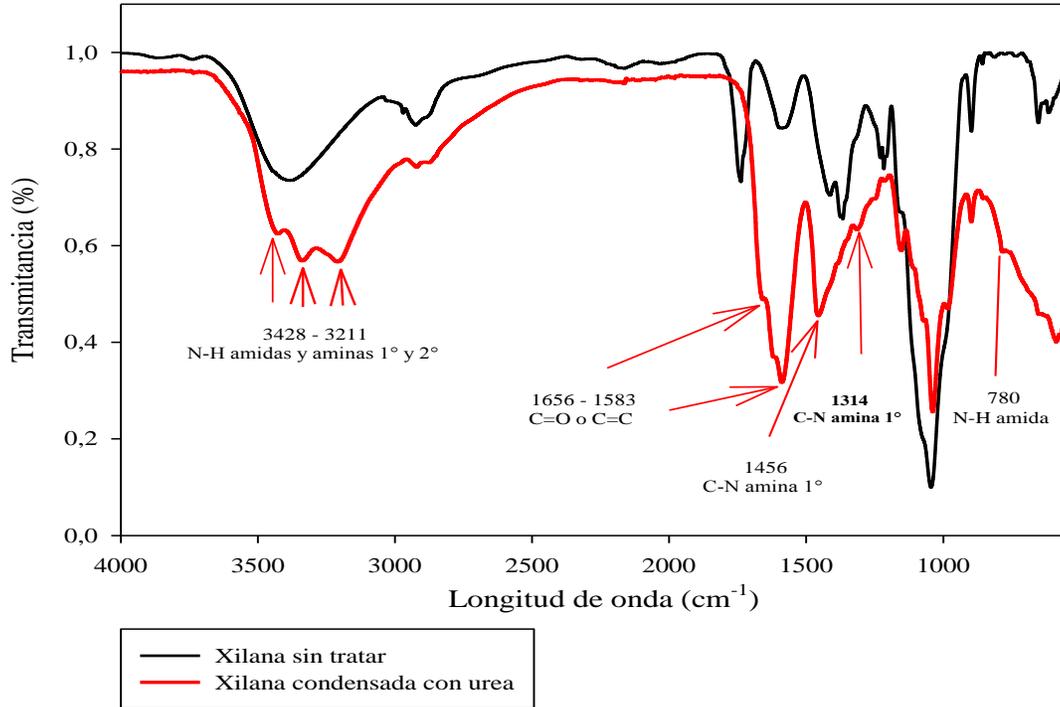


Figura 17. Espectro de FTIR-ATR de xilana de olote sin tratar y xilana condensada con urea.

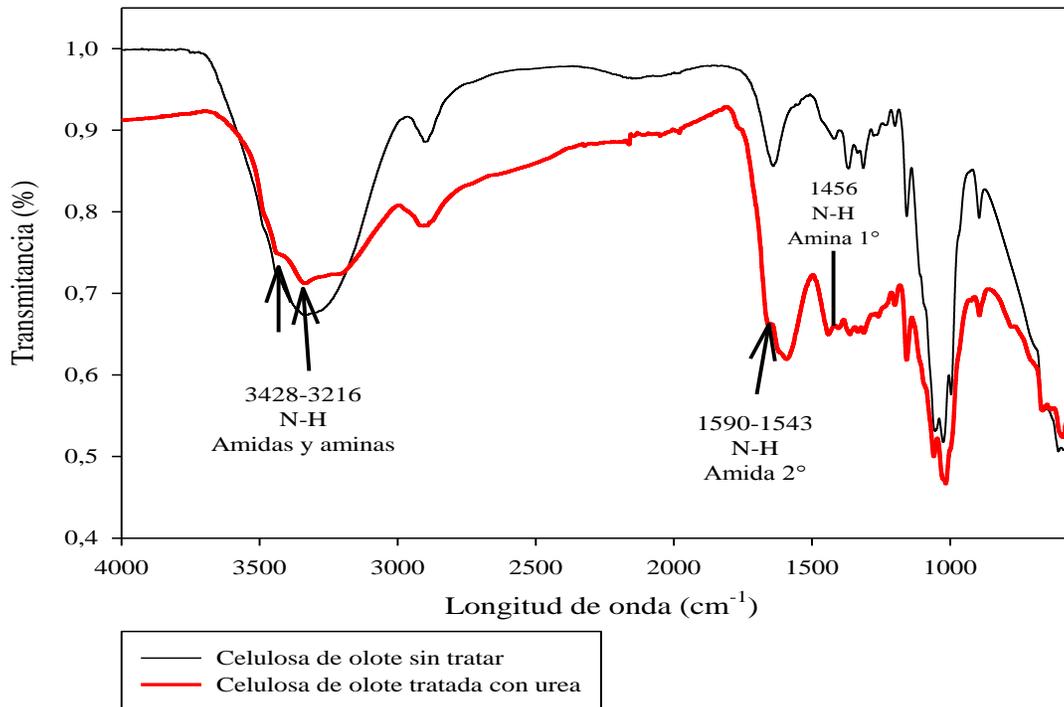


Figura 18. Espectro de FTIR-ATR de celulosa de olote sin tratar y celulosa tratada hidrotérmicamente condensada con urea.

5.5.3. Análisis de RMN-¹³C de sólidos de xilana de olote tratada hidrotérmicamente y condensada con urea

El espectro de la xilana muestra a δ 101.7 ppm la señal característica de carbonos acetálicos (C-1) correspondiente a azúcares como la D-xilopiranososa de las unidades de xilana (Fig. 19). Las tres señales siguientes en δ 75.4, 74 y 72.6 ppm, corresponden a los carbonos C-2, C-3 y C-4, respectivamente, del anillo piranósico. La última señal a 63.2 ppm es atribuida al C-5 de este mismo sistema. En el campo más bajo de δ 165 ppm se encuentra el átomo de C del carbonilo (C=O) de la urea sin reaccionar.

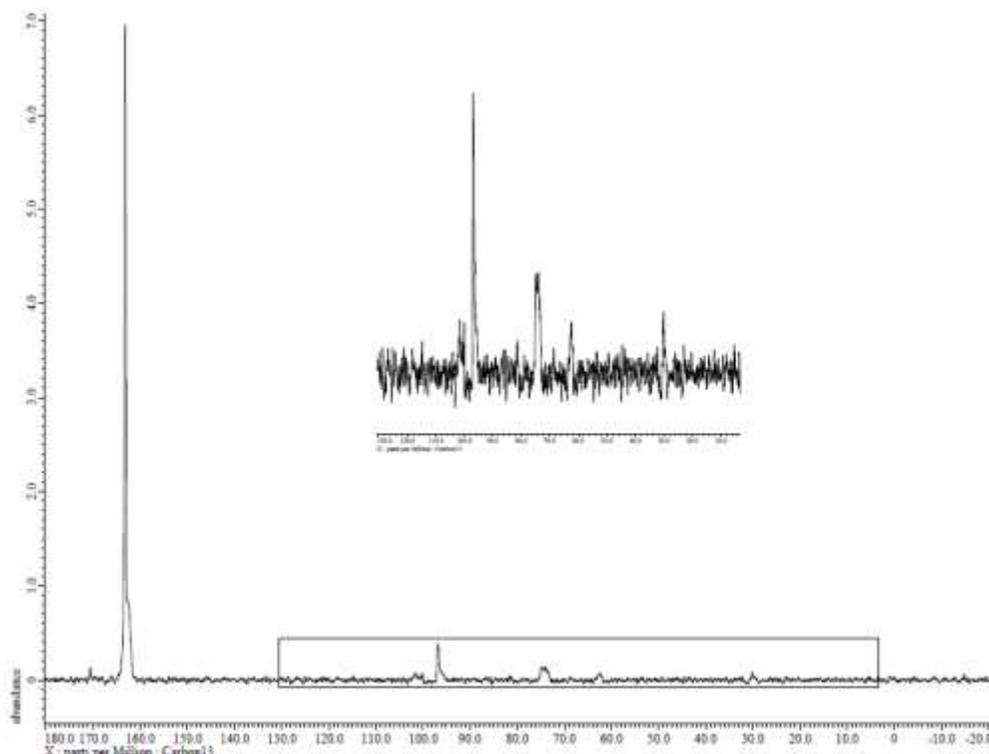


Figura 19. Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹³C xilana de olote condensada con urea.

5.5.4. Análisis de RMN-¹³C de sólidos de celulosa de olote tratada hidrotérmicamente y condensada con urea

El espectro de RMN-¹³C para la celulosa condensada con urea (Fig. 20) muestra las señales típicas de la celulosa y ninguna evidencia de la reacción de esta con la urea. Las principales señales de 72, 74 y 75 ppm se deben a C-2, C-3 y C-5 de la celulosa, mientras el pico a 65 ppm puede asignarse a los componentes cristalinos de C-6 en hexosas. Las señales en 85 y 88 ppm surgen de componentes no cristalinos y cristalinos de C-4, y la señal en 105 ppm del carbono anomérico C-1 de celulosa. Sin embargo, es evidente que la urea no reaccionó covalentemente con la celulosa, ya que la señal del carbonilo C=O coincide con el desplazamiento químico de la urea a 165 ppm de igual manera que en los ensayos con la xilana.

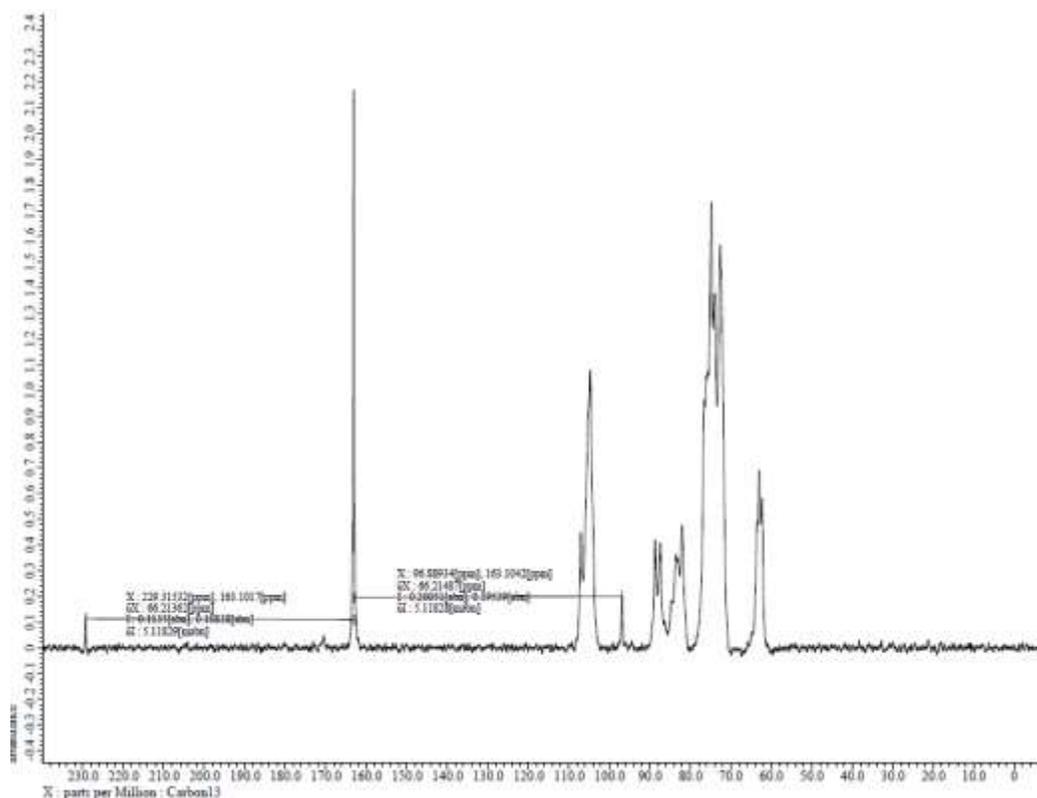


Figura 20. Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹³C celulosa de olote condensada con urea.

Estos resultados demuestran que los tratamientos hidrotérmicos de las xilanas y celulosa no fueron suficientemente severos como para generar grupos ácidos (principalmente carboxilos) en los polímeros y en sus fracciones solubles. Tampoco la urea no fue lo suficientemente alcalina en las condiciones utilizadas para modificar químicamente las moléculas de celulosa mediante

enlaces covalentes con nitrógeno. Al menos, no se observan señales de ello en los espectros de las figuras 42 y 43. Esto sugiere que se requiere de condiciones más adecuadas para que el nitrógeno de la urea actúe más nucleofílicamente con los grupos hidroxilos más accesibles en la superficie de la xilana y celulosa o simplemente pueda ser necesario incrementar el tiempo de reacción.

OBJETIVO 6

Obtener una matriz polimérica rica en nitrógeno con ^{15}N a partir de la degradación hidrotérmica del olote y la subsecuente condensación con una fuente de nitrógeno (H_2NCONH_2), identificando la correspondiente naturaleza química de los compuestos nitrogenados (sales de amonio, aminas, amidas, etc.), mediante FTIR-ATR y RMN- ^{13}C y ^{15}N .

5.6. Análisis de nitrógeno total Kjeldahl (TKN) en los productos de los tratamientos hidrotérmicos de olote seguidos de condensación con nitrógeno marcado (isótopo ^{15}N) H_2NCONH_2

El contenido de nitrógeno total fijado en el olote después de la condensación con urea (10% de urea marcada con ^{15}N), fue de 6.39% del 14% de nitrógeno incorporado, lo cual representa 45.71% del nitrógeno.

En el caso donde se trabajó con urea- ^{15}N total, el contenido de nitrógeno total fijado en el olote fue 7% del 14% de ^{15}N incorporado, lo cual representa el 49.5% de nitrógeno. Estos resultados se encuentran dentro del rango reportado para materiales lignocelulósicos nitrogenados empleados como fertilizantes (Coca 1984; 1985; Martínez y *col.*, 1992; Simón y *col.*, 2005).

Los reportes de fijación de nitrógeno (6.39% del 14% incorporado) para la matriz polimérica obtenida con el 10% de urea- ^{15}N , fueron similares a los valores reportados por Riera y *col.*, (1991) cuando obtuvieron fertilizantes húmicos por oxiamonificación de hidrolizados de residuos en semillas de aceituna. En ese estudio se utilizaron temperaturas mucho más elevadas en la

condensación (210°C) y amoníaco como fuente de nitrógeno, obteniendo dos fracciones; una fracción soluble en agua que contenía la mayoría del nitrógeno (10-13% en peso) y una fracción sólida con un contenido de nitrógeno muy baja (<4.0% en peso).

Por otro lado, el contenido de nitrógeno en el olote tratado con 100% de urea-¹⁵N, fue de 6.1% y 7.0% (0.145 g y 14.5% del nitrógeno incorporado al reactor), lo cual representa solamente 0.061 g y 0.07 g de eficiencia de nitrógeno (41.9% y 49.5% respectivamente del nitrógeno total fijado en el producto). Resultado que era de esperarse si se consideran las características de la urea, ya que ésta, a pesar de ser muy reactiva, presenta poca estabilidad y una alta volatilidad, esto indica que grandes cantidades del NH₃ añadido no reaccionaron durante el tratamiento, pero se observó mejores resultados con urea-¹⁵N (Chen y *col.*, 2005).

Estos resultados sugieren, que a pesar de que en el pretratamiento hidrotérmico, el proceso de autohidrólisis pudo generar compuestos de cadena corta (bajo peso molecular) conteniendo grupos carboxilos y posiblemente aldehídos responsables de reaccionar con la urea-¹⁵N, la oxidación de estos azúcares pudo haber sido una reacción limitante para fijar un mayor porcentaje de nitrógeno en la etapa de condensación con urea.

5.6.1. Análisis Elemental

La relación C/N en el análisis elemental, antes y después del lavado del producto condensado osciló entre 19.5 y 20.8. Con frecuencia se recurre a la relación C/N para valorar la tasa de mineralización de la materia orgánica o su grado de humificación. Estos resultados corresponden a la relación C/N planteado en los objetivos de la investigación y se encuentran dentro del rango reportado para materiales lignocelulósicos nitrogenados empleados como fertilizantes (Coca 1984; 1985; Martínez y *col.*, 1992; Simón y *col.*, 2005).

5.6.2. FTIR-ATR del olote condensado con urea marcada

Mediante este análisis no fue posible detectar la presencia de nitrógeno en la forma de estiramientos N-H en el intervalo 3250–3400 cm⁻¹, debido a que se traslapa con la señal de OH

asociados a puentes de hidrógeno. Por otra parte, se observan bandas entre los 1580-1650 cm^{-1} , las cuales se puede atribuir a estiramientos de C=O del tipo de amida I y amida II ($-\text{NH}_2$), aunque también puede asociarse a bandas de C=C de aromáticos. Sin embargo, se observó la presencia de la banda de estiramiento C-N nitrógeno en forma de amida a 1409 cm^{-1} y entre los 1250 – 1335 cm^{-1} de C-N aminas aromáticas y alifáticas, mientras que la señal de 897 cm^{-1} se puede asignar a N-H de amina primaria y secundaria. Finalmente, la señal de 614 cm^{-1} fue atribuida a los estiramientos N-H de amidas (Fig. 21).

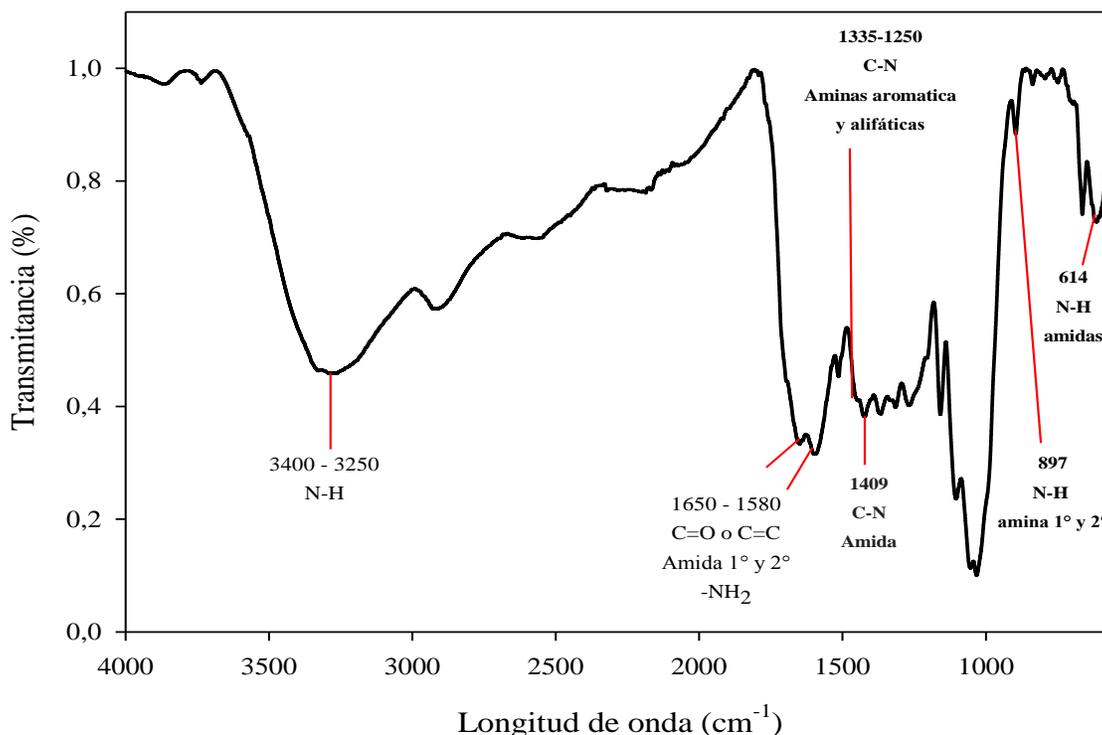


Figura 21. Espectro de FTIR-ATR de olote condensado con urea- ^{15}N granulada.

5.6.3. Análisis de RMN- ^{13}C de sólidos del producto condensado con urea

El espectro de RMN- ^{13}C de sólidos del olote tratado hidrotérmicamente y condensado con urea (Fig. 22) está dominado por la celulosa. La estructura del polímero de celulosa se determinó por RMN- ^{13}C CPMAS a través de las señales a 72, 73 y 75 ppm correspondientes a C-2, C-3 y C-5, en tanto que a 65 ppm se tiene al C-6 de la glucopiranososa. Las señales a 88 y 85 ppm se atribuyen a los componentes cristalinos y no cristalinos de C-4, respectivamente. A 105 ppm se obtiene la señal del C-1 o carbono anomérico de la celulosa. La señal que apareció después del

tratamiento con urea se observa a 55 ppm la cual es asignada a los carbonos C-2 o C-3 del polímero de la celulosa que se encuentran enlazados con ^{15}N del tipo amina. La presencia de otras especies nitrogenadas en la celulosa también se observan a 147 y 155 ppm, las cuales se pueden atribuir a uretanos y/o carbamatos (R-NH-C(=O)-O-R'). Por último se observa una señal a 177 ppm, la cual puede deberse a grupos carbonilo formados durante el mismo proceso de condensación (Fig. 22).

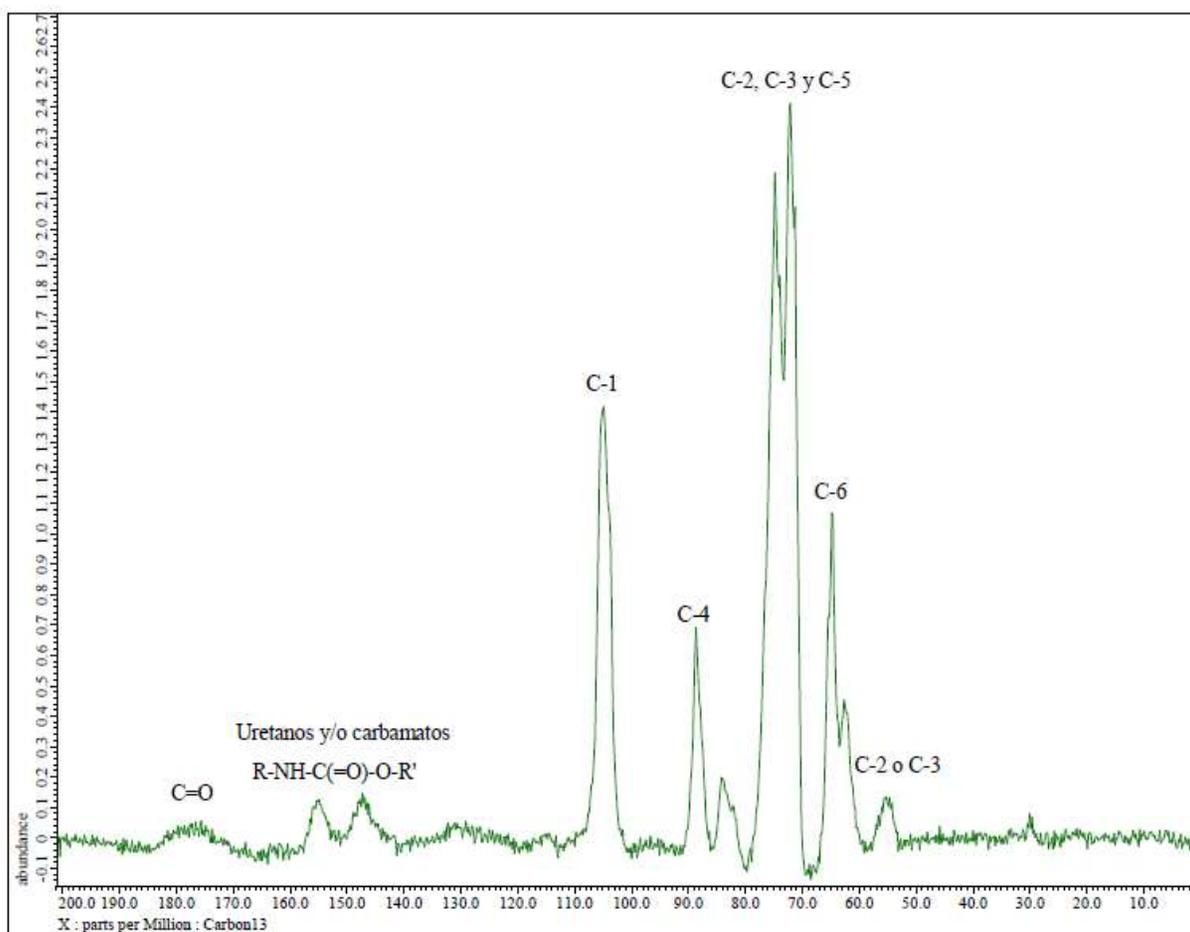


Figura 22. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C de sólidos del olote condensado con urea marcada.

5.6.4. Análisis de RMN- ^{15}N sólidos del producto condensado con urea

Se pudo evidenciar la presencia de enlaces covalentes generados en la reacción de condensación con urea- ^{15}N , mediante el espectro de RMN- ^{15}N . En el espectro se observa una señal ancha (70-140 ppm) debida a carbamatos y/o uretanos y a 18 ppm se observa otra señal que se atribuye a grupos amina. Estas especies representan un 83.9% y 16.1% respectivamente del 7% de nitrógeno total fijado (Fig. 23). El olote enriquecido con ^{15}N se evaluó en solución acuosa y es de carácter ácido, con un pH de 4 a 6. Se puede decir que este sería el pH ideal para el normal desarrollo de las plantas donde sus valores están entre 6 y 7.

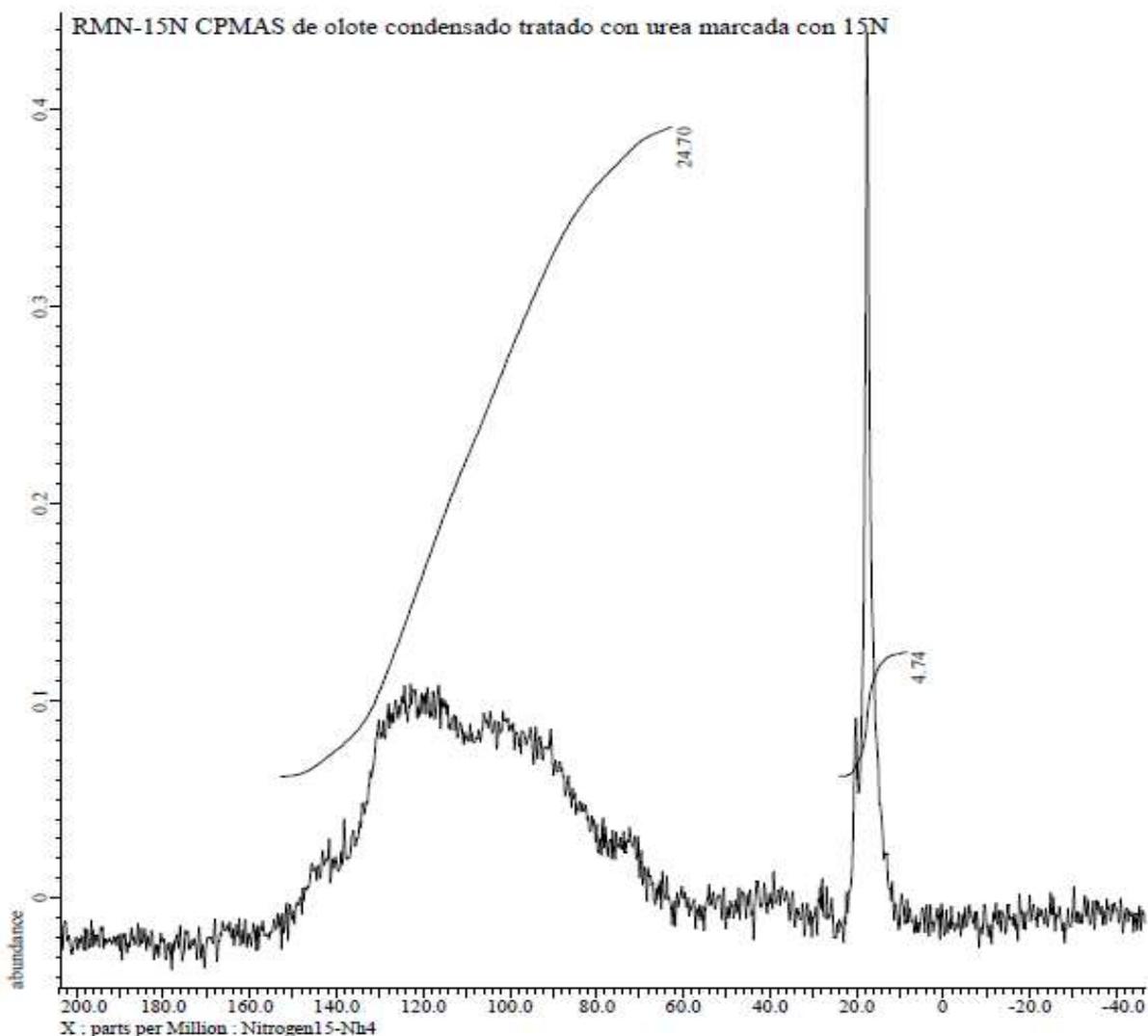


Figura 23. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^{15}N de sólidos del olote condensado con urea marcada.

VI. CONCLUSIONES

En esta investigación se empleó un proceso hidrotérmico para tratar olote, utilizando solamente agua a condiciones subcríticas ($T_{\max} = 300^{\circ}\text{C}$ y $P_{\max} = 84.8 \text{ atm}$) y tiempos menores a una hora. Se determinó el efecto de la relación de hidromódulo, temperatura y presión (Factor de severidad) sobre el rendimiento de la fracción soluble obtenida y la generación de ácidos orgánicos. Tanto la fracción soluble como el residuo del pre-tratamiento se condensaron con urea y se determinó la fijación de nitrógeno sobre la matriz sólida resultante. Adicionalmente se investigó el tipo de especies de nitrógeno fijadas en el residuo.

En este proceso aproximadamente el 50% del olote fue convertido a productos solubles en agua. La mayor parte de las xilanas y una porción de lignina presentes en el olote, pasaron a formar parte de la fracción soluble después del tratamiento hidrotérmico.

El análisis estadístico de los datos experimentales de los tratamientos hidrotérmicos mostró que la temperatura y el tiempo de reacción fueron los factores con un impacto significativo sobre los rendimientos de los sólidos insolubles del olote, mientras que la temperatura es el único factor que tiene influencia directa sobre la generación de grupos carboxílicos en la fracción soluble. Los análisis de titulación potenciométrica mostraron que el contenido máximo de grupos carboxílicos en la fracción soluble fue de 29.3 meq/100 g de olote (165°C y tiempos menores a una hora).

Se considera que los ácidos orgánicos de la fracción soluble fueron los principales responsables de la fijación de nitrógeno en la reacción de condensación con urea de la fracción soluble y sólida (en una etapa). Una concentración de nitrógeno máxima del 7% se logró fijar en el producto mediante esta reacción, además de que el producto contiene elevadas proporciones de celulosa, lignina y derivados de hemicelulosas.

La relación C/N lograda (19.5-20.8) en el producto de la condensación se considera interesante en términos de materia orgánica, de manera que el producto puede ser aprovechado como fertilizante en la nutrición de las plantas.

Estudios de espectroscopia de RMN- ^{13}C y ^{15}N mostraron que la condensación con urea marcada (^{15}N) del olote tratado hidrotérmicamente generó diferentes formas de nitrógeno orgánico (amidas, carbamatos y aminas). Tanto el contenido de nitrógeno total como las diferentes especies de nitrógeno que contiene el producto condensado, sugieren que estos materiales podrían ser usados como fertilizantes nitrogenados de acción prolongada.

De esta manera, el olote nitrogenado no solo funcionaría como fertilizante de liberación lenta de nitrógeno, sino que podrían proporcionar materia orgánica, lo que contribuiría a mejorar aspectos físicos, químicos y biológicos del suelo.

IX. LITERATURA CITADA

- AOAC 954.04. (1984). Metodos y Analisis Oficiales de Nitrógeno Total. *Métodos y Análisis Oficiales de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos*, 13 th Edition.
- ANDREWS, D.H. Y SINGH R.P. (1979). Peroxide bleaching. In the bleaching of pulps (R.P. Singh Ed.), Third Edition, Tappi Press, Atlanta, Georgia: 211-253.
- BAUCHER, M., MONTIES, B., VAN MONTAGU, M. & BOERJAN, W. (1998). Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit. Rev. Plant Sci. Total Environ*, 17, 125-197.
- BHARGAVA, S., TARDIO, J., PRASAD, J., FÖGER, K., AKOLEKAR, D. & GROCOTT, S. (2006). Wet oxidation and catalytic wet oxidation Reviews. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 45, 1221-1258.
- BJÖRKMAN, A. (1956). Studies on finely divided wood. Part I. Extraction of lignin with neutral solvents. *Svensk. Papperstidn*, 13, 477- 485.
- BOBLETER, O., (1986). Hydrolysis of Cellulose in Dilute Sulfuric Acid and Under Hydrothermal Conditions., *Journal of Carbohydrate, Chemistry*, Vol. 5, pp. 387-399.
- BURANOV, A. U. & MAZZA, G. (2008). Lignin in straw of herbaceous crops. *Ind. crop. prod.*, 28, 237–259.
- CAPARRO'S, S., G. GARROTE, J. ARIZA AND F. LOPEZ. (2006). Autohydrolysis of *Arundo donax* L., a Kinetic Assessment. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 45, 8909-8920.
- CASEY, J. (1990). Pulpa y papel: química y tecnología química, volumen 1. Limusa, México D.F.
- CASTRO, V. A., RODRÍGUEZ, V. L. & DÍAZ, V. J. (2007). Conversión hidrotérmica subcrítica de residuos orgánicos y biomasa. Mecanismos de reacción. *Redalyc*, (27), 41-50.
- CHEN H., LIU L., YANG X., LI Z. (2005). New process of maize stalks amination treatment by steam explosion. *Biomass and Bioenergy* Beijing 100080, PR China (28) 411–417.
- CIMMYT. (1995). Manejo de los ensayos e informes de los datos para el Programa de Ensayos Internacionales de Maíz, México DF, ISBN: 970-648-045-5, 20 p.

- CLARK, T. A. & MACKIE, K. L. (1987). Steam explosion of the soft-wood *Pinus radiata* with sulphur dioxide addition. I. Process optimization. *J. Wood Chem. Technol*, 7, 373–403.
- COCA, J., ALVAREZ, R. & FUERTES, B. (1984). Production of a nitrogenous humic fertilizer by the oxidation–ammoniation of lignite. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev*, 23, 620- 624.
- COCA, J. (1985). Oxi – ammoniation of Pine – Bark Particles. *The Can. J. of Chem. Eng.*, 63, 1028.
- CÓRDOBA, A., DELGADO, F. & TORIZ, G. (2010). Generación de compuestos orgánicos en el olote, mediante la oxidación en húmedo. *Investigación, Biodiversidad y Desarrollo*, 29, 186 -200.
- COSTA, F., García C., Hernández T. & Polo A. (1991). Residuos orgánicos urbanos, manejo y utilización. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. *Centro de Edafología y Biología Aplicada de Segura*. Murcia - España, 181 p.
- DARVILL, J. E., MICHAEL MCNEIL, ALAN G. DARVILL, AND PETER ALBERSHEIM (1980). Structure of plant cell walls. XI. Glucuronoarabinoxylan, a second hemicellulose in the primary cell walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol*. 66:1135-1139.
- DIEN, B. S., COTTA, M. A. & JEFFRIES, T. W. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol. Biot.*, 63, 258-266.
- DUFF, S. J. B. & MURRAY, W. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol. *Bioresource. Technol.*, 55, 1–33.
- EBRINGEROVA, A. & HROMADKOVA, Z. (1999). Xylans of industrial and biomedical importance. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 16, 325–346.
- EBRINGEROVA AND HIENZE. (2000). Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties. 1. Naturally occurring xylans, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Commun*. 21: 542-556.
- FAIX, O. 1992. Characterization in the Solid State, Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: LIN, S. & DENCE, C. (eds.) *Methods in Lignin Chemistry*. Berlin: Springer-Verlag.
- FAOSTAT. (2012). Producción mundial de maíz. Available:<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.

- FENGEL, D. & LUDWIG, M. (1991). Möglichkeiten und Grenzen der FTIR-Spektroskopie bei der Charakterisierung von Cellulose Teil 1. Vergleich von verschiedenen Cellulose-fasern und Bakterien-Cellulose. *Das Papier*, 45, 45-51.
- FLAIG, W. (1972). Verwertung eines Abfallproduktes der Zellstoffindustrie als Düngemittel – Eing Beitrag zur umweltfreundlichen Technik. *Landb – Forsh. Völkenrode*, 86 -93.
- FLAIG, W. & SÖCHTIG, H. (1973). Wirkung organischer Boden substanzen und Ertragssicherung *Landb – Forsh. Völkenrode*, 23, 19-28.
- GARCIA, R. B., GANTER, J. & CARVALHO, R. R. (2000). Solution properties of D-xylans from corn cobs. *Eur. Polym. J.*, 36, 783–787.
- GARCÍA C. (2003). Tratamiento de impregnación con álcali y perióxido de hidrógeno para reducir el consumo energético en la producción de pastas mecánicas: modificaciones estructurales de la molécula de lignina. Memoria para optar al grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid – España. 174 -176
- GARCIA C. M., BRIZARD A., RINCÓN A., NIEVES R. S. (2004). Estudio cinético de la descomposición del peróxido de hidrógeno en condiciones de extrema alcalinidad. *Revista de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Separata vol. II*. Madrid – España.
- GARROTE, G., FALQUÉ, E., DOMÍNGUEZ, H. & PARAJÓ, J. C. (2007). Autohydrolysis of agricultural residues: study of reaction byproducts. *Bioresorce. Technol*, 98, 1951–1957.
- GIERER, J. (1985). Chemistry of the delignification. Part I: General concept and reactions during pulping. *Wood Sci. Technol.* 19: 289-312
- GONZÁLEZ, G. (2003). Estudio cinético de la hidrotermólisis de compuesto modelos de lignina en gua sub y supercrítica. Tesis doctoral de la Universidad de Rovira y Virgili. Tarragona, España. Pp 1- 202.
- GONZÁLEZ, G., SALVADÓ, J., MONTANÉ, D. (2004). Reactions of vanillic acid in sub- and supercritical water., *Journal Of Supercritical Fluids*, Vol. 31, pp.57.66.
- GRAY, K. S., ZHAO, L. & EMPTAGE, M. (2006). Bioethanol. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10, 141-146.
- HEITNER, C., DIMMEL, D. & SCHMIDT, J. A. (1941). *Lignin and lignans: advances in chemistry*, New York, Taylor and Francis Group.

- HERGERT, H. (1971). Infrared Spectra. *In*: SARKANEN, K. & LUDWIG, C. (eds.) Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions. New York: Wiley-Interscience.
- INGRAM, L. O., GOMEZ, P. F., LAI, X., MONIRUZZAMAN, M., WOOD, B. E., YOMANO, L. P. & YORK, S. W. (1998). Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.*, 58, 204-214.
- KAMM, B.; KAMM, M. (2004). "Biorefinery-Systems". *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 18, 1-6.
- KARUCÁKOVA, M., EBRINGEROVA, A., HIRSCH, J. & HRMADKOVA, Z. (1994). Infrared study of arabinoxylans. *J. Sci. Food Agric.*, 66, 423-427.
- KATRITZKY, A., ALLIN, S. AND SISKIN, M. (1996). Aquathermolysis: Reactions of Organic Compounds with Superheated Water., *Accounts Chemical Research*, Vol. 29, pp. 399-406
- KILZER, F. J. & BROIDO, A. (1965). Speculations on the nature of cellulose pyrolysis. *Pyrodynamics*, 2, 151-163.
- KRUSE, A., A. GAWLIK. (2003). Biomass Conversion in Water at 330-410 °C and 30-50 MPa. Identification of Key Compounds for Indicating Different Chemical Reaction Pathways. *Eng. Chem. Res.* 42: 267-279.
- KNOB, A. & CANO-CARMONA, E. (2010). Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: A novel acidophilic xylanase. *Appl Biochem Biotechnol*, 162, 429-443.
- KUMAR, S. & NEGI, Y. S. (2012). Corn cob xylan-based nanoparticles: Ester Prodrug of 5-Aminosalicylic Acid for Possible Targeted Delivery of Drug. *J. Pharm. Sci. & Res*, 4, 1995 - 2003.
- KUHLMANN, B., ARNETT, E. AND SISKIN, M. (1994). Classical Organic Reactions in Pure Superheated Water., *Journal of Organic Chemistry*, Vol. 59, pp. 3098-3101.
- LAPIERRE, C., POLLET, B. & ROLANDO, C. (1995). New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Res. Chem. Intermed.*, 21, 397-412.
- LAPIERRE, C., POLLET, B., RALET, M. C. & SAULNIER, L. (2001). The phenolic fraction of maize bran: evidence for lignin-heteroxylan association. *Phytochem.*, 57, 765-772.
- MARTÍNEZ, G., ZÚÑIGA, V., DELGADO, E., CAMACHO, A., GONZÁLEZ, V. & ALLAN, G. (1992). Producción de fertilizantes nitrogenados mediante oxi-

- amoniación en corteza de pino en lecho fluidizado. *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)*, 8, 21-26.
- MEIER, D., ZÚÑIGA, V., RAMÍREZ, F., HAHN, N. & FAIX, O. (1994). Conversion of technical lignins into slow-release nitrogenous fertilizers by ammoxidation in liquid phase. *Bioresource Technol.*, 49, 121-128.
- MILETZKY, F. & SCHIENE, R. (1985). Über die oxidative Ammonolyse von sulfitablauge- Untersuchungen zur kinetic. *Zellst. Papier*, 34, 186 -8.
- MIYAZAWA, T., OHTSU, S. & FUNAZUKURI, T. (2008). Hydrothermal degradation of polysaccharides in a semi-batch reactor: product distribution as a function of severity parameter. *J. Mater. Sci.*, 43, 2447-2451.
- MOK, W. AND ANTAL, M. (1992). Uncatalyzed Solvolysis of Whole Biomass Hemicellulose by Hot Compressed Liquid Water., *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 31, 1157-1161
- MONTEIL-RIVERA, F., PHUONG, M., YE, M., HALASZ, A. & HAWARI, J. (2013). Isolation and characterization of herbaceous lignins for applications in biomaterials. *Ind. Crop. Prod.*, 41, 356– 364.
- NESSLER METHOD. (2005). Nitrogen, Total Kjeldahl. Hach Company. 1-6.
- OLIVEIRA, E. E., SILVA, A. E., NAGASHIMA, T. J., SALGADO, G. M. C., AGUIAR, L. M., RODRIGUES, M. H., BATISTA, A. I., BAYER, M. P., RICARDO, M. P. S. N., GOMES, O. A. & TABOSA, E. E. S. (2010). Xylan from corn cobs, a promising polymer for drug delivery: Production and characterization. *Bioresource Technolo.*, 101, 5402–5406.
- O'NEILL AND YORK. (2003). The composition and structure of plant primary walls. In *The Plant Cell Wall* (JKC Rose ed), Blackwell, pp. 1-54.
- PALM M. Y G. ZACCHI. (2003). Extraction of Hemicellulosic Oligosaccharides from Spruce Using Microwave Oven or Steam Treatment. *Biomacromolecules*, 4, 617-623.
- PURI VP, MAMERS H. (1983). Explosive pretreatment of lignocellulosic residues with high pressure carbon dioxide for the production of fermentation substrates. *Biotech Bioeng.*; 25: 3149–3161.
- RADLEIN, A. G., PISKORZ, J. K. & MAJERSKI, P. A. (1997). Method of producing slow release nitrogenous organic fertilizer from biomass. Ontario, Canada *patent application* No. 5,676.727.

- RIERA F.A., ALVAREZ R. COCA J. (1991). Humic fertilizers by oxiammoniation of hydrolyzed olive pit residues. *Fertilizer Research* 28: 341-348.
- RINGPFEIL M. (2001) Biobased Industrial Products and Biorefinery Systems Industrielle Zukunft des 21 Jahrhunderts, www.biopract.de.
- RIVAS, B., MOLDES, A. B., DOMÍNGUEZ, J. M. & PARAJÓ, J. C. (2004). Lactic acid production from corn cobs by simultaneous saccharification and fermentation: a mathematical interpretation. *Enzyme Microb. Technol.*, 34, 627–634.
- RODRÍGUEZ A., PÉREZ A., DE LA TORRE M., RAMOS E Y JIMÉNEZ L. (2008). Neural fuzzy model applied to ethylene-glycol pulping of non-wood raw materials. *Bioresource Technology* 99, 985-974.
- ROWELL, R. M., HAN, J. S. & ROWELL, J. S. (2000). Characterization and factors affecting fiber properties. In E. Frollini, A.L. Leão and L.H.C. Mattoso (2000). *Natural Polymers and agro-fibers composites preparation, properties and application*, San Carlos Brazil, ISBN: 85-86463-06-X, 292 p.
- SAMANTA, A. K., SENANIA, S., KOLTE, A. P., SRIDHARA, M., SAMPATHA, K. T., JAYAPALA, N. & DEVIA, A. (2012). Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs. *Food Bioprod. Process.*, 90, 466–474.
- SARKANEN, K.; LUDWING, C. (1971). Lignins: occurrence, formation, structure and reactions. New York: Wiley. ISBN 0-471-75422-6.
- SASAKI, M., FURUKAWA, M., MINAMI, K., ADSCHIRI, T. AND ARAI, K. (2002). Kinetics and Mechanism of Cellobiose Hydrolysis and Retro-Aldol condensation in Subcritical and Supercritical Water., *Industrial and Engineering. Chemistry Research*, Vol. 41, pp. 6642-6649.
- SÁNCHEZ, C., EGÜÉS, I., GARCÍA, A., LLANO-PONTE, R. & J., L. (2012). Lactic acid production by alkaline hydrothermal treatment of corn cobs. *Chem. Eng. J.*, 181-182, 655-660.
- SAVAGE, P. (1999). Organic Chemical Reactions in Supercritical Water. *Chemical Reviews* (99): 603 -621.
- SISKIN, M. AND A. KATRITZKY. (2000). A review of the reactivity of organic compounds with oxygen-containing functionality in superheated water. *J. Analytic. and Appl Pyroly.* (54): 193-492.

- SILVA, S. S., CARVALHO, R. R., FONSECA, J. L. C. & GARCIA, R. B. (1998). Extração e caracterização de xilanas de sabugo de milho. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 2, 1-9.
- SIMÓN, O., SINGH, B. K. & WEIL, M. J. (2005). Elaboración y caracterización de lignosulfonatos amonificados a partir de pinzote de banano y aserrín de laurel (*Cordia alliodora*) para utilizarse como fertilizante de liberación lenta. *EARTH-Tierra Tropical*, 1, 21-26.
- SELVENDRAN AND O'NEILL (1985). Isolation and analysis of cell walls from plant material. In *Methods of Biochemical Analysis*, Vol 32 (D Glick ed), John Wiley & Sons, pp. 25-123.
- SUN, X.-F., SUN, R.-C., LU, Q., XU, F. & LIN, L. (2002). Fractional Isolation and Physico-Chemical Characterization of Hemicelluloses by a Two-Stage Treatment from *Haloxylon ammodendron* and *Elaeagnus angustifolia*. *J. Agric. Food Chem*, 50, 6400-6407.
- STEIN, S. (1985). Free radicals in coal conversion., *Chemistry of coal conversion*, editado por Richard H. Schlosberg, Plenum Press, Nueva York, Estados Unidos de América.
- TAPPI 9M (1954). Celulosa Cross y Bevan. *Technical Association of the Pulp and Paper Industry*, 54, 1.
- TAPPI 204 CM. (1997). Solvent extractives of wood and pulp. *Tech. Assoc. Pap.*
- TAPPI 207 CM. (1999). Water solubility of wood and pulp. *Tech. Assoc. Pap.*
- TAPPI 211. (1993). Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525°C. . *Tech. Assoc. Pap.*, 1-4.
- TAPPI 222. (1998). Acid-insoluble lignin in wood and pulp. *Tech. Assoc. Pap.*, 1-2.
- TAPPI 223 CM. (1984). Pentosanos en madera. *Tech. Assoc. Pap.*, 1-6.
- TAPPI 237 OM (1993). Carboxyl content of pulp. *Tech. Assoc. Pap.*, 1-3.
- TAPPI 264 CM. (1997). Preparation of wood for chemical analysis. *Tech. Assoc. Pap.*, 1-3.
- THOMPSON, N. S. (1995). Hemicellulose. In: KIRK-OTHMER (ed.) *Encycl. Chem. Technol.* New York: John Wiley & Sons.
- TIMELL, T. E. (1961). Isolation of galactoglucomannans from the wood of gymnosperms. *Tech. Assoc. Pap.*, 44, 88 - 96.

- VARADARAJAN, S. MILLER, D.J. (1999). Catalytic upgrading of fermentation-derived organic acids, *Biotechnol. Prog.* 15 (5), 845-854.
- WHISTLER, R. L. & SMART, C. L. (1953). *Polysaccharide Chemistry*, New York.
- WISE, L., MARPHY, M. A. & ADIECO, D. (1946). Chlorite Holocellulose, its Fractionation and Beating on Summative Wood Analysis and on Studies on the Hemicelluloses. *Paper Trade J.* , 122, 2 - 35.
- XIANG, Q. AND Y. LEE. (2000). Oxidative Cracking of Precipitated Hardwood Lignin by Hydrogen Peroxide. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 84-86 (1-9): 153 -162.
- XIANG, Q. AND Y. LEE. (2001). Production of oxychemicals from precipitated hardwood lignin. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 91- 93 (1-9): 71 -80.
- YANG R., ZHANG C., FENG H., YANG W. (2006). A kinetic study of xylan solubility and degradation during corncob steaming. *Biosystems Engineering* (93) 4, 375 – 382.

CARACTERIZACIÓN Y VALORACIÓN QUÍMICA DEL OLOTE: DEGRADACIÓN HIDROTÉRMICA BAJO CONDICIONES SUBCRÍTICAS

JHON ALEXANDER CÓRDOBA^{ac}, EDUARDO SALCEDO^b, RAMÓN RODRÍGUEZ^a, JUAN FRANCISCO ZAMORA^a,
RICARDO MANRÍQUEZ^b, HÉCTOR CONTRERAS^b, JORGE ROBLEDO^b, EZEQUIEL DELGADO^{*b}

(Recibido Abril 2013; Aceptado Octubre 2013)

ABSTRACT

Corn cob was characterized chemically and hydrothermally treated under subcritical conditions to modify their recalcitrance and render a solid fraction of cellulose and lignin and a soluble fraction rich in xylose. The chemical characterization of carbohydrates was carried out by HPLC, while lignin and xylan were characterized by means of FTIR-ATR and ¹³C-NMR. The hydrothermal treatment was performed in bullet-type reactors heated in a muffle furnace at 160, 230 and 300°C at times of 30, 45 and 60 min, with hydromodules of 1.7, 2.0 and 2.5 w/v. The yield was determined from the insoluble fraction of the corn cob and the concentration of carboxylic groups was measured in the soluble fraction. The results indicated that corn cob contained 45% of cellulose, 15.8% lignin (p-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl units) and 33.6% hemicelluloses. Temperature and time of reaction showed significant effects on yield and generation of carboxylic groups. It was possible to convert up to 43% of the corn cob to hemicelluloses and lignin compounds soluble in aqueous medium, under hydrothermal treatment at subcritical conditions, while increasing the concentration of carboxylic groups in the soluble fraction to 29.3 meq/100 g of corn cob. *www.relaquim.com.mx*

Key words: Biomass, recalcitrance, carboxylic groups, hemicellulose, cellulose and lignin.

RESUMEN

Se caracterizó químicamente el olote y se trató hidrotérmicamente bajo condiciones subcríticas para modificar su forma recalcitrante y obtener una fracción sólida compuesta principalmente de celulosa y lignina, además de una fracción soluble rica en xilosa. La caracterización química de los carbohidratos se realizó mediante HPLC, así como con FTIR-ATR y RMN-¹³C, para lignina estructural y la xilana

^aDepartamento de Botánica, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, ^bDepartamento de Madera, Celulosa y Papel, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería, Universidad de Guadalajara-México, ^cPrograma de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Tecnológica del Chocó "Diego Luis Córdoba" *ezedelfor@gmail.com, Tel: 044 (33)14312649.

respectivamente. La degradación hidrotérmica, se llevó a cabo en reactores tipo bala calentados en una mufla a 160, 230 y 300°C, tiempos de 30, 45 y 60 min, con hidromódulos de 1.7, 2.0 y 2.5 w/v. Se determinó el rendimiento de la fracción insoluble del olote y la concentración de grupos carboxílicos en la fracción soluble. El estudio indicó que el olote contiene celulosa 45%, lignina 15.8% (p-hidroxifenilo, guayacilo y siringilo) y hemicelulosas 33.6%. Los factores que tuvieron efectos significativos sobre el rendimiento y la generación de grupos carboxílicos fueron la temperatura y el tiempo de reacción. Se evidenció el carácter recalcitrante del olote, pero fue posible reducir hasta un 43% del mismo a compuestos de hemicelulosas y lignina solubles en medio acuoso, bajo condiciones subcríticas, incrementando la concentración de grupos carboxílicos en la fracción soluble hasta 29.3 meq/100 g de olote. *www.relaquim.com.mx*

Palabras clave: Biomasa, recalcitrancia, grupos carboxílicos, hemicelulosas, celulosa, lignina

INTRODUCCIÓN

El olote del maíz (*Zea mays*) se encuentra entre las fuentes de recursos no maderables con un alto contenido de xilanas, por lo que ha sido considerado de interés como fuente alternativa de diferentes compuestos químicos de interés comercial o industrial, entre otras fuentes de biomasa (Córdoba *et al*, 2010, Samanta *et al*, 2012, Oliveira *et al*, 2010). El olote es un residuo o subproducto agrícola que se genera en grandes cantidades en el proceso de separación del grano de la mazorca y se estima que por cada tonelada de maíz se obtienen 170 kg de olote (CIMMYT, 1995).

Es importante señalar que el término *residuo* hace alusión a aquellas materias originadas en las actividades de producción y consumo que no han alcanzado, en el contexto en que se producen, ningún valor económico; ello puede deberse tanto a la falta de tecnología adecuada para su transformación y aprovechamiento, así como a la existencia de un limitado mercado para los productos recuperados (Costa *et al*, 1991). De datos recientes sobre la producción mundial de maíz en el 2010 (844 millones de toneladas) puede estimarse que se generan alrededor de 144 millones de toneladas de olote por año (FAOSTAT, 2012).

En este sentido, el uso o aplicación química del olote ha estado muy restringido debido a la dificultad que existe para acceder a sus componentes (carácter recalcitrante) e incompleta caracterización química, así como la valoración de sus principales productos (lignina, celulosa y hemicelulosas). Estos aspectos han limitado su utilización y conducido a la quema del olote como recurso o al esparcimiento de sus residuos a la intemperie, generando un problema de contaminación ambiental. Entre los usos del olote que han sido reportados en la literatura se encuentran la aplicación como forraje para rumiantes, soporte para disminuir la erosión en la tierra y también como sustratos para la producción de la enzima xilanas (Knob and Cano-Carmona, 2010). Sin embargo, hay pocos reportes en la literatura sobre su potencial para la obtención de compuestos orgánicos (Córdoba *et al*, 2010, Radlein *et al*, 1997) u otros productos de uso industrial (Ingram *et al*, 1998, Dien *et al*, 2003, Gray *et al*, 2006).

Por otro lado, el alto contenido de hemicelulosas (34%) del olote, del cual aproximadamente el 94% corresponde a xilanas, hacen muy atractivo este residuo para el desarrollo de fertilizantes nitrogenados con acción prolongada o de lenta

liberación (Caro and Frank, 1929, Radlein *et al*, 1997, Coca *et al*, 1984, Martínez *et al*, 1992, Simón *et al*, 2005, Castro *et al*, 2006, González *et al*, 2006, Mora-Ravelo *et al*, 2007, Kabel *et al*, 2007).

Tradicionalmente para la conversión de los materiales lignocelulósicos y la obtención de productos químicos de valor agregado, se ha recurrido a métodos químicos (hidrólisis con ácidos minerales) y/o enzimáticos (Duff and Murray, 1996), explosión con vapor (Clark and Mackie, 1987), tratamientos con ozono, peróxido-alcalino y la oxidación húmeda (Córdoba *et al*, 2010). Sin embargo, los métodos anteriores de conversión presentan algunos inconvenientes y son costosos en materia de reactivos y consumo de energía, teniendo en cuenta que frecuentemente incluyen etapas de neutralización y separación (en los casos donde se utilizan catalizadores) y/o problemas de corrosión, entre otros.

Por tanto, en esta investigación se propone tratar el olote hidrotérmicamente (solo con agua como reactivo) bajo condiciones subcríticas, esto es, a temperaturas menores a 300 °C y presiones menores a 100 atmósferas (Castro *et al*, 2007, Miyazawa *et al*, 2008, Sánchez *et al*, 2012), como un proceso de conversión alternativo para degradar la forma recalcitrante del olote e identificar los productos químicos con potencial valor agregado (lignina, celulosa, xilana y compuestos orgánicos) (Buranov and Mazza, 2008, Sánchez *et al*, 2012, Samanta *et al*, 2012). Las investigaciones sobre este tipo de tratamiento para el olote llevan como objetivo preparar el olote (entre otras fuentes de biomasa de interés) para utilizarlo en una etapa subsecuente de condensación con fuentes de nitrógeno NH_4OH y/o H_2NCONH_2 (40% y 46% en peso respectivamente), como principio para la formulación de diferentes productos químicos nitrogenados de aplicación en procesos de fertilización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Clasificación por tamaño de partículas.

El olote fue molido y tamizado en un clasificador de astillas Modelo Helsinki Sf-00561, marca Lorenszen & Wettre AB.

Caracterización química del olote. La composición química se determinó siguiendo las siguientes normas de la Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI): Cenizas (Tappi 211, 1993), extraíbles (Tappi 204 cm, 1997, Tappi 207 cm, 1999) lignina klason (Tappi 222, 1998) y lignina estructural (Björkman, 1956), holocelulosa (Wise *et al*, 1946), hemicelulosas (Timell, 1961) y α -Celulosa (Tappi 9m, 1954). El contenido de nitrógeno total se determinó mediante técnicas de la AOAC (AOAC 954.04, 1984) y la concentración de grupos carboxílicos (Tappi 237 om, 1993) se llevó a cabo en un equipo detector de carga polielectrolítica PCD-03 Mütek, con algunas modificaciones.

El contenido de carbohidratos, se analizó a partir de hidrolizados de holocelulosa mediante un equipo de cromatografía HPLC, con una columna Aminex HPX-87P, 300 mm \times 7.8 mm, con una presión de 272 psi (19 kg/cm²) a 85°C; la fase móvil fue agua grado HPLC a un flujo de 0.60 mL/min. Se empleó una bomba Waters 6000 y un detector de índice de refracción Modelo 401 (Waters Associated Inc.). El porcentaje de cada carbohidrato se calculó de acuerdo a procedimientos publicados previamente (Córdoba *et al*, 2010). La asignación de las señales se realizó por comparación con estándares de celobiosa, glucosa, xilosa, arabinosa y manosa. También se caracterizaron la xilana, celulosa y grupos funcionales de la lignina estructural del olote mediante RMN-¹³C, FTIR con ATR y SEM.

Aislamiento de xilana de olote a partir de holocelulosa. Se tomaron 83.83 g base seca de holocelulosa y se le añadieron 600 mL de una solución de KOH al 24% (aproximadamente 7.15 mL/g de holocelulosa) y se dejó reaccionar bajo agitación

durante 24 horas. Luego se filtró y se separó en dos partes; una parte soluble (hemicelulosas) y otra parte insoluble (α -Celulosa). La parte soluble se precipitó gota a gota en una solución de etanol y ácido acético (cuatro partes de etanol y 0.4 partes de ácido acético/mL de hidrolizado) y se filtró bajo succión para posteriormente secarla en una estufa de vacío a 60°C.

De las hemicelulosas recuperadas se tomaron 13.04 g base seca y se disolvieron en una solución de 250 mL de KOH al 10% bajo agitación; posteriormente se adicionó gota a gota una solución de 500 mL de BaOH al 5% y se precipitó mediante centrifugación a 4000 rpm. La fracción de xilana se recuperó a partir del sobrenadante, mediante precipitación con 3300 mL de la solución de etanol-ácido acético ya descrita. El precipitado se lavó con etanol, se filtró mediante vacío y finalmente se secó en una estufa de vacío a 60°C.

Análisis de infrarrojo FTIR-ATR. Se realizó con un espectrómetro Perkin-Elmer, modelo Spectrum GX con un aditamento PIKE MIRacle de reflectancia total atenuada horizontal (HATR) de reflexión simple y con cristal de diamante. Se obtuvieron espectros por duplicado en una ventana espectral de 4000 a 550 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 16 barridos.

RMN- ^{13}C de xilana de olote. Xilana (20 mg) se colocó en un tubo de RMN y se disolvió en 0.75 mL de DMSO- d_6 . El espectro de RMN- ^{13}C se obtuvo en un espectrómetro de RMN de 200 MHz Varian Gemini 2000 de banda ancha, con una frecuencia de análisis para el ^{13}C de 50.29 MHz.

Morfología y análisis de tamaño de partícula de celulosa y xilana de olote mediante SEM. La celulosa y xilana se analizaron mediante SEM, en un microscopio Tabletop TM-1000 (Hitachi High-Technologies Inc., Japón) para determinar la longitud de la fibra y el tamaño de partícula.

Tratamiento hidrotérmico del olote. Muestras de olote integral (0.5 g) se mezclaron con agua destilada grado HPLC (hi-

dromódulo variable ajustado a 2.5%, 2.0% y 1.7% (w/v) con respecto al peso del olote) y se colocaron en reactores de acero inoxidable con capacidad máxima de 35 mL, en una Mufla marca TE-M12D. La temperatura se varió en el intervalo de 160 a 300°C (160, 230 y 300°C) con tiempos de 30 a 60 min (30, 45 y 60 min) (Kilzer and Broido, 1965, Clark and Mackie, 1987, Flaig and Söchtig, 1973, Flaig, 1972, Miletzky and Schiene, 1985, Meier *et al*, 1994). La presión alcanzada fue calculada bajo estas condiciones (1.2, 3.7 y 84.8 atm respectivamente), las cuales están por debajo del punto crítico del agua (punto crítico 374 °C y 218 atm). Posteriormente el producto de la reacción se filtró y se secó en un horno a 45°C hasta peso constante para determinar el rendimiento de los sólidos insolubles.

Se planteó un diseño factorial multinivel 3^k ($3^3 = 3 \times 3 \times 3$) con 2 repeticiones para el primer tratamiento y un 3^k ($3^2 = 3 \times 3$) para el segundo tratamiento hidrotérmico y la generación de grupos carboxílicos solo se consideraron la temperatura y el tiempo, ya que estos fueron los que tuvieron mayor influencia en la primera parte del experimento. Para analizar las variables estudiadas se empleó el programa Statgraphics® plus 5.1.

Tratamiento hidrotérmico para la generación y cuantificación de grupos carboxílicos. Se trataron muestras de 0.5 g de olote integral, a 160, 230 y 300°C, tiempos de 30, 45 y 60 min con 25 mL de agua grado HPLC. Luego se filtró con membranas de 0.45 μm . Posteriormente, se tomaron muestras de 5 mL, diluidas con 5 mL de agua grado HPLC y colocadas en la celda de medición del Müttek. La concentración aniónica se calculó utilizando un polielectrólito catiónico Poly-DADMAC (Cloruro de polidialildimetil amonio) en la neutralización, a una concentración de 0.001 mol/L y flujo potencial de 0 mV.

$$C_f = \frac{V_{FP}C}{v} \times 1000$$

Donde; C_f es la concentración de carga (meq / 100 g), v es el volumen de la muestra que se titula (mL), y VFP y C son el volumen de solución (mL) y su concentración (N), respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química del olote. A la fracción de olote retenida en la malla de 250 μm (figura 1), se le determinó la composición química, donde se muestran los componentes más importantes (Cuadro 1), entre los cuales están la celulosa, hemicelulosas y lignina. La suma de holocelulosa (H_{ol}), lignina total (L_t), extractivos (E_x) y cenizas (C_z) hacen aproximadamente el 100% del olote integral. El contenido de cenizas y extraíbles totales arrojaron valores que coinciden con los reportados en la literatura (Rowell *et al*, 2000, Yang *et al*, 2006, Rodríguez *et al*, 2008, Córdoba *et al*, 2010, Tappi 204 cm, 1997, Tappi 207 cm, 1999).

$$Ex(4) + L_t(15.8) + H_{ol}(78.67) + C_z(2) = 100.4\%$$

En cuanto al contenido de celulosa, la discrepancia comparada con lo reportado por otros autores, obedece probablemente a la retención de trazas de lignina y hemicelulosas, ya que no se practicó una

corrección al respecto. La composición de azúcares en el producto de la hidrólisis ácida de holocelulosa analizado mediante HPLC arrojó contenidos de glucosa (41%), xilosa (35%) y en menor proporción arabinosa. Es de destacar que en este análisis apareció celobiosa (5%), lo cual indica que la hidrólisis no fue completa. Estos resultados confirman que el olote es un material lignocelulósico con un alto contenido de hemicelulosas, particularmente xilosa (Córdoba *et al*, 2010, Rowell *et al*, 2000, Yang *et al*, 2006, Samanta *et al*, 2012, Oliveira *et al*, 2010).

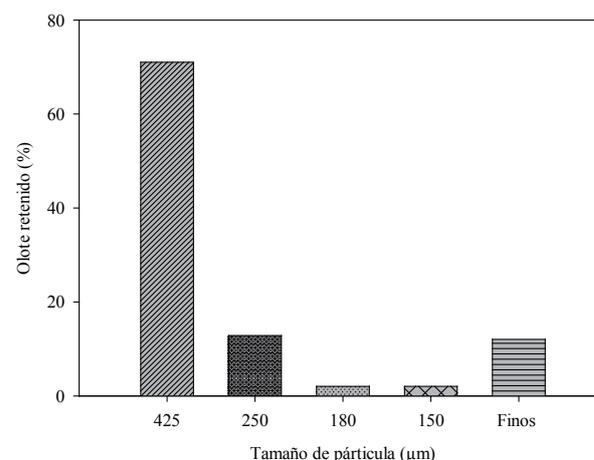


Figura 1. Distribución del tamaño de partícula de olote molido en molino de martillos.

Cuadro 1. Comparación de la composición química del olote (%) del presente estudio con datos reportados por otros autores.

Componentes (%)	Olote*	Referencias		
		(Garrote <i>et al</i> , 2007a)	(Rivas <i>et al</i> , 2004)	(Thompson, 1995)
Hemicelulosas	33.6	31.1	39.0	33.7 - 41.2
Celulosa	45 ⁺ 50 ⁺⁺	34.3	34.3	30.0 - 41.7
Lignina Klason	15.8	18.8	14.4	4.5 - 15.9
Cenizas	2.0	No reporta	No reporta	No reporta

*= presente investigación; +(Determinado según Timell, 1961); ++(Determinado según Tappi 9m, 1954)

Es importante resaltar, que partiendo de un contenido de 78.7% de holocelulosa del olote (método de Wise *et al*, 1946) y las concentraciones de glucosa (glucosa más dos unidades de glucosa por la presencia de celobiosa) y xilosa, obtenidas bajo el análisis de HPLC, el cálculo del contenido de celulosa y hemicelulosas en olote base seca arroja valores de 40.2% y 28% respectivamente. Estos valores son notoriamente menores a los contenidos de celulosa reportados en la Tabla 1 según el método de Timell (Timell, 1961) e hidrólisis alcalina para el caso del contenido de xilana.

Análisis de FTIR-ATR de la xilana, lignina al Dioxano de olote y olote modificado hidrotérmicamente. El espectro de la xilana (figura 3) muestra bandas típicas de azúcares, se muestran las bandas de 3422, 2927, 1421, 1228, 1049, 986 y 897 cm^{-1} , las cuales están asociadas con las señales características de la xilana (Samanta *et al*, 2012, Oliveira *et al*, 2010). La banda en 1161 cm^{-1} junto a la banda fuerte a 1045 cm^{-1} es asignada a las vibraciones de estiramientos C-O, la cual es característica de grupos glicosídicos como el presente en hemicelulosas (Sánchez *et al*, 2012, Sun *et al*, 2002, Oliveira *et al*, 2010).

En el caso de la lignina aislada al dioxano (figura 4), se observan señales atribuibles a los monómeros de la lignina (H, G y S), como es el caso de la vibración del esqueleto aromático a 1603 y 1513 cm^{-1} (Lapierre *et al*, 1995, Baucher *et al*, 1998, Buranov and Mazza, 2008). Además se aprecian bandas a 1425 y 1328 cm^{-1} que corresponden la deformación en el plano del enlace C-H de la parte alifática de la cadena de fenilpropano. Las señales en la región de 1300 a 1000 cm^{-1} corresponden a estiramientos del tipo C-O provenientes de grupos fenólicos y alcóxidos presentes en las H, G y S (figura 4). La banda alrededor de 833 cm^{-1} es típica de los enlaces C-H fuera del plano y se relaciona directamente con los grupos H, G y S (Faix, 1992, Monteil-Rivera *et al*, 2013).

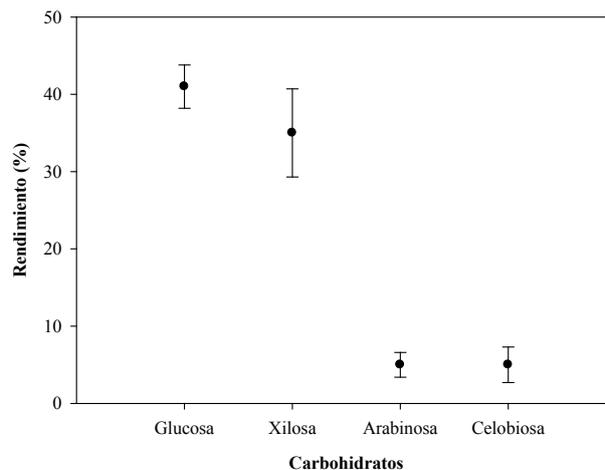


Figura 2. Contenido de azúcares en hidrolizado ácido de holocelulosa analizado mediante HPLC.

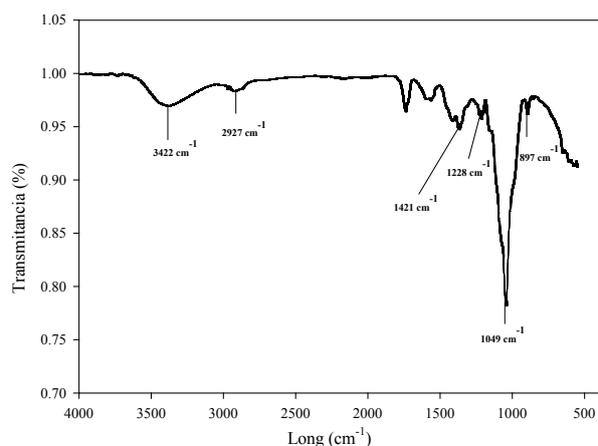


Figura 3. Espectro FTIR-ATR de xilana aislada de olote mediante hidrólisis alcalina.

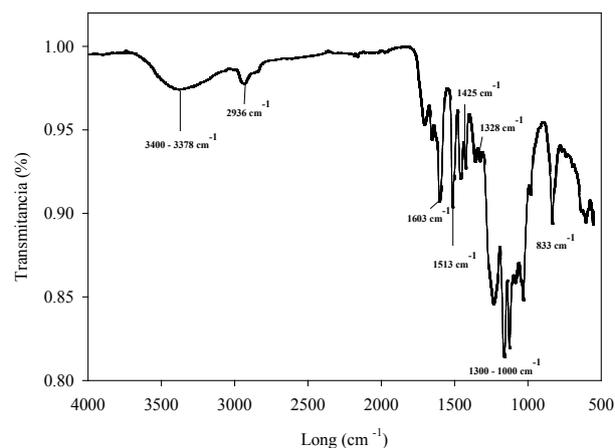


Figura 4. Espectro FTIR-ATR de lignina al dioxano de olote.

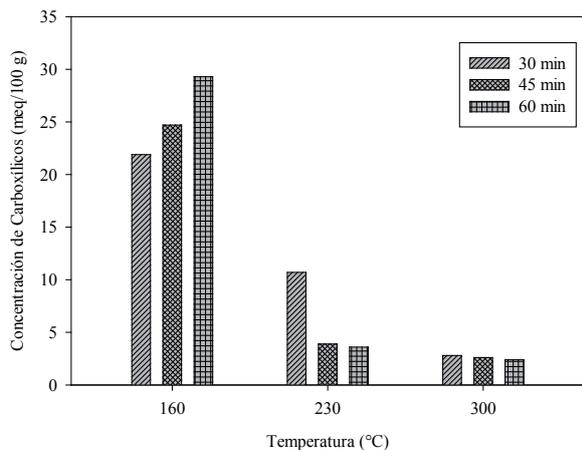


Figura 5. Concentración de grupos carboxílicos en la fracción soluble (meq/100 g) del tratamiento hidrotérmico del olote.

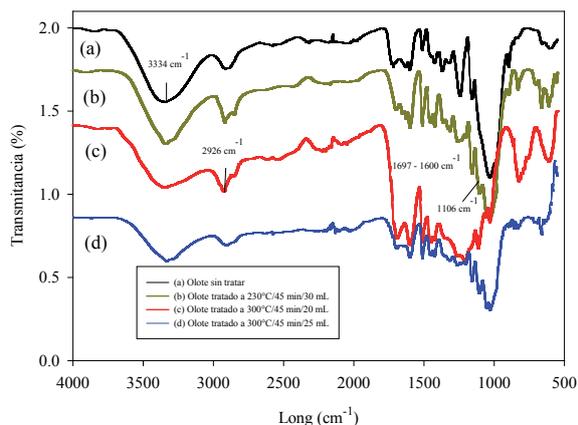


Figura 6. Comparativo de espectros FTIR-ATR de olote: a) sin tratar b) tratado hidrotérmicamente a 230°C/45 min/30 mL de agua, c) 300°C/45 min/20 mL y d) 300°C/45 min/25 mL.

La asignación de las principales bandas en el espectro del olote después del tratamiento hidrotérmico se muestra en el cuadro 2. La comparación de espectros FTIR del olote tratado hidrotérmicamente con respecto al olote sin tratar (figura 6 a-d) muestra que las bandas en 1603 y 1106 cm^{-1} se encuentran mejor definidas después del tratamiento. En principio, estas bandas corresponden a la vibración asimétrica C-O-C del anillo hemiacetal de las unidades monoméricas de los carbohidratos (figura 6 b, c, d).

Se pudo observar en los tratamientos a 300°C, 45 min y 20 mL (figura 6c), un incremento significativo entre las bandas 1452-1697 cm^{-1} (grupos carboxilos), a la vez que se observa una reducción marcada entre las bandas 900-1115 cm^{-1} correspondientes a estiramientos C-O de grupos OH y éteres de azúcares presentes en las muestras. Esta reducción está relacionada con la oxidación de grupos OH a grupos carbonilos (ácidos carboxílicos, aldehídos y cetonas) como resultado del tratamiento térmico.

Se observó también una mayor concentración de grupos carboxílicos cuando se trabajó con temperaturas de 160°C en todos sus tiempos (30, 45 y 60 min); esto era de esperarse teniendo en cuenta que a esta temperatura comienza la degradación de las hemicelulosas, conduciendo a la formación de fragmentos de cadena corta, conteniendo grupos carboxílicos (figura 5).

Cuadro 2. Bandas (cm^{-1}) de FTIR para el olote modificado hidrotérmicamente.

Asignación	Olote modificado (Longitud)	Referencia
O-H estiramientos de los grupos hidroxilos	3300-3640	
C-H estiramientos en CH_2 y CH_3	2936	(Fengel and Ludwig, 1991, Sánchez <i>et al</i> , 2012)
C-O-C vibración asimétrica del anillo hemiacetal de las unidades monoméricas de los carbohidratos	1603 y 1106,	
C-H vibración del esqueleto aromático 3 bandas característica de lignina	1603, 1513 y 1455	(Monteil-Rivera <i>et al</i> , 2013, Faix, 1992, Hergert, 1971, Heitner <i>et al</i> , 1941)
C=O Carbonilos	1510 y 1600	
C=O-R grupos carboxilos	1452 a 1697	

El objetivo del diseño experimental fue lograr la generación de una gran cantidad de estos grupos, para utilizarlos en la fijación de nitrógeno en un etapa subsecuente de condensación (Bhargava *et al*, 2006).

En los trabajos de Radlein (Radlein *et al*, 1997) sobre pirólisis de diversos tipos de biomasa se reportan contenidos de grupos carboxilos entre 6 y 11 moles de grupos carboxilo, carbonilo y grupos fenólicos disponibles para su posterior reacción con una fuente de nitrógeno (amoníaco, urea o compuestos de amonio en general).

RMN-¹³C de la xilana de olote. En el espectro de RMN de la xilana de olote en la figura 8, se observan señales características para hemicelulosas (Kumar and Negi, 2012). Este espectro muestra cinco señales de carbonos y entre estas se puede ver a campo más bajo (δ 101.7 ppm) la señal característica de carbonos acetálicos (C-1) correspondiente a la D-xilopiranosas de unidades de xilana. Las tres señales siguientes en δ 75.4, 74 y 72.6 ppm, corresponden a los carbonos C-2, C-3 y C-4, respectivamente del anillo piranósico, así como la última

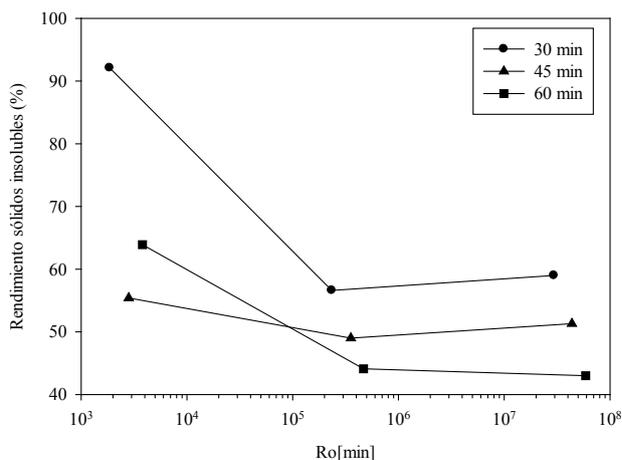


Figura 7. Rendimiento de sólidos insolubles resultante del tratamiento hidrotérmico del olote y su relación con el factor de severidad (Ro).

señal a 63.2 ppm que es atribuida al C-5 de este mismo sistema. Este resultado demuestra claramente que la xilana aislada se logró obtener de forma purificada mediante el proceso de extracción alcalina, mientras que frecuentemente las preparaciones de xilanas pueden presentar otros azúcares en las cadenas laterales (Ebringerova and

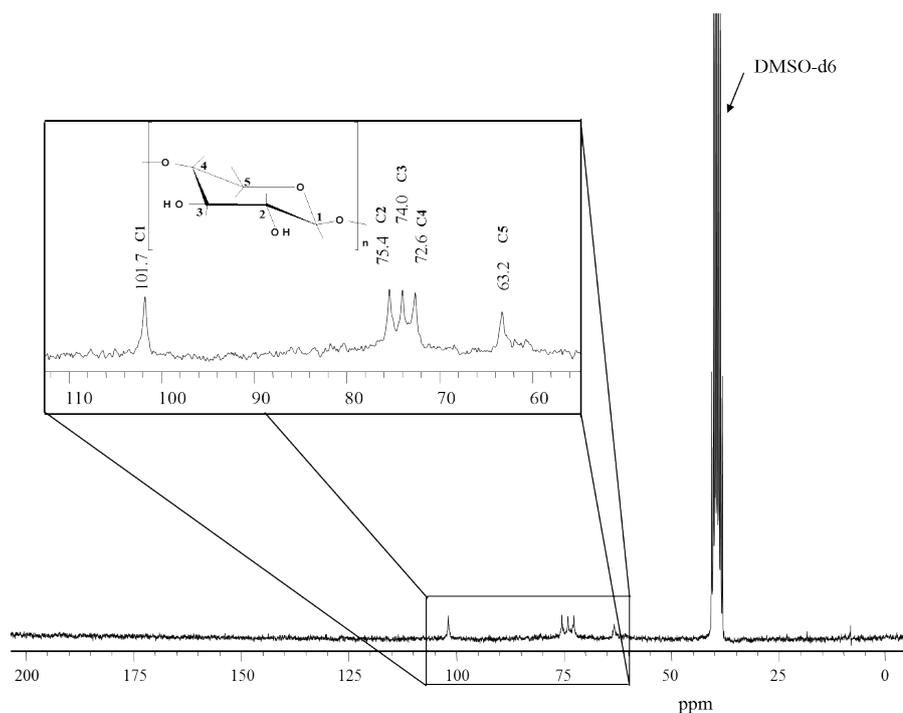


Figura 8. Espectro RMN-¹³C de xilana de olote con ampliación de la zona entre 110 a 55ppm.

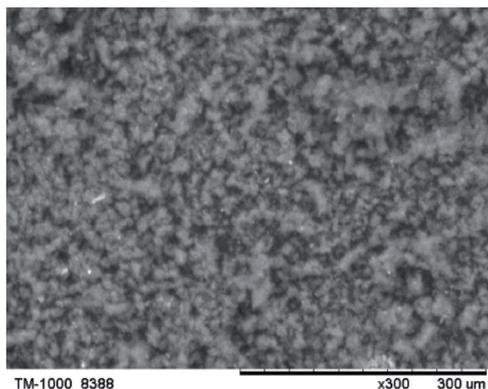


Figura 9. Microfotografía SEM de xilana aislada de olote.

Hromadkova, 1999, Garcia *et al*, 2000, Karučáková *et al*, 1994, Silva *et al*, 1998, Whistler and Smart, 1953). Según estos resultados, la xilana del olote reportada en esta investigación pertenece al tipo arabinoglucuronoxilana con pocas ramificaciones e insoluble en agua (WIS-X) (figura 3 y 8).

Morfología de celulosa y xilana a partir de holocelulosa. En la figura 9, se observan las partículas de xilana en formas agregadas y no agregadas con morfología irregular y algunas de forma esférica.

En el caso de la celulosa (figura 10), se observó una mezcla de fibras agregadas y no agregadas con morfología irregular y se distribuye de manera uniforme por arriba del valor promedio con una distribución

unimodal. El tamaño medio de la longitud de las fibras fue de $102.74 \pm 50.98 \mu\text{m}$, con un diámetro de $11.62 \pm 3.0 \mu\text{m}$. En el caso del diámetro el 17% de la fibra es menor que el promedio con $9.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$. Las características observadas en la morfología y el tamaño de las partículas de celulosa se atribuyen a condiciones específicas del aislamiento empleado (Narayan and Hancock, 2005).

Degradación hidrotérmica del olote.

Los factores que tuvieron efectos significativos en la degradación hidrotérmica fueron la temperatura y el tiempo (nivel de confianza de 95%). El rendimiento de los sólidos insolubles (43%, 44% y 49%) obtenido puede considerarse satisfactorio, ya que fue posible degradar casi el 50% del olote a temperaturas entre 230°C y 300°C en el intervalo de tiempo de 45 a 60 min.

En relación al factor de severidad, los mejores resultados fueron en condiciones superiores a 3.55×10^5 (Ejemplo: combinaciones de 230°C con 60 y 45 min y 300°C con 45 y 60 min con $Ro[\text{min}]$ de 4.68×10^5 min, 3.55×10^5 min, 4.37×10^7 min y 5.89×10^7 min respectivamente (figura 7 y 11). En general se observó que a mayor temperatura, el Ro [min] también se incrementa proporcionalmente. Sin embargo, el olote sigue siendo muy recalcitrante a pesar de haber tenido un tratamiento hidrotérmico

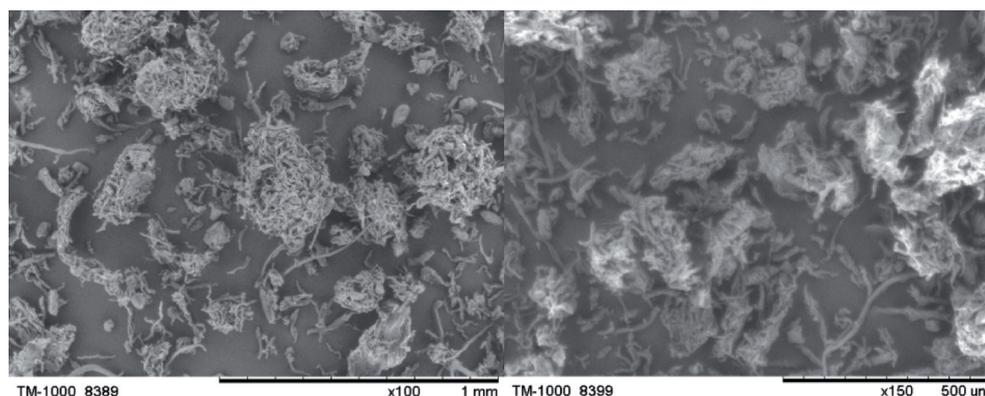


Figura 10. Microfotografía SEM de celulosa aislada de olote.

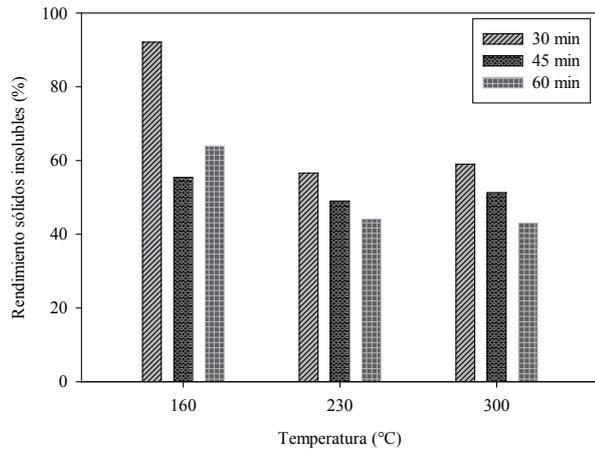


Figura 11. Rendimiento de la fracción insoluble del olote después del tratamiento hidrotérmico.

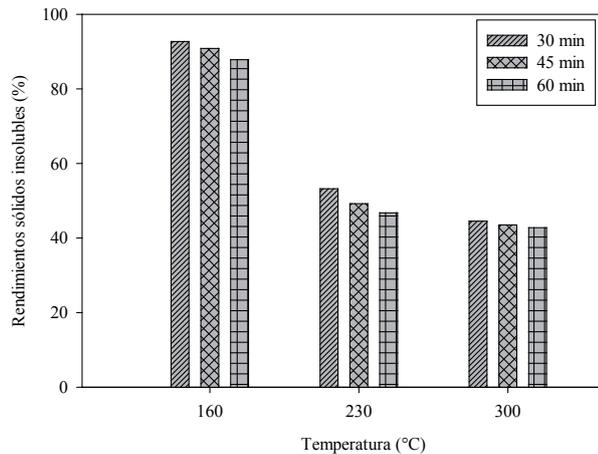


Figura 12. Rendimiento de la fracción insoluble del olote en la generación de grupos carboxílicos después del tratamiento hidrotérmico.

severo. Algunos autores reportan que esta recalcitrancia es atribuida a los vestigios de ferulatos de la lignina estrechamente ligada con heteroxilanas o complejos carbohidratos de arabinoxilana (Ralph *et al*, 1998a, Lapierre *et al*, 2001). Fue interesante observar que a 160°C y 45 minutos se obtuvo uno de los mejores rendimientos (55.4%) empleando un Ro [min] superior 3.45×10^3 (figura 7).

Rendimientos de sólidos insolubles en la generación de grupos carboxílicos.

Para este experimento, la temperatura fue el único factor que influyó significativamente con $p < 0.05$ y tuvo influencia apreciable sobre el rendimiento de los sólidos insolubles. Los mejores resultados obtenidos fueron 42.8%, 43.5% y 44.5% encontrados bajo las condiciones de 300°C con 60, 45 y 30 min, respectivamente, seguido del 46.8% bajo las condiciones de 230°C con 60 min (figura 12).

CONCLUSIONES

Se demostró, que es posible degradar un 50-60% la forma recalcitrante de un material lignocelulósico como el olote, mediante degradación hidrotérmica, utilizando sólo agua bajo condiciones subcríticas, a temperaturas por debajo de los 300°C y tiempos menores a una hora.

Este método de conversión de biomasa, mostró ser eficiente en el rendimiento, tanto de la fracción insoluble (celulosa y lignina), como de la soluble (fragmentos de xilana y lignina), con una apreciable concentración de grupos carboxílicos (29.3 meq/100g de olote).

En este proceso los grupos hidroxilos de las hemicelulosas y lignina se oxidaron a aldehídos y carboxilos de cadena corta pasando a formar parte de la fracción soluble después del tratamiento hidrotérmico. Este hecho es potencialmente de valor en reacciones posteriores de condensación para obtener productos de valor agregado (p. ej. compuestos nitrogenados).

El análisis estadístico de los datos experimentales de los tratamientos hidrotérmicos mostró que la temperatura y el tiempo de reacción fueron los factores con un impacto significativo sobre los rendimientos de los sólidos insolubles del olote, mientras que la temperatura es el único factor que tiene influencia directa sobre la generación de grupos carboxílicos en la fracción soluble.

AGRADECIMIENTOS

El autor principal agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar los años de mis estudios de Doctorado en México, tiempo en el que se realizó esta investigación. Al posgrado BEMARENA y el DMCyP de la Universidad de Guadalajara por sus instalaciones y a la Universidad Tecnológica del Chocó “DLC” por el apoyo brindado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC 954.04. (1984). Metodos y Analisis Oficiales de Nitrógeno Total. *Métodos y Análisis Oficiales de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos*, 13 th Edition.
- BAUCHER, M., MONTIES, B., VAN MONTAGU, M. & BOERJAN, W. (1998). Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit. Rev. Plant Sci. Total Environ*, 17, 125-197.
- BHARGAVA, S., TARDIO, J., PRASAD, J., FÖGER, K., AKOLEKAR, D. & GROCCOTT, S. (2006). Wet oxidation and catalytic wet oxidation Reviews. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 45, 1221-1258.
- BJÖRKMAN, A. (1956). Studies on finely divided wood. Part I. Extraction of lignin with neutral solvents. *Svensk. Papperstidn*, 13, 477- 485.
- BURANOV, A. U. & MAZZA, G. (2008). Lignin in straw of herbaceous crops. *Ind. crop. prod.*, 28, 237-259.
- CARO, N. & FRANK, A. R. (1929). Procesos para la producción de fertilizantes orgánicos nitrogenados por procesos de amoxidación. *British patent application* (No.347641).
- CASTRO, L. I., GAVI, R. F., PEÑA-CABRIALES, J. J., NÚÑEZ, E. R. & ETCHEVERS, B. J. D. (2006). Eficiencia de recuperación de N y K de tres fertilizantes de lenta liberación. *Terra Latinoamericana*, 24, 277-282.
- CASTRO, V. A., RODRÍGUEZ, V. L. & DÍAZ, V. J. (2007). Conversión hidrotérmica subcrítica de residuos orgánicos y biomasa. Mecanismos de reacción. *Redalyc*, (27), 41-50.
- CIMMYT (1995). Manejo de los ensayos e informes de los datos para el Programa de Ensayos Internacionales de Maíz, México DF, ISBN: 970-648-045-5, 20 p.
- CLARK, T. A. & MACKIE, K. L. (1987). Steam explosion of the soft-wood *Pinus radiata* with sulphur dioxide addition. I. Process optimization. *J. Wood Chem. Technol*, 7, 373-403.
- COCA, J., ALVAREZ, R. & FUERTES, B. (1984). Production of a nitrogenous humic fertilizer by the oxidation-ammoniation of lignite. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev*, 23, 620- 624.
- CÓRDOBA, A., DELGADO, F. & TORIZ, G. (2010). Generación de compuestos orgánicos en el olote, mediante la oxidación en húmedo. *Investigación, Biodiversidad y Desarrollo*, 29, 186 -200.
- COSTA, F., García C., Hernández T. & Polo A. (1991). Residuos orgánicos urbanos, manejo y utilización. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. *Centro de Edafología y Biología Aplicada de Segura*. Murcia - España, 181 p.
- DIEN, B. S., COTTA, M. A. & JEFFRIES, T. W. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol. Biot.*, 63, 258-266.

- DUFF, S. J. B. & MURRAY, W. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol. *Bioresource. Technol.*, 55, 1–33.
- EBRINGEROVA, A. & HROMADKOVA, Z. (1999). Xylans of industrial and biomedical importance. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 16, 325–346.
- FAIX, O. 1992. Characterization in the Solid State, Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: LIN, S. & DENCE, C. (eds.) *Methods in Lignin Chemistry*. Berlin: Springer-Verlag.
- FAOSTAT. (2012). Producción mundial de maíz. Available: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- FENGEL, D. & LUDWIG, M. (1991). Möglichkeiten und Grenzen der FTIR-Spektroskopie bei der Charakterisierung von Cellulose Teil 1. Vergleich von verschiedenen Cellulose-fasern und Bakterien-Cellulose. *Das Papier*, 45, 45–51.
- FLAIG, W. (1972). Verwertung eines Abfallproduktes der Zellstoffindustrie als Düngemittel – Eing Beitrag zur umweltfreundlichen Technik. *Landb – Forsh. Völkenrode*, 86 -93.
- FLAIG, W. & SÖCHTIG, H. (1973). Wirkung organischer Boden substanzen und Ertragssicherung Landb – Forsh. *Völkenrode*, 23, 19–28.
- GARCIA, R. B., GANTER, J. & CARVALHO, R. R. (2000). Solution properties of D-xylans from corn cobs. *Eur. Polym. J.*, 36, 783–787.
- GARROTE, G., FALQUÉ, E., DOMÍNGUEZ, H. & PARAJO, J. C. (2007a). Autohydrolysis of agricultural residues: study of reaction byproducts. *Bioresorce. Technol*, 98, 1951–1957.
- GONZÁLEZ, M., RIEUMONT, J., QUINTANA, I., RODRÍGUEZ, C., CUESTA, C., SARDINAS, C. & MORALES, A. (2006). Obtención de un material polimérico mejorado empleado como recubrimiento para la obtención de fertilizantes de liberación lenta. *Congreso Iberoamericano de Metalurgia y Materiales*, Habana- Cuba, 655-660.
- GRAY, K. S., ZHAO, L. & EMPTAGE, M. (2006). Bioethanol. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10, 141-146.
- HEITNER, C., DIMMEL, D. & SCHMIDT, J. A. (1941). *Lignin and lignans: advances in chemistry*, New York, Taylor and Francis Group.
- HERGERT, H. (1971). Infrared Spectra. In: SARKANEN, K. & LUDWIG, C. (eds.) *Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions*. New York: *Wiley-Interscience*.
- HROMADKOVA, Z., KOVACIKOVA, J. & EBRINGEROVA, A. (1999). Study of the classical and ultrasound-assisted extraction of the corn cob xylan. *Ind. Crops Prod.*, 9, 101–109.
- INGRAM, L. O., GOMEZ, P. F., LAI, X., MONIRUZZAMAN, M., WOOD, B. E., YOMANO, L. P. & YORK, S. W. (1998). Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.*, 58, 204–214.
- KABEL, M. A., BOS, G., ZEEVALKING, J., VORAGEN, A. G. J. & SCHOLS, H. A. (2007). Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresource. Technol.*, 98, 2042.
- KARUCÁKOVA, M., EBRINGEROVA, A., HIRSCH, J. & HROMADKOVA, Z. (1994). Infrared study of arabinoxylans. *J. Sci. Food Agric.*, 66, 423–427.
- KILZER, F. J. & BROIDO, A. (1965). Speculations on the nature of cellulose pyrolysis. *Pyro-dynamics*, 2, 151–163.
- KNOB, A. & CANO-CARMONA, E. (2010). Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: A novel acidophilic xylanase. *Appl Biochem Biotechnol*, 162, 429-443.
- KUMAR, S. & NEGI, Y. S. (2012). Corn Cob Xylan-based Nanoparticles: Ester Prodrug of 5-Aminosalicylic Acid for Possible Targeted Delivery of Drug. *J. Pharm. Sci. & Res*, 4, 1995 - 2003.
- LAPIERRE, C., POLLET, B. & ROLANDO, C. (1995). New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Res. Chem. Intermed.*, 21, 397–412.

- LAPIERRE, C., POLLET, B., RALET, M. C. & SAULNIER, L. (2001). The phenolic fraction of maize bran: evidence for lignin-heteroxytan association. *Phytochem.*, 57, 765-772.
- MARTÍNEZ, G., ZÚÑIGA, V., DELGADO, E., CAMACHO, A., GONZÁLEZ, V. & ALLAN, G. (1992). Producción de fertilizantes nitrogenados mediante oxi-amoniación en corteza de pino en lecho fluidizado. *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)*, 8, 21-26.
- MEIER, D., ZÚÑIGA, V., RAMÍREZ, F., HAHN, N. & FAIX, O. (1994). Conversion of technical lignins into slow-release nitrogenous fertilizers by ammoxidation in liquid phase. *Biore-source Technol.*, 49, 121-128.
- MILETZKY, F. & SCHIENE, R. (1985). Über die oxidative Ammonolyse von sulfatablauge- Untersuchungen zur kinetic. *Zellst. Papier*, 34, 186 -8.
- MIYAZAWA, T., OHTSU, S. & FUNAZUKURI, T. (2008). Hydrothermal degradation of polysaccharides in a semi-batch reactor: product distribution as a function of severity parameter. *J. Mater. Sci.*, 43, 2447-2451.
- MONTEIL-RIVERA, F., PHUONG, M., YE, M., HALASZ, A. & HAWARI, J. (2013). Isolation and characterization of herbaceous lignins for applications in biomaterials. *Ind. Crop. Prod.*, 41, 356- 364.
- MORA-RAVELO, S. G., GAVI, F. R., PEÑA, C. J., PÉREZ, M. J., TIJERA, C. L. & VAQUERA, H. (2007). Desnitrificación de un fertilizante de liberación lenta y urea + fosfato monoamónico aplicados a trigo irrigado con agua residual o de pozo. Montecillo. *Rev Int Contam. Ambie.*, 23, 25-33.
- NARAYAN, P. & HANCOCK, B. C. (2005). The influence of particle size on the surface roughness of pharmaceutical excipient compacts. *Mater. Sci. Eng. A.*, 407, 226-233.
- OLIVEIRA, E. E., SILVA, A. E., NAGASHIMA, T. J., SALGADO, G. M. C., AGUIAR, L. M., RODRIGUES, M. H., BATISTA, A. I., BAYER, M. P., RICARDO, M. P. S. N., GOMES, O. A. & TABOSA, E. E. S. (2010). Xylan from corn cobs, a promising polymer for drug delivery: Production and characterization. *Bioresource Technol.*, 101, 5402-5406.
- RADLEIN, A. G., PISKORZ, J. K. & MAJERSKI, P. A. (1997). Method of producing slow release nitrogenous organic fertilizer from biomass. Ontario, Canada *patent application* No. 5,676.727.
- RALPH, J., HATFIELD, R. D., GRABBER, J. H., JUNG, H. G., QUIDEAU, S. & HELM, R. F. (1998a). Cell wall cross-linking in grasses by ferulates and diferulates. In: LEWIS, N. G., SARKANEN, S. (ed.) *Lignin and Lignan Biosynthesis*. Washington, DC: *J. Am. Chem. Soc.*, 209-236.
- RIVAS, B., MOLDES, A. B., DOMÍNGUEZ, J. M. & PARAJÓ, J. C. (2004). Lactic acid production from corn cobs by simultaneous saccharification and fermentation: a mathematical interpretation. *Enzyme Microb. Technol*, 34, 627-634.
- ROWELL, R. M., HAN, J. S. & ROWELL, J. S. (2000). Characterization and factors affecting fiber properties. In E. Frollini, A.L. Leão and L.H.C. Mattoso (2000). *Natural Polymers and agro-fibers composites preparation, properties and application*, San Carlos Brazil, ISBN: 85-86463-06-X, 292 p.
- SAMANTA, A. K., SENANIA, S., KOLTE, A. P., SRIDHARA, M., SAMPATHA, K. T., JAYAPALA, N. & DEVIA, A. (2012). Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs. *Food Bioprod. Process.*, 90, 466-474.
- SÁNCHEZ, C., EGÜÉS, I., GARCÍA, A., LLANO-PONTE, R. & J., L. (2012). Lactic acid production by alkaline hydrothermal treatment of corn cobs. *Chem. Eng. J.*, 181-182, 655-660.
- SILVA, S. S., CARVALHO, R. R., FONSECA, J. L. C. & GARCIA, R. B. (1998). Extração e caracterização de xilanas de sabugo de milho. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 2, 1-9.

- SIMÓN, O., SINGH, B. K. & WEIL, M. J. (2005). Elaboración y caracterización de lignosulfonatos amonificados a partir de pinzote de banano y aserrín de laurel (*Cordia alliodora*) para utilizarse como fertilizante de liberación lenta. *EARTH-Tierra Tropical*, 1, 21-26.
- SUN, X.-F., SUN, R.-C., LU, Q., XU, F. & LIN, L. (2002). Fractional Isolation and Physico-Chemical Characterization of Hemicelluloses by a Two-Stage Treatment from *Haloxylon ammodendron* and *Elaeagnus angustifolia*. *J. Agric. Food Chem*, 50, 6400-6407.
- TAPPI 9M (1954). Celulosa Cross y Bevan. *Technical Association of the Pulp and Paper Industry*, 54, 1.
- TAPPI 204 CM (1997). Solvent extractives of wood and pulp. *Tech. Assoc. Pap.*
- TAPPI 207 CM (1999). Water solubility of wood and pulp. *Tech. Assoc. Pap.*
- TAPPI 211 (1993). Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525°C. . *Tech. Assoc. Pap.*, 1-4.
- TAPPI 222 (1998). Acid-insoluble lignin in wood and pulp. *Tech. Assoc. Pap.*, 1-2.
- TAPPI 237 OM (1993). Carboxyl content of pulp. *Tech. Assoc. Pap.*, 1-3.
- THOMPSON, N. S. (1995). Hemicellulose. In: KIRK-OTHMER (ed.) *Encycl. Chem. Technol.* New York: John Wiley & Sons.
- TIMELL, T. E. (1961). Isolation of galactoglucomannans from the wood of gymnosperms. *Tech. Assoc. Pap.*, 44, 88 - 96.
- WHISTLER, R. L. & SMART, C. L. (1953). *Polysaccharide Chemistry*, New York.
- WISE, L., MARPHY, M. A. & ADIECO, D. (1946). Chlorite Holocellulose, its Fractionation and Beating on Summative Wood Analysis and on Studies on the Hemicelluloses. *Paper Trade J.* , 122, 2 - 35.

Aislamiento, caracterización química y uso potencial de la xilana de olote de maíz

Isolation, characterization chemistry and potential use of xylan from corn cobs

Jhon Alexander Córdoba Árias¹, Eduardo Salcedo Pérez², Ramón Rodríguez Macías³, Ricardo Manriquez González², Marcos Alfredo Escalante Alvarez², Juan Francisco Zamora³, Ezequiel Delgado Fornué²

Resumen

Objetivo: Aislar, caracterizar químicamente y valorar los usos potenciales de la xilana de olote de maíz.

Materiales y métodos: Se realizó una hidrólisis ácida y alcalina a partir de olote y holocelulosa de olote respectivamente, para aislar y caracterizar la xilana. La caracterización química se realizó mediante técnicas espectroscópicas de FTIR-ATR, ¹³C-RMN y SEM. Se determinó el rendimiento en masa de la xilana a partir de holocelulosa de olote.

Resultados: El olote contiene celulosa 45% y hemicelulosas 33.6% (de las cuales 94% corresponden a xilana). La xilana obtenida presentó una apariencia de color blanco libre de impureza con características insolubles en agua, pero soluble en solventes orgánicos

Conclusión: Las xilanas, como uno de los componentes de interés, en el olote tienen gran potencial promisorio en la industria alimenticia como edulcorantes, en la industria del papel, como aditivos para mejorar las propiedades, en la industria automotriz, como pinturas, películas y recubrimientos, en la producción de biocombustibles, junto con la celulosa.

Palabras clave: Biomasa, Celulosa, Hemicelulosas, Xilana.

Abstract

Objective: Was isolated and chemically characterized the cob xylan and also was evaluated their potential use.

Material and methods: Was carried out the hydrolysis alkaline and acid from cob and cob holocellulose respectively, to isolate and characterize the xylan. The chemical characterization was performed by spectroscopic techniques of FTIR-ATR, ¹³C-NMR and SEM. The yield was determined in mass xylan from cob holocellulose.

Results: The study indicated that contains 45% cellulose cob and 33.6% from hemicellulose (of which 94% are xylan). The xylan obtained, presented a white appearance features free of impurity insoluble in water but soluble in organic solvents.

Conclusion: The xilana as one of the components of interest of corn cob have promising potential in the food industry as a sweetener, in the paper industry, as additives to improve properties, in the automotive industry, such as paintings, films and coatings, in the production of biofuels, together with cellulose.

Keywords: Biomass, Cellulose, Hemicellulose, Xylan.

Introducción

El olote del maíz (*Zea mays*) es un residuo o subproducto agrícola que se genera en grandes cantidades en el proceso de separación del grano

de la mazorca y se estima que por cada tonelada de maíz se obtienen 170 kg de olote (CIMMYT, 1995). Es importante señalar que el término residuo hace alusión a aquellas materias originadas en las actividades de producción y consumo

¹ Investigador, Universidad Tecnológica del Chocó «Diego Luis Córdoba», Estudiante de Doctorado en Ciencias Biosistemática, Ecología y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, México. e-mail: jhonalex810@gmail.com

² Investigador, Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

³ Investigador, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

Fecha de recibido: Febrero 24, 2013

Fecha de aprobación: Junio 6, 2013

que no han alcanzado, en el contexto en que se producen, ningún valor económico; ello se puede deber tanto a la falta de tecnología adecuada para su transformación y aprovechamiento, así como a la existencia de un limitado mercado para los productos recuperados (Costa *et al.*, 1991). El olote representa una fuente de recurso no maderable con un alto contenido de xilana (Oliveira *et al.*, 2010). Con base en algunos reportes se estimó que la producción de maíz en el 2010 fue cerca de 844 millones de toneladas y generó 144 millones de toneladas de olote (FAOSTAT, 2012).

Las xilanas poseen una gran complejidad estructural dependiendo de las diversas fuentes. Por ejemplo, las presentes en las membranas celulares de monocotiledóneas son D-xilopiranosas con enlaces glicosídicos β -D-1,4 que se pueden substituir con α -L-arabinofuranosa en la posición 2-O y/o el 3-O, y α -D-glucuronopiranosas o su derivado 4-O-metil en la posición 2-O (Kabel *et al.*, 2007). La mayoría de las xilanas tienen otros azúcares en las cadenas laterales, como ácido 4-O-metil-D-glucurónico, O-acetil-L-arabinosa, L-arabinosa, y ácido D-glucurónico. Con respecto a la xilana obtenida del olote, se ha demostrado que este polímero presenta una composición química de 4-O-metil-D-glucurónico, ácido L-arabinosa y D-xilosa en la proporción de 2:7:9, respectivamente (Ebringerova & Hromadkova, 1999; García *et al.* 2000; Karučáková *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1998; Whistler & Smart, 1953).

El olote, contiene una cantidad considerable de hemicelulosas (33% a 38%), en la cual se reconoce una fuente satisfactoria de xilosa (Samanta *et al.*, 2012). Las xilanas del olote, pueden ser caracterizadas por dos tipos estructurales diferentes; uno es una arabinoglucuronoxilana de ramificación baja, que es principalmente insoluble en agua (WIS-X) y el segundo es una heteroxilana muy ramificada soluble en agua (WS-X) (Hromadkova *et al.*, 1999). Una característica

importante de las xilanas insolubles en agua, es su capacidad para permanecer intacta en el medio ambiente fisiológico del estómago y el intestino delgado, esta propiedad, junto con la presencia de enzimas específicas para la biodegradabilidad en el colon, hace que este copolímero sea una materia prima adecuada para el campo de la medicina, especialmente como un portador de drogas de colon-específico (Ebringerova & Hromadkova, 1997).

Los efectos beneficiosos asociados con la xilana, se han reportado por varios autores, por ejemplo la acción inhibidora sobre actividades mutagénicas y la calefacción, parecen aumentar la capacidad de desintoxicación de fibras dietéticas, para combatir la inflamación (efectos antiflogísticos), estimulan o potencian el desarrollo celular (actividades mitogénicas y comitogénicas) (Ebringerova & Hromadkova, 1997), pero pocos trabajos han investigado el estudio sistemático de las propiedades tecnológicas de estos polímeros (Oliveira *et al.* 2010).

En el caso de las arabinoxilanas, se investiga sobre la fluoración con anhídrido trifluoroacético para producir películas hidrofóbicas con un potencial para el envasado de los alimentos (Grondahl *et al.*, 2006). Asimismo, se plantea que con algunas modificaciones (esterificación, eterificación o injertación), por ejemplo, se pueden hacer acetilaciones en condiciones análogas, utilizando los grupos hidroxilos libres como sitios para llevar a cabo la polimerización y poder hacerlas más hidrofóbicas (Lindblad & Albertsson, 2005; Natanya *et al.*, 2008).

En el caso de las D-xiloglucanas, L-arabino-D-xilanas, D-glucurono-L-arabino-xilanas, se pueden producir espumas y emulsiones estables en agua y/o aceite. Elaborar geles para curaciones, teniendo en cuenta que las micro y nanopartículas son utilizadas en la liberación de fármacos y otros compuestos (Ebringerova, 2006).

Las xilanas aisladas de olote han demostrado ser útiles como un aditivo en la fabricación de papel para mejorar sus propiedades e impresión de textil, así como en la industria farmacéutica (Hromadkova *et al.*, 1999).

A partir del xilitol proveniente del olote de maíz, se pueden elaborar películas y recubrimientos de materiales en la alimentación (Natanya *et al.*, 2008) y la industria farmacéutica, incluidos apósitos y las cápsulas para medicamentos (Lin & Zhao, 2007). En la alimentación para producir dulzuro para los diabéticos y por su característica anticariogénica se puede proponer en la medicina como anticaries (Miyazawa & Funazukuri, 2003; Natanya *et al.*, 2008). El alto contenido de hemicelulosas (xilana) de aproximadamente 34% encontrado en el olote de esta investigación, es lo que hace más atractivo e interesante, teniendo en cuenta que puede ser utilizada como biocarburante en la producción de bioetanol (Varga *et al.*, 2004; Martin & Thomsen, 2007).

En las xiloglucanas, se están estudiando los mecanismos de adsorción y la longitud crítica del esqueleto requerida para la interacción con la celulosa y la influencia de los sustitutos en este tipo de interacción (Kabel *et al.*, 2007), tienen excelentes características, por ser versátil y altamente disponible, lo que las convierte en una atractiva alternativa para ser comercializadas y empleadas a gran escala.

Las xilanas del olote, no han tenido mucha aplicación química o ha estado muy restringida debido al carácter recalcitrante del material o por la falta de un método de aislamiento efectivo de sus polímeros y la valoración química de las hemicelulosas (xilana). Pero en los últimos años, las propiedades de la xilana han generado un gran interés por aislarlas y caracterizarlas para darle un valor agregado. Esto puede realizarse a partir de hidrólisis ácidas (con ácido orgánico) y

alcalina de manera secuencial, permitiendo obtener una xilana con muchas aplicaciones.

Materiales y métodos

Aislamiento de holocelulosa de olote. La holocelulosa fue aislada mediante el método de Wise *et al.* (1946). Se pesaron 106.6 g de muestra de olote anhídrida libre de extractos, 32 g de clorito de sodio (NaClO_2) y se transfirieron a un vaso de precipitado con 1,279.2 ml de agua (H_2O) que contenían 10.7 ml de ácido acético (CH_3COOH); luego de preparar esta disolución, se dejaron baño de agua caliente entre 70°C y 80°C y cada hora se le añadieron 32 g NaClO_2 y 10.7 ml de CH_3COOH , agitando el vaso cada vez que se le agregó, hasta cumplir cuatro horas. Todos los pesos y volúmenes de los reactivos se ajustaron con respecto a los 5 g, que establece la norma. Al cumplirse este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente por varios minutos para poder ser manipulados. Luego sobre un filtro de vidrio de porosidad media que fue previamente pesado, se hizo pasar el contenido de la reacción, aplicando vacío.

Aislamiento de la xilana de olote a partir de holocelulosa. La xilana se aisló mediante la técnica descrita por (Timell, 1961), con algunas modificaciones. Se tomaron 83.83 g base seca de holocelulosa y se colocaron en un vaso de precipitados de 1,000 ml. Luego se le añadieron 600 ml de una solución de KOH al 24% (aproximadamente 7.15 ml por cada gramo de holocelulosa) y se dejó reaccionar bajo agitación durante 24 horas. El producto de la reacción se pasó por un filtro de vidrio de fondo poroso y se separó en dos partes, una parte soluble (hemicelulosas) y otra insoluble (α -celulosa). La parte soluble se precipitó gota a gota en una solución de etanol y ácido acético (cuatro partes de etanol y 0.4 partes de ácido acético por cada ml de hidrolizado) y se filtró en un papel filtro número dos bajo succión y se dejó secar en una

estufa de vacío a 60°C. La fracción insoluble consistente de celulosa se guardó para su posterior caracterización.

De las hemicelulosas recuperadas se tomaron 13.04 g base seca y se disolvieron en una solución de 250 ml de KOH al 10% bajo agitación; luego las mananas se precipitaron gota a gota en una solución de 500 ml de BaOH al 5% y se recuperaron mediante centrifugación a 4,000 rpm. La fracción de xilana se recuperó a partir del sobrenadante de la centrifugación mediante precipitación en 3,300 ml de la solución de etanol-ácido acético ya descrita. El precipitado se lavó con etanol y se filtró mediante vacío y finalmente se secó en una estufa de vacío a 60°C. A la xilana obtenidas se les determinó el rendimiento (en masa) y se almacenaron para caracterizarlas químicamente mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹³C, infrarrojo de transformadas de Fourier (FTIR) con ATR y microscopía electrónica de barrido (SEM). Mediante las ecuaciones i y ii se determinó el rendimiento en masa de las hemicelulosas y la xilana.

Rendimiento hemicelulosas de olote (%)= (i)

$$\frac{P_2}{P_1} \times 100\%$$

donde:

P_1 = Peso base seca de la holocelulosa (g)

P_2 = Peso base seca de hemicelulosas después de la hidrólisis alcalina (g)

Rendimiento xilana de olote (%)= (ii)

$$\frac{P_2}{P_1} \times 100\%$$

donde:

P_1 = Peso base seca de la xilana (g)

P_2 = Peso base seca de hemicelulosas después de la hidrólisis alcalina (g)

Análisis de infrarrojo FTIR-ATR. La xilana aislada del olote se analizó mediante la técnica de infrarrojo, utilizando un espectrómetro Perkin-Elmer, modelo Spectrum GX con un aditamento PIKE MIRacle de reflectancia total atenuada horizontal (HATR) de reflexión simple y con cristal de diamante. Se obtuvieron espectros por duplicado en una ventana espectral de 4000 a 550 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 16 barridos.

¹³C-RMN de xilana de olote. La muestra se preparó en un tubo de RMN disolviendo 20 mg de xilana en 0.75 ml de DMSO-d₆. El espectro de ¹³C se obtuvo en un espectrómetro de RMN de 200MHz Varian Gemini 2000 de banda ancha, con una frecuencia de análisis para el ¹³C de 50.29 MHz.

Morfología y análisis de tamaño de partícula de la xilana de olote mediante SEM. Se obtuvieron micrografías por medio de las muestras de xilana mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en un microscopio Tabletop TM-1000 (HitachiHigh-Technologies Inc., Japón) con el objetivo de observar las estructuras obtenidas y realizar un análisis de imágenes para determinar tamaños de partícula.

Resultados y discusión

Aislamiento de holocelulosa de olote. El proceso de hidrólisis ácida con ácido acético, proporcionó un rendimiento de holocelulosa obtenida a partir del olote de aproximadamente 83.8 g y correspondiente a 78.6%.

Aislamiento de la xilana de olote. El proceso de hidrólisis alcalina con KOH, seguido de precipitación de las hemicelulosas con una solución de etanol: ácido acético, proporcionó un rendimiento de 28.2 g correspondiente a 33.7% de hemicelulosas y se obtuvieron 12.2 g de xilana a partir de los 13.04 g iniciales de hemicelulosas. La fracción de xilana corresponde al 94% (w/w)

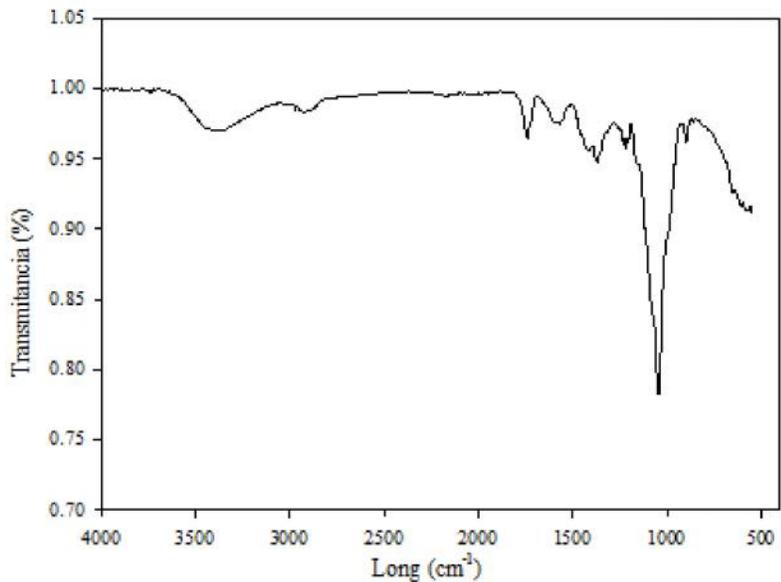


Figura 1. Espectro FTIR-ATR de xilana aislada de olote mediante hidrólisis alcalina.

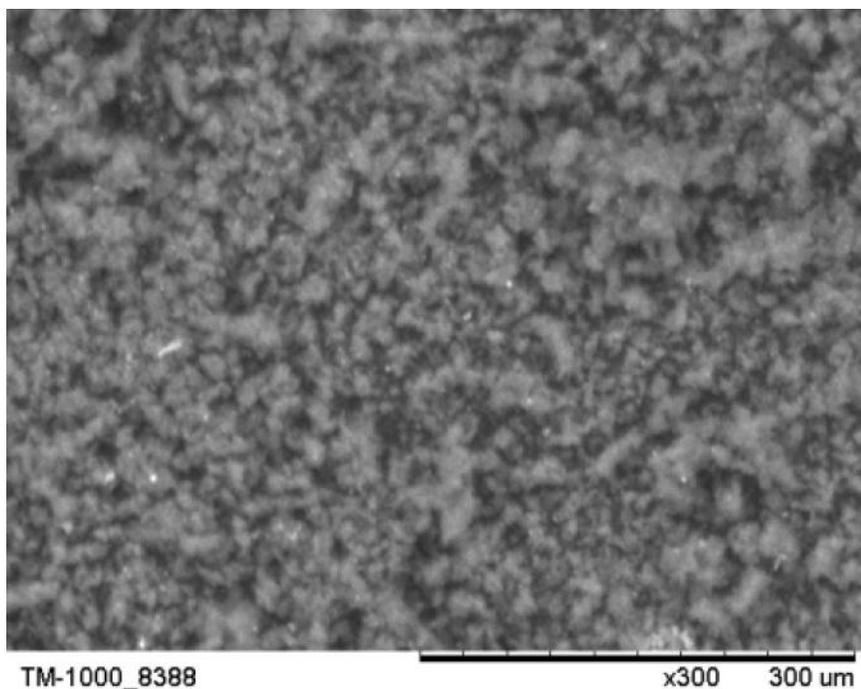


Figura 2. SEM Microfotografía de xilana aislada de olote

purificada. Además permitió obtener 45% de alfa celulosa en el otro material recuperado (Figura 1).

Análisis de FTIR-ATR de la xilana de olote. En la Figura 1, se muestran señales cercanas a las

bandas de 3422, 2927, 1421, 1228, 1212, 1166, 1049, 986 y 897 cm^{-1} , las cuales están asociadas con las señales características de las xilana (Samanta *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2010). A este respecto, el espectro de infrarrojo (Figura 2) reveló una banda de absorción en 3382 cm^{-1} la

cual es atribuida a vibraciones de estiramiento de grupos OH. La forma ensanchada de esta señal (3600 a 3200 cm^{-1}) es producida por la asociación de estos hidróxilos mediante puentes de hidrógenos intermoleculares (Samanta *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2010). Normalmente la intensidad de esta banda es influida por la presencia de estos grupos OH en el polímero.

La banda a 2930 cm^{-1} corresponde a estiramientos del tipo C-H de los grupos alifáticos de la xilana. La señal de 1737 cm^{-1} corresponde a grupos carbonilo C=O y esto puede originarse por grupos urónicos en las xilanas o la presencia de remanentes de ácido acético usado en el proceso de aislamiento de la xilana. Las bandas entre 1580 y 1637 cm^{-1} se atribuyen al agua absorbida o agua de hidratación presente en polisacáridos (Sun *et*

al., 2002; Oliveira *et al.*, 2010).

Las señales de 1421 y 1375 cm^{-1} son atribuidas a las vibraciones de deformación de los grupos C-H de las estructuras de hemicelulosas. La banda en 1161 junto a la banda fuerte a 1045 cm^{-1} es asignada a las vibraciones de estiramientos C-O, la cual es característica de grupos glicosídicos típico de hemicelulosas (Sánchez *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2010). Bajo este análisis se pudo establecer que la hidrólisis alcalina bajo estas condiciones, permitió obtener una xilana libre de impurezas con apariencia de polvo fino blanco. Y de acuerdo con el objetivo principal del estudio, se esperaba que el rendimiento de la xilana purificada fuera superior a 90% con respecto a 33.6% de rendimiento hemicelulosas obtenido a partir de holocelulosa.

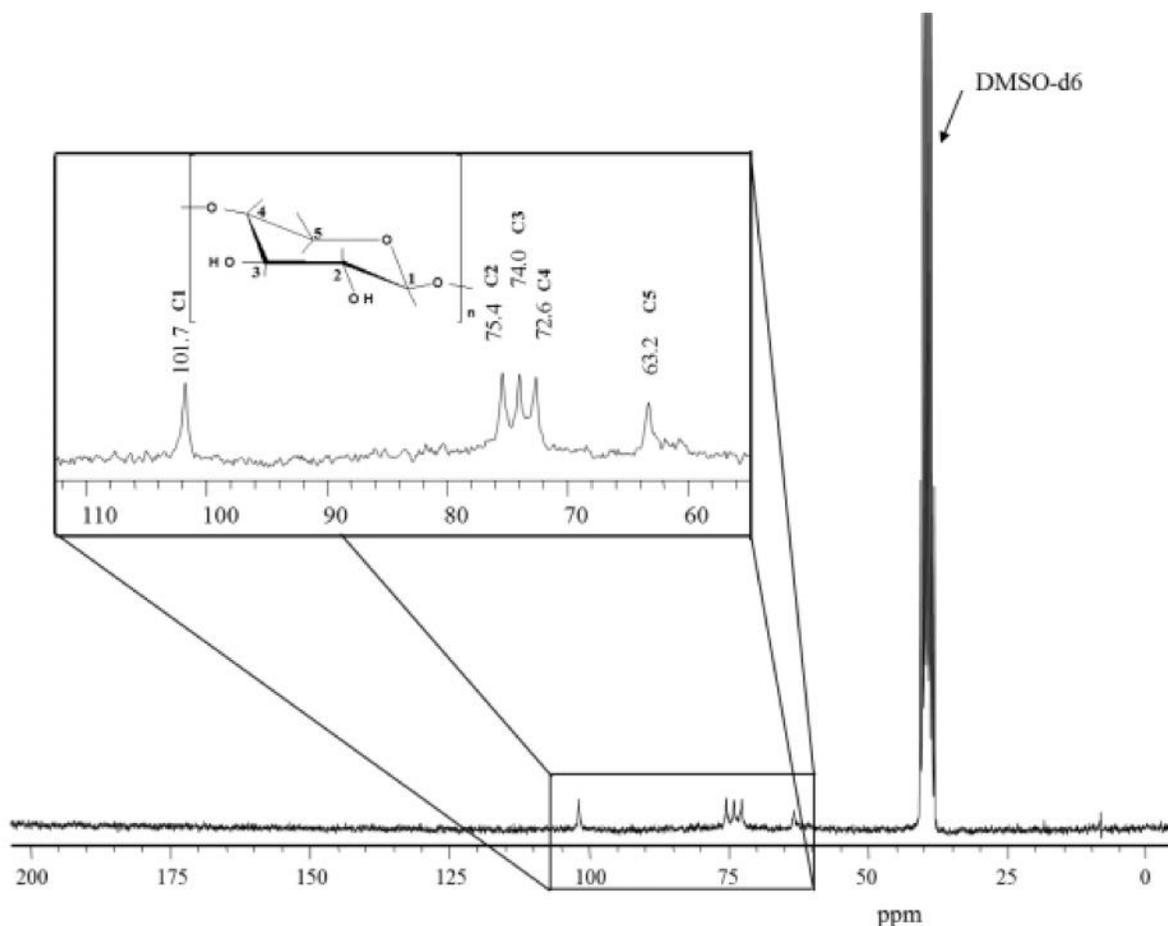


Figura 3. Espectro RMN- ^{13}C de xilana de olote con ampliación de la zona entre 110 a 55ppm.

¹³C-RMN de la xilana de olote. En el espectro de RMN de la muestra de xilana de olote aislada mediante hidrólisis alcalina de la Figura 3, se observan señales características reportadas para hemicelulosas (Kumar & Negi, 2012). Este espectro muestra cinco señales correspondiente a cinco tipos de carbonos en la estructura de la muestra de xilana. Entre estas señales podemos ver a campo más bajo (a 101.7 ppm) la señal característica de carbonos acetálicos (C-1) correspondiente a azúcares como la D-xilopiranosas de las unidades de xilana. Las tres señales siguientes en a 75.4, 74 y 72.6 ppm, corresponden a los carbonos C-2, C-3 y C-4, respectivamente del anillo piranósico, así como la última señal a 63.2 ppm que es atribuida al C-5 de este mismo sistema. Este resultado demuestra claramente que la xilana aislada se logró obtener de forma purificada mediante el proceso de extracción alcalina.

La mayoría de las xilanas tienen otros azúcares en las cadenas laterales. Se ha reportado que la xilana obtenida del olote presenta una composición química de 4-O-metil-D-glucurónico, ácido L-arabinosa y D-xilosa en la proporción de 2:7:9 respectivamente (Ebringerova & Hromadkova, 1999; García *et al.*, 2000; Karučáková *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1998; Whistler & Smart, 1953). El olote presentó una cantidad considerablemente alta de hemicelulosas (33.6%), siendo las de mayor porcentaje las tipo pentosas con 94% aproximadamente; resultados similares en rendimientos son reportados por otros autores (Yang *et al.*, 2006).

Morfología de la xilana de olote a partir de holocelulosa. La muestra obtenida en la forma de un polvo blanco fino, se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 2) donde se pueden observar las partículas de xilana en formas agregadas y no agregadas con morfología irregular y algunas de forma esférica. La baja resolución del equipo no permitió hacer un mejor análisis con respecto al tamaño de partícula de la xilana.

Conclusiones

Las técnicas analíticas espectroscópicas de ¹³C-RMN y FTIR-ATR utilizadas permitieron conocer la naturaleza química de la xilana de olote y dilucidar sobre las propiedades de insolubilidad en agua, dando un aporte desde el punto de vista químico de este residuo agroindustrial. Además, el estudio indicó que el olote tiene contenido cercano de holocelulosa (79%) y hemicelulosas (34%), donde 94% corresponde a xilana insoluble en agua.

La característica de insolubilidad en agua de la xilana le confiere capacidad para permanecer intacto en un medio ambiente fisiológico como el del estómago o el intestino delgado. Esta propiedad y la susceptibilidad de degradarse en el colon por acción de enzimas específicas hacen que este copolímero sea una materia prima adecuada para el campo de la medicina, especialmente como un portador de drogas de colon-específico.

Las xilanas, como uno de los componentes de interés en el olote tienen gran potencial promisorio en la industria alimenticia como edulcorantes, en la industria del papel como aditivos para mejorar las propiedades, en la industria automotriz como pinturas, películas y recubrimientos, en la producción de biocombustibles, junto con la celulosa, se aplican en la industria textil, sobre todo en la impresión como agente antideformante de telas.

En la industria farmacéutica, las xilanas tienen acción inhibitoria sobre actividades mutagénicas y efectos antiflogísticos, es decir, que combate la inflamación, también tienen un efecto sobre las actividades mitogénicas y comitogénicas, es eficaz como portador de drogas de colon-específico. Sirve como medio de cultivo para la producción de hongos alimenticios (*Pleurotus*) y xilanasa. Con los azúcares, se busca conseguir

ciclodextrinas que tengan aplicaciones biomédicas. Además en la agricultura, los compuestos orgánicos son fundamentales para elaborar fertilizantes orgánicos nitrogenados de acción prolongada.

Se demostró, que es posible aislar xilana casi libre de impurezas a partir del olote, mediante hidrólisis ácidas y alcalina, para obtener un polímero natural de interés para la industria como es el caso de la xilana de olote. Este método de aislamiento, mostró ser eficiente en rendimiento y selectividad.

Agradecimientos

El autor principal agradece a la Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar los años de estudios de Doctorado en México, tiempo en el que se realizó esta investigación. Al BEMARENA y el DMCyP de la Universidad de Guadalajara, por sus instalaciones y el apoyo brindado.

Literatura citada

- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 1995. *Manejo de los ensayos e informes de los datos para el Programa de Ensayos Internacionales de Maíz*. México DF: CIMMYT
- Costa F, García C, Hernández T, Polo A. 1991. *Residuos orgánicos urbanos, manejo y utilización*. Murcia: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Centro de Edafología y Biología Aplicada de Segura; 181 pp.
- Ebringerova A. 2006. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromol Symp*. 232: 1-12.
- Ebringerova A, Hromadkova Z. 1997. The effect of ultrasound on the structure and properties of the water-soluble corn hull heteroxylan. *Ultrason Sonochem*. 4: 305-9.
- Ebringerova A, Hromadkova Z. 1999. Xylans of industrial and biomedical importance. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 16: 325-46.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT). 2012. *Producción mundial de maíz*. URL://http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor
- García RB, Ganter J, Carvalho RR. 2000. Solution properties of D-xylans from corn cobs. *EUR Polym J*. 36: 783-7.
- Grondahl M, Gustafsson A, Gatenholm P. 2006. Gas-phase surface fluorination of arabinoxylan films. *Macromolecules*. 39: 2718-21.
- Hromadkova Z, Kovacicova J, Ebringerova A. 1999. Study of the classical and ultrasound-assisted extraction of the corn cob xylan. *Ind Crops Prod*. 9: 101-9.
- Kabel MA, Bos G, Zeevalking J, Voragen AG, Schols HA. 2007. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresour Technol*. 98 (10): 2034-42.
- Karucákova M, Ebringerova A, Hirsch J, Hromadkova Z. 1994. Infrared study of arabinoxylans. *J Sci Food Agricult*. 66: 423-7.
- Kumar S, Negi YS. 2012. Corn cob xylan-based nanoparticles: ester prodrug of 5-aminosalicylic acid for possible targeted delivery of drug. *J Pharm Sci Res*. 4: 1995-2003.
- Lindblad MS, Albertsson AC. 2005. Chemical modification of hemicelluloses and gums. In: Dumitriu S. (ed.) *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility*. New York: Marcel Dekker.
- Lin D, Zhao YY. 2007. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Food Sci Food Safety*. 6: 60-75.
- Martin C, Thomsen AB. 2007. Wet oxidation, pretreatment of lignocellulosic waste from the cane of sugar, rice, cassava and peanuts to ethanol production. *J Chem Technol Biotechnol*. 82: 174-81.
- Miyazawa T, Funazukuri T. 2003. Production of mono- and oligo-saccharides from hydrothermal degradation of polygalacturonic acid. In: Feng S, Chen JS, Shi Z (eds.) *Hydrothermal reactions and techniques*. Singapore: World Scientific.
- Natanya M, Hansen L, Plackett D. 2008. Sustainable films and coatings from hemicelluloses. *Biomacromolecules*. 9: 1493-505.
- Oliveira EE, Silva AE, Nagashima TJr, Salgado-Gomes MC, Muratori- Aguiara L, Rodrigues-Marcelino H, Batista-Araújo I, *et al.* 2010. Xylan from corn cobs, a promising polymer for drug delivery: Production and characterization. *Biores Technol* 101 (14): 5402-6.
- Samanta AK, Senania S, Kolte AP, Sridhara M, Sampatha KT, Jayapala N, *et al.* 2012. Production and *in vitro* evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs. *Food Bioprod Process*. 90: 466-74.

- Sánchez C, Egüés I, García A, Llano-Ponte R, Labidi J. 2012. Lactic acid production by alkaline hydrothermal treatment of corn cobs. *Chem Eng J.* 181-182: 655-60.
- Silva SS, Carvalho RR, Fonseca JLC, Garcia RB. 1998. Extração e caracterização de xilanas de sabugo de milho. *Polimeros.* 8 (2): 25-33.
- Sun XF, Sun RC, Lu Q, Xu F, Lin L. 2002. Fractional isolation and physico-chemical characterization of hemicelluloses by a two-stage treatment from haloxylon ammodendron and *Elaeagnus angustifolia*. *J Agric Food Chem.* 50: 6400-07.
- Timell TE. 1961. Isolation of galactoglucomannans from the wood of gymnosperms. *Tappi J* 44: 88-96.
- Varga E, Klinke HB, Reczey K, Thomsen AB. 2004. High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. *Biotechnol Bioengineer.* 88: 567-74.
- Whistler RL, Smart CL. 1953. *Polysaccharide chemistry*. New York: Academic Press.
- Wise L, Marphy MA, Adieco D. 1946. Chlorite holocellulose, its fractionation and beating on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses. *Paper Trade J.* 122: 2-35.
- Yang R, Zhang C, Feng H, Yang W. 2006. A kinetic study of xylan solubility and degradation during corncob steaming. *Biosyst Enginner.* 93: 375-82.