

APENDICES**APENDICE I****Determinación de azúcares elementales por HPLC*****Aplicación***

La aplicación de la cromatografía líquida de alta resolución permite separar y cuantificar azúcares elementales provenientes de las hidrólisis ácidas de materiales lignocelulósicos. También se pueden analizar los azúcares provenientes de oligómeros solubilizados en el proceso de pretratamiento hidrolítico o de los extractivos acuosos (Saeman et al., 1945; Montané D. et al., 1994)

Procedimiento***Preparación de las muestras***

El volumen filtrado proveniente de la hidrólisis secundaria realizada en la determinación de lignina Klason (ASTM D-1106-84) o del filtrado procedente de la posthidrólisis de los oligómeros solubles que se comenta en el siguiente apartado, se cuantifica con una probeta de 100mL. De este líquido se toman 25mL en un vaso de centrifuga de 100mL, adicionando con una pipeta 2mL de manitol (disolución acuosa de mannita de concentración conocida situada alrededor de 15-16mg/mL) que actúa como patrón interno para poder cuantificar la disolución producida en el transcurso de la neutralización de la solución de hidrolizados.

Esta solución ácida se neutraliza adicionando 3.2g de Ba(OH)₂ sólido, manteniendo la mezcla en perfecta agitación durante una hora con la ayuda de un agitador magnético. Transcurrido este tiempo y sin dejar de agitar, se ajusta el pH entre 5 y 7 adicionando H₂SO₄ o Ba(OH)₂ según sea conveniente y controlando la medida con un pH-metro (CRISON MICRO-pH 2001) calibrado a temperatura ambiente.

Una vez neutralizada la muestra se centrifuga a 2000rpm (es este caso se utilizó una centrifuga SELECTA MEDITRONIC) durante 10 minutos con el objeto de separar el BaSO₄ precipitado durante la reacción de neutralización de la fase líquida donde restan los monosacáridos a cuantificar.

El líquido se pasa por un filtro MILLIPORE de 0.45µm hasta recoger suficiente muestra para llenar un vial épendorf. La muestra etiquetada se congela hasta que se realice el análisis por HPLC.

Análisis de las muestras

El cromatógrafo HPLC utilizado es un BECKMAN System Gold provisto de un módulo de bombas BECKMAN 126, un detector de índice de refracción BECKMAN 156 termostatizado a 20°C y una interface analógica-digital BECKMAN 406. La columna empleada, BIORAD Aminex HPX-87P (300x7.5mm) es termostatizada a 85°C con un horno de columnas BIORAD y una precolumna de intercambio iónico BIORAD deashing cartridge, situada fuera del horno. La fase móvil empleada es agua desonizada MILLIPORE.

Al inicio de la operación con el cromatógrafo, se purga el módulo de bombas fijando un caudal de la fase móvil de 0.1mL/min. Con este mismo caudal se procede a la termostatización de la columna a 85°C. A continuación el flujo eluente se incrementa hasta un caudal de 0.6mL/min en 20 min, dejando que el equipo se estabilice en estas condiciones.

Una vez comprobado que el equipo se encuentra a régimen y monitoreada la línea base, se procede a la inyección de 20µL de cada muestra de al loop.

Cálculos

El programa instalado en el sistema cromatográfico es el que realiza el cálculo de concentraciones de los azúcares a partir de las rectas de calibrado obtenidas con patrones de concentración conocida, oscilando entre 0.1 y 12 mg/mL.

Los tiempos de retención para cada uno de los azúcares se especifican en el método de análisis considerando generalmente un margen de error del 10%. Los tiempos de retención típicos de los azúcares analizados se muestran en la tabla A.1 y un cromatograma típico de una solución de azúcares patrón en la figura A.1

Tabla A.1 Tiempo de retención de los azúcares analizados

Mono o disacárido	Tiempo de retención (min)
Celobiosa	10.4
Glucosa	13.3
Xilosa	14.4
Galactosa	15.1
Arabinosa	16.3
Mannosa	17.1
Mannitol	25.8

La cantidad total en masa de cada uno de los azúcares que contiene la muestra líquida se expresa según la siguiente ecuación:

$$\text{Azúcar(g)} = 27 \times F_{\text{dilución}} \times C_{\text{HPLC}} \frac{V_T}{V_{\text{alícuota}}} \times F_{\text{global}} \times 10^{-3} \quad (\text{A-1})$$

$$F_{\text{dilución}} = \frac{2 \times C_{\text{PIInicial}}}{27 \times C_{\text{PIHPLC}}} \quad (\text{A-2})$$

donde:

C_{HPLC} es la concentración de cada azúcar calculada para el sistema cromatográfico expresada en mg/mL.

$C_{\text{PIInicial}}$ concentración del patrón interno inicial antes de la neutralización.

V_T es el volumen total de la muestra líquida que se analiza.

$V_{\text{alícuota}}$ es el volumen que se toma como alícuota para realizar la neutralización.

$F_{\text{dilución}}$ es la corrección debida al volumen agregado para ajustar el pH del volumen formado por la alícuota y el patrón interno sobre los cuales se efectúa la neutralización.

F_{global} Es un factor corrector que tiene en cuenta tanto la degradación de los monosacáridos en la hidrólisis (factor de recuperación) como la variación en peso que experimentan los azúcares por efecto de la solvatación.

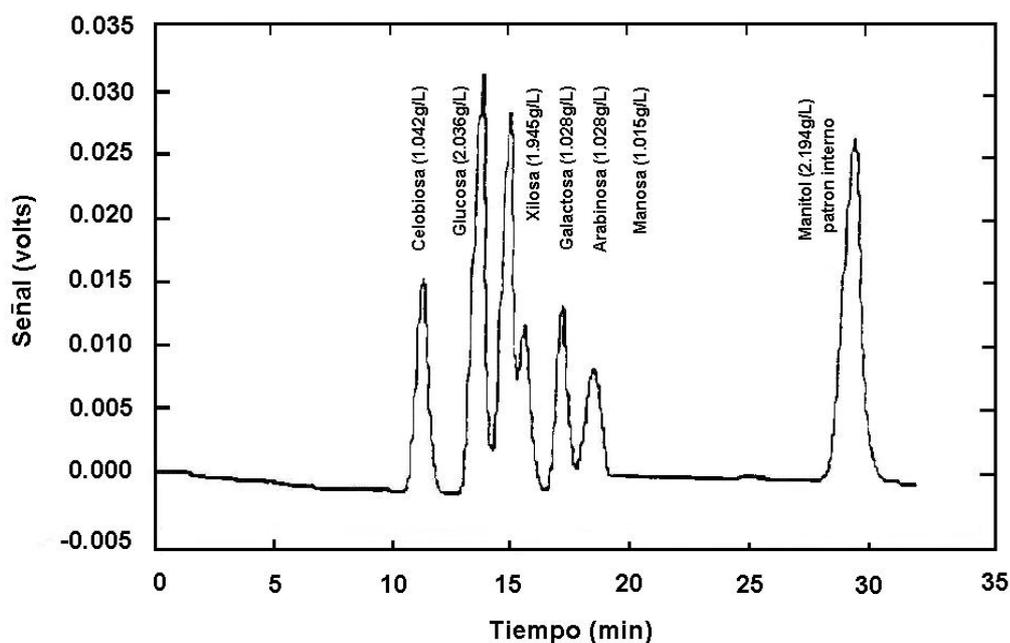


Figura A.1 Cromatograma HPLC de una solución patrón de azúcares elementales

Los factores de recuperación (Moore et al., 1967) y solvatación (Bouchard, 1986) correspondientes a los monosacáridos analizados se muestran en la tabla A.2

Tabla A.2. Factores de recuperación y solvatación correspondientes a los monosacáridos analizados

Monosacárido	Factor recuperación (1)	Factor solvatación (2)	Factor global (2/1)
Glucosa	0.993	0.90	0.965
Xilosa	0.860	0.88	1.023
Galactosa	0.957	0.90	0.940
Arabinosa	0.924	0.88	0.952
Mannosa	0.916	0.90	0.983

Conocida la cantidad total de cada uno de los azúcares, el porcentaje respecto a la muestra hidrolizada sobre la cual se realiza el análisis se calcula según la siguiente expresión:

$$\text{Azúcares(\%)} = \frac{\text{azúcares(g)}}{M \times \left(1 - \frac{H(\%)}{100}\right)} \times 100 \quad (\text{A.3})$$

donde:

- M es la masa de muestra húmeda a hidrolizar
 H es la humedad de la muestra húmeda a hidrolizar

BILIOGRAFIA

Bouchard, J. (1996). Procédures pour l'analyse de la biomasse, de la tourbe et de leurs produits. Département de Genie Chimique. Université de Sherbrooke, Canadá.

Montané D., Salvadó J. y Farriol X. (1994). Chemical analysis of partially hydrolyzed lignocellulosic biomass. *Afinidad*, **51**, 109

Moore W.E y Johnson D.B. (1967). Procedures for the chemical analysis of wood and wood products. U.S. Forest Products Laboratory, **67**, 45.

Saeman, J.F., Bulb, J.L. and Harris, E.E. (1945). Quantitative saccharification of wood and cellulose. *Industrial and Engineering Chemistry*, **17** (1), 35.

APENDICE II

Preparación de las muestras por Microscopía de Barrido Electrónico

Esta técnica se basa en el bombardeo de electrones mediante un filamento de Tugsteno contra la superficie conductora de la muestra a analizar, excitando los electrones de la superficie y obteniéndose así la respuesta visual con zonas y relieves más o menos brillantes.

Procedimiento

Inicialmente las muestras se fijan con glutaraldehído al 6% y una solución tampón de fosfato 0.1M durante 2 h y 30 min. Seguidamente se realiza un primer lavado con tampón fosfato 0.1M durante 15 min repitiendo la operación una vez más. A continuación se realiza un tratamiento de solución al 1% de tetraóxido de osmio en tampón fosfato 0.1M dos veces más durante 15 min.

Se realiza un tratamiento de deshidratación tratando las muestras consecutivamente en soluciones de alcohol etílico de 30, 50, 70, 90 y 96^a durante 15 minutos en cada etapa. Después se realizan 4 tratamientos con alcohol etílico de 100° de 15 min cada uno.

Se tratan las muestras con etanol y amil-acetato en proporciones de 3:1, 2:1, 1:1, 1:2:1:3 y 1:4 durante 15 min en cada caso y posteriormente con amil-acetato al 100% 4 veces durante 15 min cada una.

A continuación las muestras se secan sustituyendo el amil-acetato por CO₂ líquido aplicando el punto crítico (T =31°C, P=73.8 bar) mediante un equipo BALZERS CPD 030. Posteriormente el CO₂ pasa a fase gas y finaliza el proceso de secado.

Finalmente se procesa a la metalización con oro de las muestras con el metalizador (sputter coater) BALZERS SCD 004 aplicando un vacío de 0.05mbar y 3 tratamientos de 30s a 30mA y una distancia de 50mm.

Una vez finalizada esta fase ya se pueden hacer las observaciones en el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6400.

BIBLIOGRAFIA

Goldstein, J.I., Newbury, D.E., Echlin, P., Joy, D.C., Romig, Jr., A.D., Lyman, C.E., Fiori, C. y Lifshin, E. (1994) Sample preparation for biological, organic polymeric and hydrated materials. Em: Electron Microscopy and X-ray Microanalysis. A text for Biologist, Materials Scientist and Geologists. Plenum Press, New York-London.

Mercer, E.H. y Birbeck, M.S.C (1979) manual de Microscopia Electrónica para Biólogos. Blume Ediciones, Madrid.

APENDICE III

Determinación del índice de cristalinidad

El espectro de difracción de rayos X aplicado a substratos celulósicos presenta un pico muy intenso a 22.6° que es consecuencia de su estructura cristalina. Así mismo muestra además un ruido de fondo o línea base causado fundamentalmente por la parte no cristalina o zona amorfa. En la determinación de esta propiedad se ha utilizado un difractómetro SIEMENS D-5000 provisto de un detector PSD (Position Sensitive Detector) que opera a una longitud de onda (k_α del Cu) de 1.5406Å, a 30Kv y 20mA.

Procedimiento

El espectro se registra para ángulos comprendidos entre 10 y 30° a una velocidad de barrido de 1° cada 10s. Se utilizan por otro lado cantidades de muestra no superiores a los 0.003g. para un mejor análisis de la muestra, ésta se prensa uniformemente evitando que existan irregularidades en la difracción de la misma.

Cálculos

El índice de cristalinidad se calcula empleando las intensidades de difracción de la estructura cristalina (plano 002, $2\theta=22.6^\circ$) y de la fracción amorfa ($2\theta=18.0^\circ$):

$$CrI = 100 \times \left(\frac{I_{002} - I_{amorfa}}{I_{002}} \right) \quad A-6$$

BIBLIOGRAFIA

Segal L., Creely J.J., Martin A.E. y Conrad C.M (1959). An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer., *Text. Res. J.* 29, 786-794.

APENDICE IV

Determinación del comportamiento reológico de las soluciones acuosas de carboximetilcelulosa sódica

En los capítulos III y IV se resalta el interés de realizar un estudio reológico de las soluciones de carboximetilcelulosa. A continuación se describe las metódicas seguidas en este trabajo.

Procedimiento 1

Se pesan de 1 a 4g de muestra de CMC húmeda en un vaso de precipitados de 200mL dependiendo de la concentración a la cual se quiere preparar la solución. La muestra se seca a 105°C hasta peso constante. En función del peso alcanzado se agrega agua hasta llegar a la solución de concentración deseada.

La mezcla de CMC y agua se disuelve mediante agitación magnética vigorosa siendo necesaria en algunas ocasiones ayudarse con una varilla de vidrio a causa de la elevada viscosidad del fluido.

Cuando la mezcla es homogénea, se trasvasa al recipiente de acero inoxidable del viscosímetro HAAKE VT550 donde se realizan las medidas. A continuación se procede al montaje del sensor y la termostatación del sistema usualmente a 25°C.

Una vez el equipo se pone en funcionamiento, se realizan las medidas por lectura directa de la velocidad de deformación y el esfuerzo tangencial comenzando por la velocidad de deformación inferior e incrementándola progresivamente.

Procedimiento 2

Se preparan varias disoluciones de CMC en NaCl 0.1M a diferentes concentraciones perfectamente conocidas. Las preparaciones se mezclan con un agitador magnético y cuando están completamente disueltas se dejan reposar y equilibrar durante unas horas.

La mezcla es homogénea se coloca sobre el plato-base del reómetro AR1000 Rheometer (France) y se fija la inercia del equipo y las características o geometría del cono utilizado. A continuación se hace descender el cono hasta tocar la muestra para empezar con las mediciones. Salvo en los experimentos que se requiere de una rampa de temperaturas, la temperatura de operación del equipo se fija a 20°C y se controla mediante un baño con agua termostatzado.

Mediante el software TA Instruments del equipo, se realizan las medidas por lectura directa de la velocidad de deformación y el esfuerzo tangencial dentro de un rango de

velocidades de deformación que se incrementa progresivamente. Para el caso de medidas de movimientos oscilatorios, se fija un esfuerzo externo y después se hacen mediciones G' (módulo almacenamiento), G'' (módulo de pérdida) y $|\eta^*|$ (viscosidad) a diferentes frecuencias.

BIBLIOGRAFIA

Viscosímetro HAKKE VT550. Manual de operación

TA Instruments Rheometer AR1000. Manual de operación.