



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

**“Deslignificación de pulpa de papel mediante un sistema de reciclaje del mediador
ABTS²⁻ y un proceso organosolv acoplados”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

LIZZETE RUTH TORRES BARAJAS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZÁLEZ

México, D.F., Junio de 2006

La maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y además cuenta con el apoyo del mismo consejo, con el número de registro 0471-O.

La alumna Lizzete Ruth Torres Barajas recibió apoyo económico del CONACyT con el registro de becario número **181017**.

Iztapalapa, D.F., 30 de Junio de 2006.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

“Deslignificación de pulpa de papel mediante un sistema de reciclaje del mediador ABTS²⁻ y un proceso organosolv acoplados”

que presentó la alumna:

Lizzete Ruth Torres Barajas

Comité tutorial:

Director de tesis: Dr. Gustavo Viniegra González
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldívar
Universidad Nacional Autónoma de México-Facultad de Química.

Asesor: Dr. Humberto Vázquez Torres
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Comité de evaluación:

Dr. Ignacio González Martínez
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. Humberto Vázquez Torres
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldívar
Universidad Nacional Autónoma de México-Facultad de Química.

Dra. María Myrna Solís Oba
Instituto Politécnico Nacional-CIBA.

AGRADECIMIENTOS

En esta única sección del texto, que no admite correcciones de ningún tipo, es justo agradecer a todas y cada una de las personas que hicieron su contribución para la realización y culminación de este proyecto.

En primer lugar, agradezco a mi familia: a mi madre y a mi padre, por darme la vida, pero sobre todo, por el amor tan grande que me dan, por ser mi apoyo en todo momento y ayudarme siempre a seguir adelante. A César, mi hermano, que ha sido siempre mi cómplice y mi amigo. Los tres, son las personas que más quiero.

A mis compañeros de laboratorio y amigos: Isabel Membrillo, Oscar Núñez, Eduardo Márquez, Ángeles Castro, Oscar “el pequeño”, Diana Cortés y César Espinoza, por sus oportunos comentarios, por las amenas charlas de café, que hicieron más agradable mi estancia en el laboratorio, pero sobre todo por su amistad y cariño. Al Dr. Octavio Loera, por el apoyo que me ha brindado, por sus consejos y su amistad de varios años. A mis amigos y compañeros de generación: Xitlalli Torres, Verónica Freyre, Ulises “Roncho” y Ricardo Huizache. A mis amigos “los gusanos”: Mariana Govea, Charly-green Tapia, Charly-drink Pérez, Víctor H. Hernández, Fortino “fortifor” e Ivonne Castelán. A Rosa Luévano, Javier Suárez, Olga Zamudio y Carlos Ramírez, mis amigos a los que veo muy poco, pero quiero mucho.

A mis “padres adoptivos” Ainhoa Arana y Alejandro Téllez, por su apoyo, su amistad, sus consejos y su paciencia. Al doctor Juan Carlos Villar, por mostrarme que siempre hay alternativas y ayudarme a encontrar motivos para seguir adelante.

A los maestros Alejandro Montesinos y Alejandro Gaona de la PPI, por sus consejos y su apreciable ayuda durante la primera parte del trabajo experimental. A Juan Carlos Maya, Mary y "Dorita", del laboratorio de electroquímica por sus consejos y amistad.

A mi director de tesis, el Dr. Gustavo Viniegra, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, al Dr. Humberto Vázquez por sus consejos académicos y por las charlas tan amenas, al doctor Ignacio González, por su ayuda y apoyo durante el trabajo experimental. Al Dr. Víctor Manuel Ugalde por su paciencia, su apoyo y el gran compromiso que siempre demuestra con su trabajo, por sus enseñanzas a lo largo de este proyecto y las críticas que recibí de su parte, porque siempre fueron constructivas y esas, son las que más ayudan a crecer.

A mis ex- alumnos de la UI y la UAM, que me dieron motivación y, su amistad.

Finalmente... a los contribuyentes del país, porque sus impuestos permitieron continuar mi labor, je,je,je.

GRACIAS

*“...Después de los hastíos y las hondas penas
que abruman con su peso la existencia dudosa,
feliz aquel a quien su ala vigorosa
lanza hacia las regiones radiantes y serenas.”*

*Tu que, al igual que alondras, elevas tus ideas
y el cielo matinal en un vuelo saludas,
comprendes sin esfuerzo, sobre las cosas feas,
el habla de las flores y de las cosas mudas.”*

*Elevación (fragmento)
Las Flores del mal
Charles Baudelaire.*

RESUMEN

El consumo de papel alcanza 200 a 300 kg *per cápita* en países industrializados. La mayor parte de la pulpa de papel utilizada en su elaboración, se obtiene por procesos de pulpeo y blanqueo de las fibras. Estos procesos generan efluentes, que poseen un alto contenido de compuestos organoclorados, y representan un peligro para la salud. Por lo que se requieren alternativas de blanqueo que no presenten estos riesgos. Algunas de estas alternativas plantean el uso de sistemas enzimáticos y mediadores redox, para llevar a cabo la oxidación de lignina en pulpa de papel.

En este trabajo, se desarrolló un procedimiento que combinó la deslignificación de pulpa de papel en un proceso de preoxidación, utilizando el mediador redox ABTS²⁻ (ácido 2,2'-3-etil benzotiazolin-6-sulfónico) y el proceso organosolv. Se evaluó la disminución de lignina en pulpa de papel por parte del proceso organosolv, se realizó la caracterización del mediador redox ABTS²⁻ espectroscópica y electroquímicamente así como la oxidación enzimática y química del mismo con peróxido de hidrógeno en medio ácido, con el que se alcanzó una eficiencia de oxidación cercana al 100 %. El ABTS²⁻ fue utilizado como un tratamiento previo al proceso organosolv, para la deslignificación de pulpa de papel. Con este proceso combinado, se alcanzó la disminución del número kappa por arriba de 50 unidades.

ÍNDICE**Contenido****Resumen**

pag.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN 5

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 DEMANDA DE CELULOSA A NIVEL MUNDIAL 10

2.2 FUENTES DE OBTENCIÓN DE CELULOSA 11

2.3 ESTRUCTURA DE LA MADERA 12

2.4 PROCESOS DE PULPEO Y DESLIGNIFICACIÓN 16

2.4.1 Proceso kraft 18

2.4.2. Proceso organosolv 20

2.5 PROCESOS DE BLANQUEO 23

2.5.1 Variables de control del proceso de blanqueo 26

2.6 ALTERNATIVAS DE BLANQUEO 28

2.6.1 Agentes biológicos 28

2.6.2 Sistemas enzimáticos 29

2.6.2.1 *Lacasa* 302.6.2.2 *Sistemas Lacasa-mediador* 322.7 MEDIADOR ABTS²⁻ 33

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS	40
OBJETIVO GENERAL	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	42
4.2 LISTADO DE REACTIVOS	43
4.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS	44
4.3.1 Preparación de la pulpa de papel	44
4.3.2 Evaluación del efecto del proceso organosolv en la disminución de lignina en pulpa de papel	44
4.3.3 Determinación del número kappa	45
4.3.4 Caracterización voltamperométrica de ABTS ²⁻ y adaptación del método de Bourbonnais, para la determinación del número kappa de muestras de pulpa de papel	46
4.3.5 Caracterización espectrofotométrica de ABTS ²⁻	47
4.3.6 Separación de la enzima lacasa	48
4.3.7 Cuantificación de la cantidad de proteína recuperada	48
4.3.8 Evaluación de la actividad enzimática de lacasa a diferentes valores de pH	49
4.3.9 Inmovilización de la enzima lacasa en cristales de sílice	49

4.3.10 Determinación de la actividad enzimática de lacasa inmovilizada	50
4.3.11 Oxidación de $ABTS^{2-}$ en solución con enzima inmovilizada	50
4.3.12 Determinación de la cantidad máxima de la mezcla $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$ capaz de reaccionar con lignina de pulpa de papel	51
4.3.13 Determinación de la adsorción de $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$ en cristales de sílica gel	51
4.3.14 Oxidación de $ABTS^{2-}$ con peróxido de hidrógeno en medio ácido	52
4.3.15 Deslignificación de pulpa de papel empleando la mezcla $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$ obtenida por oxidación con peróxido de hidrógeno	52
4.3.16 Determinación de la adsorción de $ABTS^{2-}$ y $ABTS^{\cdot-}$ en pulpa de papel	53

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 EFECTO DEL PROCESO ORGANOSOLV EN LA SOLUBILIZACIÓN DE LIGNINA EN PULPA DE PAPEL	54
---	----

5.2 ESTUDIO VOLTAMPEROMÉTRICO DEL ABTS ²⁻	59
5.2.1 Efecto de la velocidad de barrido	62
5.2.2 Adaptación del método de Bourbonnais para la determinación del número kappa de muestras de pulpa de papel	64
5.3 CARACTERIZACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ABTS ²⁻	69
5.4 EFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA LACASA EN DISOLUCIÓN	74
5.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASA INMOVILIZADA	76
5.6 DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD MÁXIMA DE LA MEZCLA ABTS ²⁻ / ABTS ⁻ CAPAZ DE REACCIONAR CON LIGNINA DE PULPA DE PAPEL.	79
5.6.1 Relación entre el número kappa y la cantidad requerida de ABTS ⁻ durante la reacción de oxidación de lignina	82
5.7 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE ADSORCIÓN DE ABTS ²⁻ /ABTS ⁻ EN CRISTALES DE SÍLICA	84
5.8 OXIDACIÓN DE ABTS ²⁻ CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MEDIO ÁCIDO	87

5.8.1 Oxidación de $ABTS^{2-}$ con H_2O_2 en una disolución 0.05 M de ácido clorhídrico	88
5.8.2 Oxidación de $ABTS^{2-}$ con H_2O_2 en una disolución 0.1 M de ácido clorhídrico	92
5.8.3 Oxidación de $ABTS^{2-}$ con H_2O_2 en una disolución 0.05 M de ácido sulfúrico	96
5.8.4 Oxidación de $ABTS$ con H_2O_2 en ácido acético 1.0 M	100
5.9 EFECTO DE LA MEZCLA $ABTS^{2-}/ABTS^{\bullet-}$ EN LA DESLIGNIFICACIÓN DE PULPA DE PAPEL	105
5.9.1 Recuperación de la fase orgánica y acuosa del proceso organosolv	109
5.9.2 Determinación de la adsorción de $ABTS^{2-}$ y $ABTS^{\bullet-}$ en pulpa de papel	112
5.10 EVALUACIÓN ECONÓMICA DEL ACOPLAMIENTO DE LOS PROCESOS $ABTS^{2-}$ — $ABTS^{\bullet-}/ORGANOSOLV$	115
CAPÍTULO VI	
CONCLUSIONES	120
PERSPECTIVAS	121
APENDICE	122
CAPÍTULO VI	
BIBLIOGRAFÍA	123

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 2.3.1** Esquema de la pared celular vegetal y orientación de las fibras de celulosa en cada nivel.
- Figura 2.3.2.** Estructura de la celulosa.
- Figura 2.3.3** Estructura de los tres alcoholes constituyentes de la lignina.
- Figura 2.3.4.** Estructura generalizada de lignina.
- Figura 2.4.1** Diagrama del proceso global de elaboración de papel. La recuperación de subproductos está sujeta al tipo de pulpeo realizado.
- Figura 2.4.1.1** Diagrama general del proceso kraft.
- Figura 2.4.2.1.** Esquema global del pulpeo de madera por medio del proceso organosolv.
- Figura 2.6.2.1.1** Mecanismo de reacción propuesto de la reducción de oxígeno molecular a agua por transferencia de 4 electrones en el sitio activo de la enzima lacasa de *Rhus vernicifera*.
- Figura 2.6.2.2.1.** Esquema general del Sistema Lacasa- mediador.
- Figura 2.7.1** Estructuras del ABTS²⁻, sus posibles estados de oxidación en equilibrio ácido-base.
- Figura.4.3.4.1.** a) Esquema de la celda de trabajo y los tres electrodos empleados durante la caracterización voltamperométrica de ABTS²⁻ y ABTS²⁻ con pulpa de papel. Electrodo de trabajo (ET), electrodo de referencia (ER), contra electrodo (CE). b) Esquema del electrodo de trabajo y adaptación de la funda de fondo plano. c) Vista transversal de la funda y el fondo plano de malla.
- Figura 5.1.1** Representación gráfica del cambio del número kappa en función del tiempo, como una medida de la cantidad de lignina presente en pulpa de papel sin blanquear y sin pretratamiento, después de ser sometida al proceso organosolv.
- Figura. 5.2.1.** Voltamperograma de una disolución 0.3 mM de ABTS²⁻ obtenido a 0.1 V/s utilizando un electrodo de carbón vítreo y una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M pH = 4.5 como electrolito soporte. El barrido de potencial se realizó en dirección positiva.

- Figura 5.2.1.1.** Voltamperogramas de una disolución 0.3 mM de $ABTS^{2-}$ obtenidos a diferentes velocidades de barrido utilizando un electrodo de carbón vítreo y una disolución 0.1 M de amortiguador de acetatos pH = 4.5 como electrolito soporte.
- Figura 5.2.2.1.** Esquema del mecanismo de reacción que se lleva a cabo en la superficie del electrodo entre $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$ y lignina.
- Figura 5.2.2.2** Voltamperogramas de una disolución 0.3 mM de $ABTS^{2-}$ en buffer de acetatos 100 mM a pH = 4.5 en presencia de pulpa de papel a) sin lignina y b) con $\kappa=40$.
- Figura 5.2.2.3.** Voltamperogramas de una disolución 0.3 mM de $ABTS^{2-}$ en una disolución 0.1 M de amortiguador de acetatos pH= 4.5 en presencia de pulpa de papel con un valor de número $\kappa=40$ y sus respectivas repeticiones.
- Figura 5.3.1** Espectros de absorción de una disolución 0.04 mM de $ABTS^{2-}$ y $ABTS^{\cdot-}$ en disolución 0.1 M de amortiguador de acetatos pH= 5.
- Figura. 5.3.2.** Representación gráfica de los datos experimentales del cambio de absorbancia a 340 nm con respecto a la concentración, empleando disoluciones de $ABTS^{2-}$ a diferentes concentraciones en disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 4. El ajuste lineal y los parámetros obtenidos (m , b y R^2) también se muestran en la figura.
- Figura 5.4.1.** Representación gráfica del cambio de absorbancia a $\lambda=728$ nm, para la determinación de la actividad de la enzima lacasa empleando una disolución 0.1 mM de $ABTS^{2-}$ en disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH = 4 y pH= 5.
- Figura 5.5.1.** Representación gráfica del cambio de absorbancia a $\lambda=728$ nm para la determinación de la actividad de la enzima lacasa inmovilizada en cristales de sílica gel, empleando una disolución 0.1 mM de $ABTS^{2-}$ en una disolución 0.1 M de amortiguador de acetatos pH= 4.
- Figura 5.6.1.** Efecto de diferentes cantidades de la mezcla de $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$ empleada como pretratamiento, asociado a un proceso organosolv, para la disminución del número κ de muestras de pulpa de papel.

- Figura 5.7.1** Espectros de absorción de una disolución 0.05 mM de $\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^{\cdot-}$ antes y después de 96 horas de contacto con enzima inmovilizada en cristales de sílica gel.
- Figura 5.8.1.1** Espectros de absorción de 2 mL de una disolución 0.025 mM de ABTS^{2-} en ácido clorhídrico 0.05 M obtenidos después de la adición de 10 alícuotas de 50 μL de una disolución 2.5 mM de peróxido de hidrógeno.
- Figura 5.8.2.1.** Espectros de absorción UV-Vis de una disolución 0.025 mM de ABTS^{2-} empleando una disolución 0.1 M de ácido clorhídrico, tras la adición de 10 alícuotas de 50 μL de peróxido de hidrógeno 2.5 Mm.
- Figura 5.8.2.2** Espectros de absorción de disoluciones 0.025 mM de ABTS^{2-} empleando disoluciones 0.05 M y 0.1 M de HCl con y sin H_2O_2 y su comparación con el espectro de absorción de ABTS^{2-} en una disolución 0.1 M de amortiguador de acetatos pH= 4.
- Figura 5.8.3.1.** Espectros de absorción UV-Vis de una disolución 0.025 mM de ABTS^{2-} empleando una disolución 0.05 M de H_2SO_4 obtenidos tras cada adición de 10 alícuotas de 50 μL de peróxido de hidrógeno 2.5 mM.
- Figura. 5.8.3.2** Espectros de absorción UV-Vis de 2 mL de una disolución 0.025 mM de ABTS^{2-} a diferentes tiempos, después de la adición de 1.25×10^{-3} mmoles de H_2O_2 .
- Figura 5.8.4.1** Espectros de absorción de 2 mL de una disolución 0.05 mM de ABTS^{2-} empleando una disolución 1 M de ácido acético, después de la adición de 0.5 mL de H_2O_2 2.5 mM.
- Figura 5.8.4.2** Evolución de la reacción de oxidación de una disolución 0.05 mM de ABTS^{2-} en ácido acético 1 M con 0.5 mL de peróxido de hidrógeno 2.5 mM observada por medio del trazo de las absorbancias a $\lambda = 336$ nm y $\lambda = 414$ nm.
- Figura 5.9.1** Efecto de la cantidad de $\text{ABTS}^{\cdot-}$ y ABTS^{2-} en la disminución del número kappa de pulpa de papel.
- Figura 5.9.1.1.** Espectros de absorción de las fases recuperadas después del proceso organosolv.

Figura 5.9.2.1. Espectro de absorción de una mezcla de $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$ antes y después de 19 horas de contacto con pulpa de papel.

Figura 5.10.1 Suministro de potencia, durante la fase de calentamiento y mantenimiento dentro del reactor y la integración de la curva correspondiente.

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.5.1 Algunas de las secuencias empleadas durante blanqueo de pulpa de papel. Donde C = Cloro, E = extracción, D = dióxido de cloro, H = hipoclorito, O = oxígeno, P = peróxido. Fuente: E.Sjostrom

Tabla 2.7.1. Precios de venta por gramo de $ABTS^{2-}$. Actualizados a enero del 2006.

Tabla 4.2.1. Propiedades físicas de reactivos utilizados

Tabla 5.6.1.1 Valores teóricos de la cantidad de $ABTS^{\cdot-}$ necesario para la disminución del número kappa.

Tabla 5.7.1. Concentración de $ABTS^{2-}$, $ABTS^{\cdot-}$ y $ABTS_{total}$ de una disolución antes y después de 96 horas de contacto con enzima inmovilizada en cristales de sílica.

Tabla 5.8.1.1 Registro de absorbancia a $\lambda=319$ nm y $\lambda=728$ nm tras la adición de H_2O_2 a 2 mL de una disolución 0.025 mM de $ABTS^{2-}$ en HCl 0.05 M.

Tabla 5.8.2.1 Registro de absorbancias a $\lambda=319$ nm y $\lambda=728$ nm, tras la adición de H_2O_2 a 2 mL de una disolución 0.025 mM de $ABTS^{2-}$ en HCl 0.1 M.

Tabla 5.8.3.1 Absorbancia a $\lambda=310$ nm y $\lambda=728$ nm y los incrementos que registra una disolución 0.025 mM de $ABTS^{2-}$ en H_2SO_4 0.05 mM después de la adición de 10 alícuotas de peróxido de hidrógeno, y 3.5 horas después.

Tabla 5.8.4.1 Absorbancia a $\lambda=336$ nm y $\lambda=728$ nm y los incrementos que registra una disolución 0.05 mM de $ABTS^{2-}$ en Ácido acético 1 M, 12 horas después de la adición de 0.5 mL de una disolución 2.5 mM de H_2O_2 .

Tabla 5.9.1. Cantidades de $ABTS^{\cdot-}$ y $ABTS^{2-}$ empleadas en cada tratamiento

Tabla 5.9.2.1. Valores de absorbancia y concentración de ABTS^{2-} , $\text{ABTS}^{\bullet-}$ y la concentración total, obtenidas a partir de los espectros de absorción mostrados en la figura 5.9.2.1.

Tabla 5.10.1. Inventario de materia prima e insumos y sus costos asociados a la obtención de celulosa por medio del proceso acoplado ABTS^{2-} - $\text{ABTS}^{\bullet-}$ /organosolv.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La demanda de celulosa y derivados de lignina ha cobrado gran importancia en los últimos años, tan solo hasta el año 2001, el consumo de celulosa en forma de papel alcanzó 200 a 300 kg *per cápita* en países industrializados, tal demanda es satisfecha gracias a la producción de países como Estados Unidos, Canadá y China, así como Brasil, Chile, Uruguay y Argentina. A pesar de que la producción de pulpa ha crecido aceleradamente en países como Indonesia y Sudáfrica, son pocos los países que pueden competir con los bajos costos de producción de Brasil. En México, carecemos de una industria de pulpa y papel propia, pues la mayor parte de la celulosa que se comercializa, se debe a la importación en forma de papel periódico reciclado proveniente de los Estados Unidos de Norteamérica [19].

Parte de la pulpa de papel disponible en el mercado, se obtiene durante los procesos de pulpeo, por medio del proceso organosolv, que consiste en la hidrólisis de la lignina en presencia de solventes orgánicos; principalmente alcoholes: como metanol, etanol y butanol, empleando altas temperaturas (160-200°C) [1]. A pesar de ser un proceso que presenta ventajas como: la fácil recuperación de subproductos, la reutilización de solventes empleados, bajas descargas de contaminantes en los efluentes y fácil blanqueo de la pulpa obtenida, no es muy utilizado a nivel industrial, debido a que es más fácil operar este proceso a pequeña escala, mientras que la demanda de celulosa obedece a escalas mucho

Introducción

mayores [2,3]. No obstante, la mayor parte de la celulosa que se encuentra en el mercado, se obtiene por un proceso alcalino conocido como kraft. La celulosa que se obtiene a partir de este proceso es de muy buena calidad, a pesar de esto, requiere de procesos de blanqueo posteriores. Estos procesos implican el uso de algunos agentes químicos como el cloro y el dióxido de cloro (ClO_2), que genera compuestos organoclorados tóxicos, liberados al ambiente en los efluentes. Como una medida para mejorar las condiciones del blanqueo, se han empleado otros agentes como: el ozono, peróxido de hidrógeno y el oxígeno. Sin embargo, los costos que implica el uso de agentes blanqueadores como éstos, encarecen un producto que debe ser de bajo costo [6].

Durante la década de 1980's comenzó el auge de la investigación de sistemas biológicos con capacidad para degradar la lignina, que es el polímero responsable de la coloración marrón de la madera y celulosa. El uso de hongos de podredumbre blanca, no mostró resultados muy alentadores para su uso a nivel industrial, pues la tasa de reacción del consumo de lignina por parte de los hongos es sumamente baja y está sujeta a condiciones de inocuidad y esterilidad difíciles de controlar. Sin embargo, se identificaron tres principales grupos de enzimas presentes en hongos como *P. Chrysosporium* y *T. versicolor* [4] que son responsables de la fragmentación de las estructuras de lignina y la formación de compuestos de bajo peso molecular a partir de ellas. Las enzimas identificadas se conocen como: Lignina peroxidasas, Manganese peroxidasas y Lacasas [5].

Las Lignino-peroxidasas (LiP) son glicoproteínas con un grupo hemo en su sitio activo. Poseen un peso molecular entre 38-43 kDa y catalizan la oxidación de compuestos

Introducción

fenólicos y no fenólicos, aminas y éteres aromáticos [6]. Por otra parte, las manganeso peroxidasas (MnP), también poseen un grupo hemo en su sitio activo [7], y se sabe que sólo catalizan la oxidación de las unidades fenólicas de la lignina [5].

Tanto la LiP como MnP son dependientes de la presencia de peróxido de hidrógeno para llevar a cabo la oxidación de lignina, lo que ha limitado su aplicación en sistemas de deslignificación, aunque los estudios con MnP y su posible aplicación en procesos de blanqueo continúan [8].

Las lacasas son glicoproteínas extracelulares, que catalizan la oxidación de compuestos aromáticos. Estas enzimas poseen cuatro átomos de cobre en su sitio activo que pueden ser de tres tipos: T1, T2, y T3 [9]. Los sitios T2 y T3 forman un conjunto de tres núcleos en el que el oxígeno molecular se reduce para formar agua, mientras que el sitio T1 oxida al sustrato reducido y transfiere los electrones a T2 y T3 [10]. Sin embargo, las lacasas no son capaces de llevar a cabo la deslignificación de pulpa de papel por si solas. No obstante, se sabe que empleando compuestos de bajo peso molecular, conocidos como mediadores redox, se puede llevar cabo la reacción [11,12]. Estos mediadores son directamente oxidados por la enzima y una vez oxidados, actúan sobre la lignina haciendo el papel de transportadores de electrones o mediadores, como lo indica su nombre. Este conjunto de elementos de los que forman parte la enzima, el mediador y el sustrato (lignina) se denomina comúnmente Sistema-Lacasa-Mediador (SLM) y entre los mediadores más empleados, se encuentra el ácido 2,2'-3-etil benzotiazolin-6-sulfónico (ABTS²⁻) [11,13,14, 15,16]. El Sistema-lacasa-Mediador funciona en disolución acuosa, así, el ABTS²⁻ accede al sitio activo de la enzima, se oxida y es capaz de oxidar a la lignina en un ciclo que se

Introducción

repite continuamente, siempre que la enzima esté presente en la disolución, para llevar a cabo la reoxidación del ABTS^{2-} [11].

El ABTS^{2-} se oxida en dos etapas, mediante la extracción de un electrón en cada una de ellas, en las que se forma el radical $\text{ABTS}^{\cdot-}$ y ABTS^0 respectivamente (figura 2.7.1), pero en presencia de la enzima lacasa, sólo se oxida hasta $\text{ABTS}^{\cdot-}$ [17]. La oxidación del ABTS^{2-} puede llevarse a cabo no sólo por el SLM, sino por distintos medios. Una de las premisas utilizadas en este trabajo, fue oxidar el ABTS^{2-} con peróxido de hidrógeno en medio ácido en ausencia de la enzima lacasa, empleando el resultado de esta reacción, durante la oxidación de lignina presente en pulpa de papel no blanqueada.

El presente trabajo propuso la oxidación de ABTS^{2-} , inicialmente con enzima inmovilizada, para facilitar la recuperación y reutilización de la misma. Posteriormente se realizó la oxidación de ABTS^{2-} con peróxido de hidrógeno, como una alternativa al uso de la enzima inmovilizada. El $\text{ABTS}^{\cdot-}$ obtenido con los métodos anteriores, se empleó como oxidante de la lignina a manera de un pretratamiento que permitiera mejorar el grado de deslignificación que se llevó a cabo por un proceso organosolv, a fin de disminuir los costos asociados a las condiciones en las que normalmente se lleva a cabo. El proceso organosolv, que se emplea comúnmente durante los procesos de pulpeo, se empleó en el presente trabajo como una alternativa aplicable a procesos de blanqueo.

Así, se realizó una evaluación del tiempo en el que se obtuvo el mayor grado de deslignificación por parte del proceso organosolv, expresado por medio del número kappa,

Introducción

que es una medida indirecta de la cantidad de materia susceptible a la oxidación, que permanece en pulpa de papel. Además, se realizó la evaluación de la deslignificación expresada como la disminución del número kappa en pulpa de papel no blanqueada, que fue tratada con ABTS^{•-} acoplado a un proceso organosolv, empleando butanol y una disolución 1 M de NaOH. De esta forma, el presente estudio pretendió disminuir el tiempo de reacción de lignina de pulpa de papel por medio un proceso organosolv, utilizando al mediador ABTS²⁻ para blanquear fibras de celulosa en tiempos de reacción más cortos en presencia de butanol.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 DEMANDA DE CELULOSA A NIVEL MUNDIAL

La industria productora de celulosa ha crecido considerablemente, sobre todo en países como Estados Unidos, Canadá y China, así como Brasil, Chile, Uruguay y Argentina. La razón de esto es el considerable incremento de la demanda mundial de celulosa que es empleada principalmente en la fabricación de cartón y papel de diversos tipos. Alrededor del mundo existen un gran número de empresas dedicadas a la producción de celulosa. Algunas compañías como Svenska Cellulosa Aktiebolaget, Arauco, Aracruz y Shell compiten por ofrecer los mejores precios de venta [18], mientras que Veracel, una productora de celulosa de origen brasileño, se vislumbra como la empresa que ofrece los costos más bajos que oscilan en 120 dólares la tonelada de celulosa, contra un precio de 320 dólares por tonelada que ofrece Estados Unidos y 400 en la península Escandinava, según información de *Agora Senior*, una correduría de Río de Janeiro [19]. Los costos de obtención de celulosa varían en un margen amplio, debido principalmente a los procesos de deslignificación que sigue la madera para la formación de pulpa de papel, y el proceso de blanqueo adicional requerido para la obtención de celulosa lista para la fabricación de papel. Por lo tanto, los costos están en función del estado deseado de las fibras para su comercialización y el uso que se les dará. Es decir, la celulosa requerida en la fabricación de papel periódico es considerablemente más económica que la empleada en la fabricación

de papel para oficina además de que en nuestro país, su importación está libre de aranceles [19].

2.2 FUENTES DE OBTENCIÓN DE CELULOSA

Las fibras de celulosa se obtienen de diversas fuentes vegetales como: el lino, el cáñamo y yute de las que se obtienen fibras llamadas liberinas o de corteza. Por otra parte, las fibras de tallo o herbáceas son aquéllas que provienen de fuentes como: la paja, el bambú, el bagazo de caña y rastrojo de maíz. Existen también las fibras de hoja, que provienen: del sisal, el henequén y la pita [20]. Sin embargo, todas estas fuentes de fibra tienen una desventaja en común, y es que poseen un porcentaje muy alto de tejido parenquimatoso y de almacenamiento de nutrientes, que son utilizadas por las plantas, pero disminuyen el porcentaje de pulpa disponible, a un 30 %, con respecto a los demás componentes estructurales de la planta, convirtiéndolas en fuentes poco recomendables de obtención de celulosa. Las fuentes que representan una mejor alternativa son algunas plantas pertenecientes al grupo de las angiospermas y gimnospermas. Las gimnospermas agrupan a los árboles coníferos y están representadas por el género *Pinus sp*, mientras que las angiospermas se ven representados por el género *Eucalyptus sp*, y agrupa a las plantas latifoliadas de semillas dicotiledóneas [20]. Existe un término técnico asignado a cada grupo, en donde se denomina como softwood o madera blanda, a aquélla que proviene de árboles coníferos; y hardwood, o madera dura a la que proviene de árboles latifoliados como el eucalipto [4]. La presencia y el porcentaje de componentes estructurales de la

madera varía de acuerdo al tipo de la misma, sin embargo existe una idea muy clara de que son tres los componentes que se presentan en todos los casos [6].

2.3 ESTRUCTURA DE LA MADERA

La madera está compuesta principalmente por: celulosa, hemicelulosa y lignina. Las tres se encuentran distribuidas en mayor o menor medida en todos los niveles que componen la pared celular: lámina media, pared celular primaria y paredes celulares secundarias S_1 , S_2 y S_3 . La figura 2.3.1 muestra un esquema de la pared celular vegetal y la dirección en la que se orientan las fibras de celulosa en cada una.

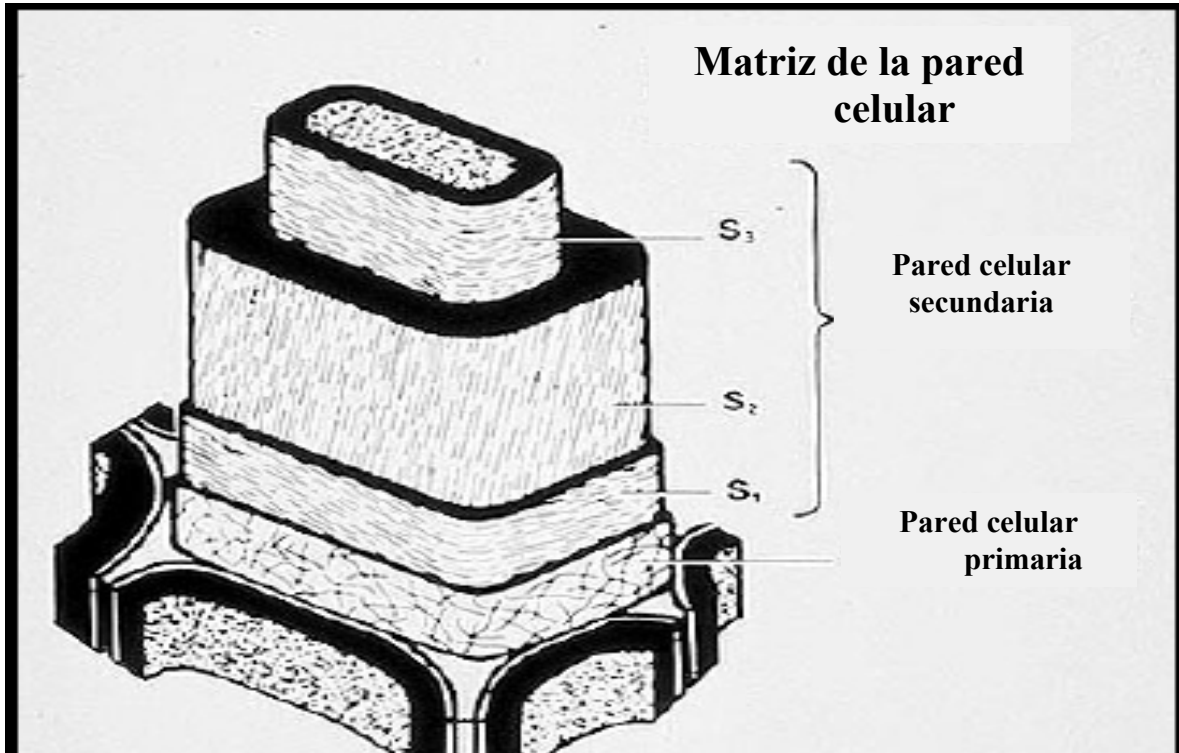


Figura 2.3.1 Esquema de la pared celular vegetal y orientación de las fibras de celulosa en cada nivel [53].

Antecedentes

La celulosa es el principal componente de la madera, pues alcanza hasta el 50 % de su peso total. Está formada por cadenas de β -D- glucopiranosas unidas por enlace glicosídico tipo β -(1,4), ordenadas en forma lineal, que al empaquetarse alterna zonas de arreglo cristalino y amorfo dando origen a microfibrillas y macrofibrillas, que componen la pared celular secundaria de las células vegetales [7]. La figura 2.3.2 muestra la estructura de la celulosa.

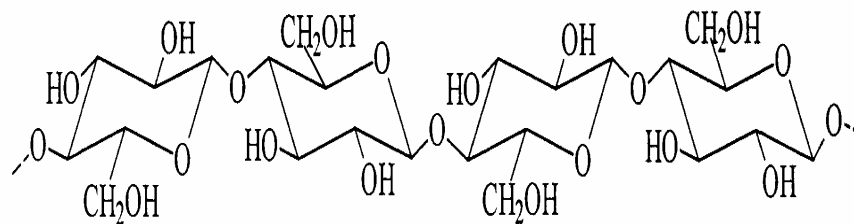


Figura 2.3.2. Estructura de la celulosa [54].

La hemicelulosa en cambio, es un polímero ramificado y amorfo formado principalmente por azúcares pentosas, cuya composición varía de acuerdo con la madera de origen. Las hemicelulosas de maderas frondosas de plantas latifoliadas angiospermas son abundantes en xilanos y glucomananos; mientras que las hemicelulosas de maderas de gimnospermas son abundantes principalmente en galactomananos y pectinas. La hemicelulosa se encuentra principalmente en la pared celular secundaria en los intersticios que forman los arreglos microfibrilares de la celulosa. Algunos de los productos que se obtienen por la degradación de hemicelulosas son los furfuralos, glicerol, sorbitol, xilitol, acetona y etanol [21].

La lignina por su parte, es un polímero que constituye el principal soporte estructural de las plantas ya que se halla principalmente en la lámina media de las células vegetales lo que le

permite funcionar como un adhesivo entre ellas. Además, se encuentra unida covalentemente a la hemicelulosa de la pared celular secundaria [7]. Es un polímero tridimensional formado mediante un proceso de polimerización deshidrogenativa a partir de tres monómeros cuya proporción es variable y característica de los distintos tipos de maderas. Los tres monómeros que constituyen el esqueleto de la lignina son: alcohol trans-coniferílico, alcohol trans-p-cumarílico y alcohol trans-sinapílico [22].

La figura 2.3.3 muestra la estructura de las tres unidades monoméricas constituyentes de la lignina.

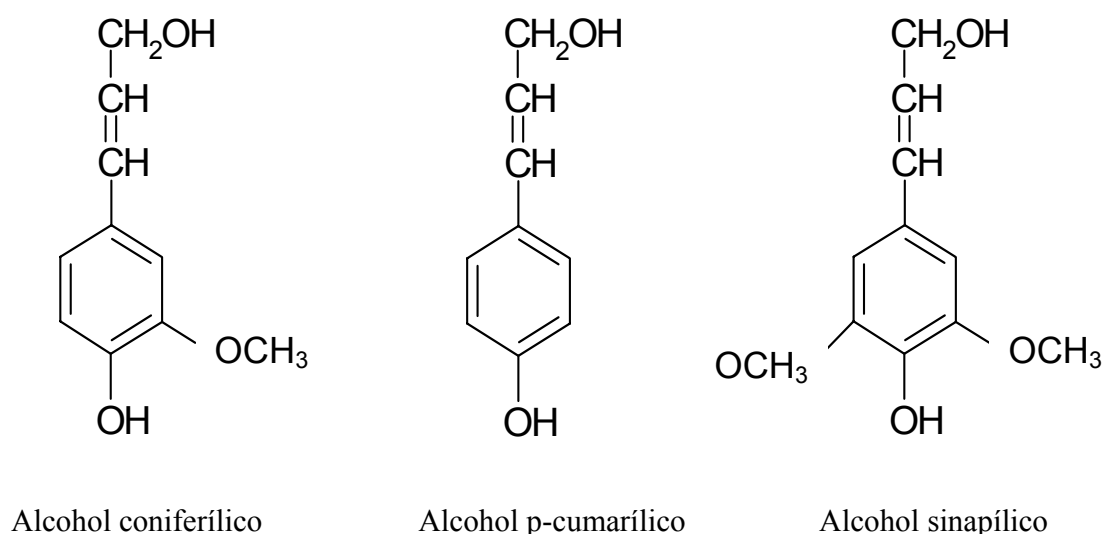


Figura 2.3.3 Estructura de los tres alcoholes constituyentes de la lignina.

La reacción de polimerización que se lleva a cabo, durante la formación de la lignina, da origen a una de las grandes controversias que giran alrededor de su estructura. Debido a que su síntesis es aleatoria, existen distintas propuestas de estructura de lignina, en función del tipo de madera. El modelo de lignina generalizado se muestra en la figura 2.3.4.

La estructura que se muestra en muchos textos es solo representativa, ya que la proporción en la que se presentan los tres alcoholes varía de acuerdo con la madera empleada. Así, la lignina que proviene de plantas gimnospermas como el pino posee más unidades condensadas entre sí que la lignina de angiospermas [20].

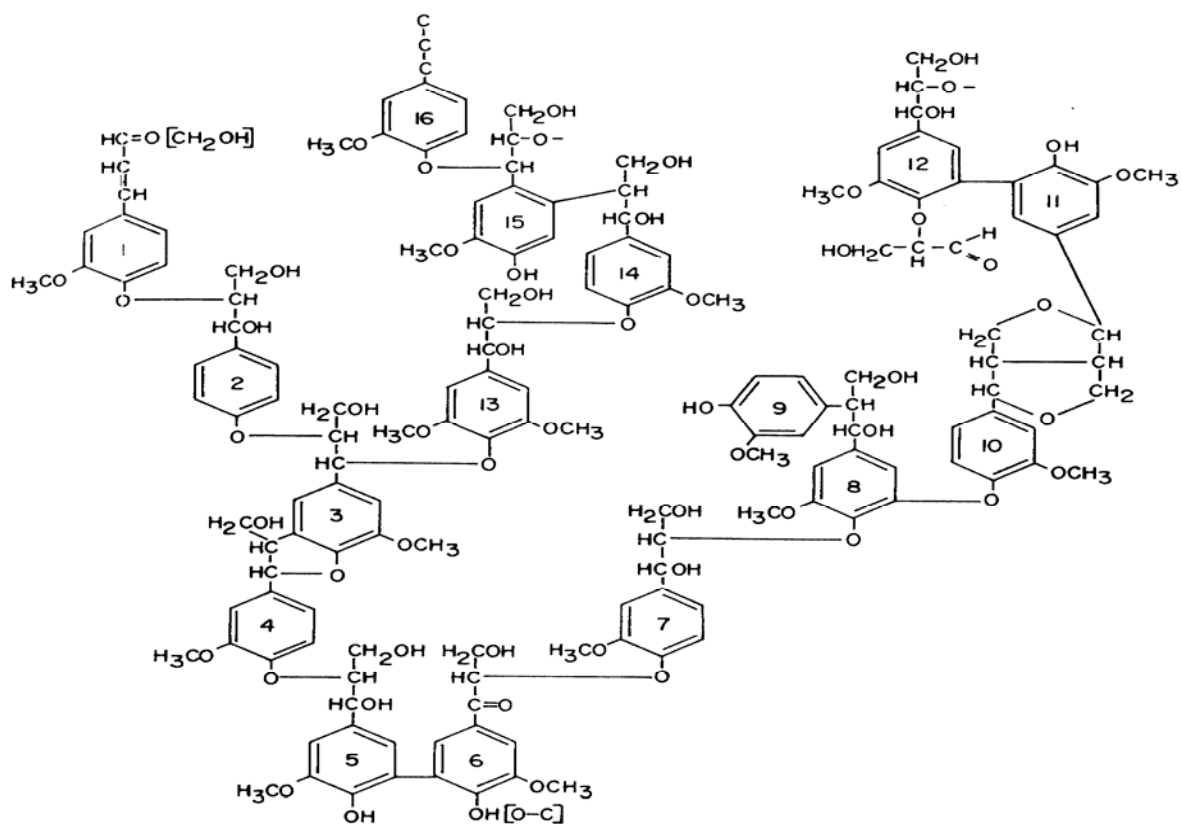


Figura 2.3.4. Estructura generalizada de lignina [20].

Estas unidades condensadas, que poseen enlaces en posición *orto* y *meta* entre anillos aromáticos, dificulta aún más la ruptura de las grandes estructuras de lignina, cuando se tiene como fin retirarlas durante algunos de los procesos de pulpeo, que se llevan a cabo, por ejemplo, durante la elaboración del papel. El mecanismo de reacción que sigue el

rompimiento de las estructuras de lignina durante los procesos de pulpeo, varía de acuerdo con las condiciones de reacción. Mientras que en las reacciones que se llevan a cabo en medio fuertemente ácido, prolifera el rompimiento de las uniones α -aril y arilglicerol- β -aril eter, en medio alcalino, se rompen principalmente los enlaces β -o-4 de las unidades fenólicas [20].

2.4 PROCESOS DE PULPEO Y DESLIGNIFICACIÓN

La transformación que sufre la madera durante la elaboración de papel comienza cuando se retira la corteza de los árboles, se les astilla y tamiza para homogeneizar el tamaño de partícula, para ser sometidos al pulpeo. Se define como pulpeo, al proceso o grupo de procesos que tienen como fin la separación de las fibras de celulosa, que se llevan a cabo bajo distintas condiciones, según el uso y destino que tendrán las fibras obtenidas [23]. La diversidad de estas condiciones dio origen a los distintos procesos industriales de pulpeo. Tales procesos se clasifican en dos grupos: procesos mecánicos y químicos. Los procesos mecánicos se definen como la transformación de la madera al estado fibroso por medios mecánicos, generalmente por trituración de las astillas o por el rasgado de las fibras. Son conocidos también, como procesos de alto rendimiento, debido a que la pérdida en peso de la pulpa es mínima o nula, pues la lignina y demás componentes nunca se eliminan de las fibras [20]. Los procesos químicos involucran el cocimiento de la madera, en presencia de cualquier agente químico capaz de remover eficientemente la lignina y otros componentes de la madera. Estos procesos permiten aislar selectivamente las fibras de celulosa, que son de mayor longitud que en los procesos mecánicos, además de obtener la eliminación

efectiva del 90 % del resto de los componentes presentes en la madera. Una variante de los procesos químicos son los denominados semiquímicos, que es el ablandamiento inicial de la madera empleando agentes químicos seguidos de un tratamiento mecánico [18]. Es importante hacer notar que, además de las diferencias antes mencionadas, la esencia de los procesos químicos es que buscan la separación de las fibras de celulosa por medio de la eliminación total de la lignina que las une, mientras que en los procesos mecánicos no es necesario eliminarla, por el contrario debe mantenerse en su sitio. Cada proceso persigue objetivos distintos en función de las características deseadas del producto, de tal forma que los más empleados en la elaboración de papel son los procesos químicos. La figura 2.4.1 muestra un diagrama global de la elaboración de papel.

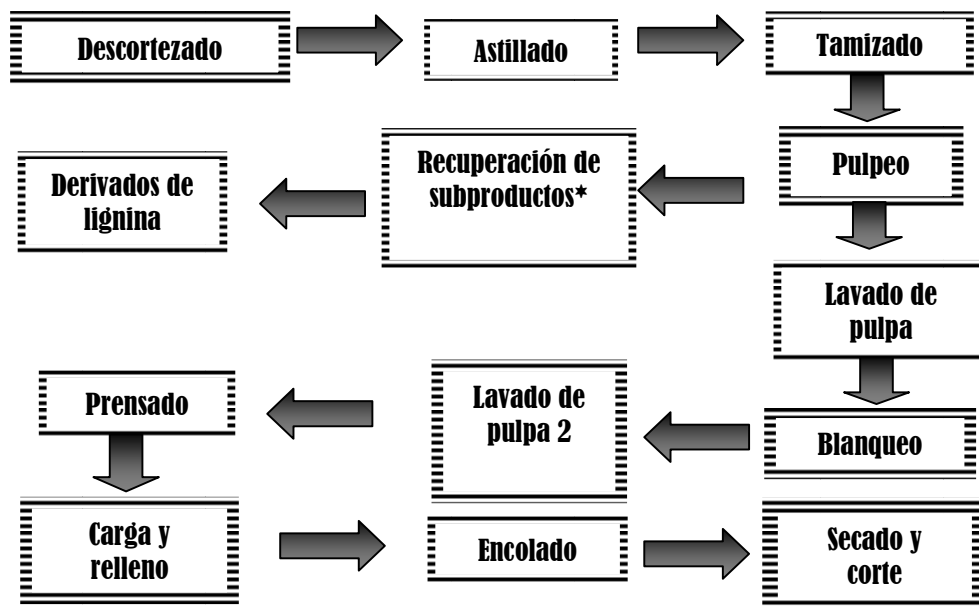


Figura 2.4.1 Diagrama del proceso global de elaboración de papel. La recuperación de subproductos está sujeta al tipo de pulpeo realizado.

Durante el pulpeo químico, se introducen grandes cantidades de astillas de madera en reactores de acero inoxidable, dentro de los cuales se lleva a cabo su digestión bajo condiciones de reacción variables. La gran diversidad de estas condiciones, da origen a varios tipos de procesos químicos, que difieren inicialmente en la naturaleza del agente químico empleado. De la diversidad de procesos existentes sobresalen dos principales, que son el proceso kraft y el organosolv [24].

2.4.1 Proceso kraft

Actualmente, es el proceso de pulpeo químico más empleado industrialmente. Sus bondades, se hallan en la integración global del proceso; desde los desechos del descortezado de la madera, que pueden ser empleados como combustible en la generación de vapor en procesos a gran escala [23,25], hasta la recuperación del álcali empleado durante la reacción por medio de la caustificación de las lejías negras. Durante la digestión de las astillas, que se lleva a cabo a 160 ° C, dentro de reactores de acero inoxidable, se utiliza sulfuro de sodio e hidróxido de sodio como agentes de deslignificación, en una disolución conocida como lejía blanca [23]. Durante la digestión, se lleva a cabo la eliminación de la lignina, por medio del rompimiento de los enlaces β -o-4, que une a los anillos aromáticos y logra romper algunas de las unidades condensadas de lignina, que son de difícil degradación. Al término del proceso, se obtiene como producto una pulpa de papel con fibras de celulosa larga y resistente, que se debe retirar y lavar para eliminar residuos de la mezcla de reacción resultante, denominada lejía negra. Por medio del calentamiento y caustificación de la lejía negra, es posible recuperar los reactivos de la lejía

blanca o bien, recuperar los productos de degradación de lignina y hemicelulosa como fenoles, vainillina, sorbitol y furfurales [21]. Así mismo, la pulpa obtenida, debe pasar por un proceso de blanqueo para su utilización en la elaboración de papel. La figura 2.4.1.1 muestra un diagrama general del proceso kraft y la recuperación de reactivos.

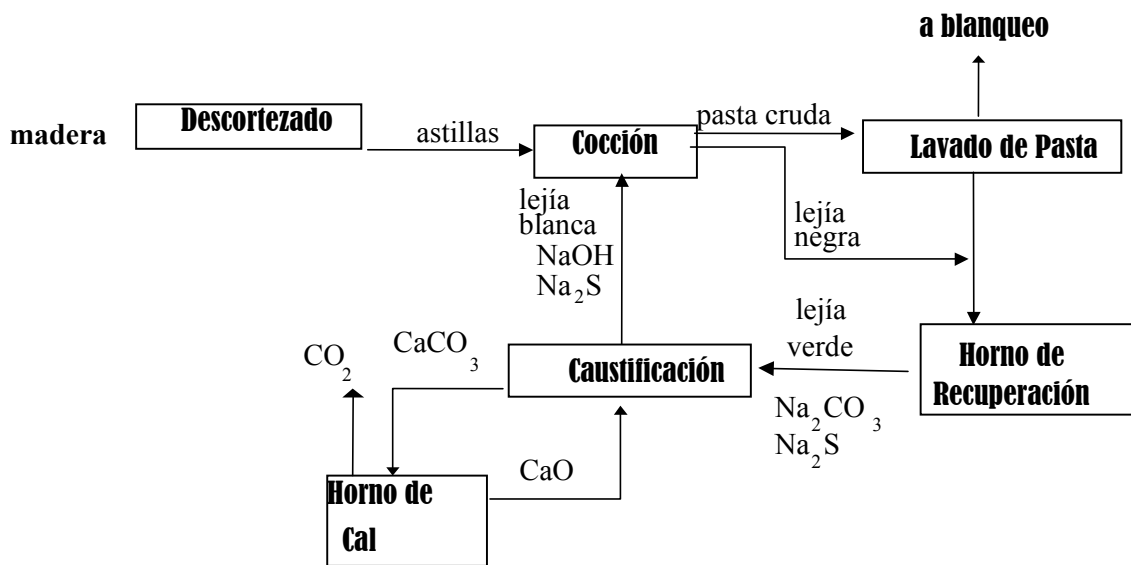


Figura 2.4.1.1 Diagrama general del proceso kraft [20]

Sin embargo, a pesar de las ventajas antes mencionadas, el proceso kraft posee el inconveniente de proveer pulpa de papel demasiado oscura, debido a la adsorción que presenta, por el contacto continuo de la misma, con los licores negros durante la cocción dentro del reactor. Además, la capacidad requerida de la planta, así como las múltiples etapas del proceso, requieren instalaciones complejas y sumamente costosas. Un ejemplo representativo es la planta CELGUA (Celulosa de Guatemala) construida en el año 1982 con fondos privados y que requirió una inversión de 119 millones de dólares, para una capacidad instalada de 250 mil toneladas de pulpa de celulosa al año, capacidad que hoy en

día resulta mínima, a comparación de las modernas plantas de Brasil, con capacidad de un millón de toneladas de pulpa de celulosa al año. Esta limitante orilló a empresarios a buscar otras alternativas de pulpeo químico que les permitieran satisfacer la demanda existente de pulpa de papel, con menor inversión fija [20].

2.4.2. Proceso organosolv

El proceso organosolv, es un procedimiento de pulpeo que consiste en la hidrólisis de la lignina presente en pulpa de papel, utilizando solventes orgánicos, principalmente alcoholes: como metanol, etanol y butanol, y empleando altas temperaturas (160-200°C) [1]. Al igual que el proceso kraft, se lleva a cabo dentro de reactores de acero inoxidable, debido a las condiciones de reacción y a las presiones que se generan dentro del reactor.

Inicialmente fue propuesto como una alternativa al proceso kraft [26] por una tendencia al alza de la “economía de escala”, pero fue descartado poco tiempo después, por no presentar aptitudes para ser considerado un proceso industrial. La investigación con respecto a la aplicación del proceso organosolv en el pulpeo de la madera, fue retomada en fechas recientes, pues se encontró que posee características que le dan ventajas sobre el proceso kraft; entre las que se encuentran: la obtención de celulosa de fácil blanqueo, la formación de productos derivados de lignina de alto valor agregado y menores costos de inversión por concepto de instalaciones adecuadas al proceso [21]. Las instalaciones que requiere una planta productora de celulosa kraft, implica inversiones más altas que las necesarias para un proceso organosolv, debido a que el proceso de recuperación demanda un mayor número de

Antecedentes

operaciones unitarias. Así, una planta con instalaciones convenientes requiere producir grandes volúmenes de pulpa para ofrecer precios competitivos y disminuir el tiempo de recuperación de la inversión, mientras que el proceso organosolv demanda instalaciones con menor complejidad y como consecuencia, requiere una menor inversión, además de que las instalaciones empleadas en el proceso kraft, pueden adecuarse a las condiciones que requiere el proceso organosolv [27]

La variedad de las condiciones de operación del proceso organosolv, y especialmente el tipo de disolvente que se emplea, da origen a algunos de los procesos derivados, que son:

- ALCELL, organocell y ASAM. Emplean alcoholes, principalmente metanol o etanol como disolventes y la catálisis se puede realizar en medio ácido (ALCELL) [28] o medio alcalino (organocell) [29].

- MILOX. Emplea ácido fórmico y peróxido de hidrógeno en disolución acuosa y alcoholes [26].

Holtzapple *et al.*, 1984 estudió el efecto del butanol como solvente de catálisis, y observó que las mejores condiciones de deslignificación se encuentran en medio alcalino (pH= 14) y temperaturas entre 160 °C y 190 °C.

Las condiciones de operación de cada proceso definen también la clase de productos que se obtienen de él, modificando la composición del licor negro obtenido. Los compuestos

Antecedentes

que se encuentran con más frecuencia en los licores recuperados de un proceso organosolv, presentan grupos aromáticos, grupos carboxilos y grupos fenólicos con sustituyentes hidroxilos, entre otros. Dentro del reactor, se presentan fenómenos de condensación de los anillos aromáticos de la lignina, asociación estereoregular, interacciones hidrofóbicas y uniones por transferencia de carga [30]. Estos fenómenos de condensación, se presentan no sólo en la lignina que está en la fase líquida, sino en la que se encuentra aún enlazada a la celulosa, por lo que el contacto prolongado con la mezcla de reacción favorece la reasociación de la lignina disuelta con la lignina residual en la celulosa [29]. La figura 2.4.2.1 muestra un esquema global del pulpeo de madera empleando el proceso organosolv.

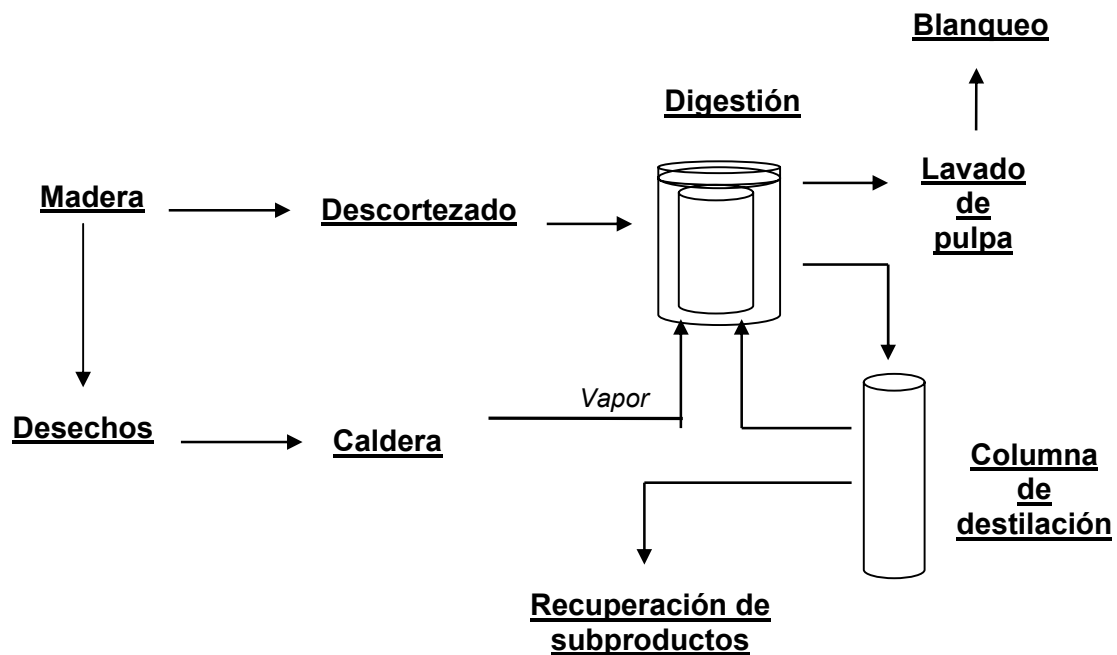


Figura 2.4.2.1. Esquema global del pulpeo de madera por medio del proceso organosolv

Antecedentes

Las modernas plantas productoras de celulosa, poseen capacidad para producir 1000,000.00 ton/año de pulpa de papel. Para satisfacer la necesidad de energía destinada al calentamiento, se emplea vapor generado en grandes calderas instaladas en la misma planta [23]. Las calderas utilizadas en la industria papelera son generadoras de vapor meramente incidentales pues su principal uso, es como unidades de recuperación química. Las nuevas políticas ambientales y económicas a nivel mundial, sugieren el uso integrado de los recursos, por lo que el uso de estas calderas es sumamente oportuno para las compañías papeleras que llevan a cabo el proceso completo de elaboración de papel, desde el talado de los árboles, pues para la generación del vapor, pueden utilizarse distintos combustibles que provienen incluso de la materia prima que emplean. La generación de vapor en un horno de recuperación de una fábrica se encuentra entre 4,500 a 6,000 Kg/ ton de pulpa de papel. El vapor que se genera es el necesario para el proceso de pulpeo, que se lleva a cabo entre los 140 °C y los 170 °C [23].

Sin embargo, las fibras de celulosa obtenidas, sin importar de qué proceso de deslignificación provengan, poseen siempre una cantidad de lignina residual que confiere a la pulpa un color marrón debido a la presencia de grupos cromóforos de la lignina. Ésta lignina residual, debe ser eliminada total o parcialmente para su uso en la fabricación de papel. Los procesos posteriores al pulpeo, que contribuyen a la eliminación esta lignina, se denominan procesos de blanqueo [23].

2.5 PROCESOS DE BLANQUEO

Los procesos de blanqueo se encargan de remover la lignina que se encuentra unida a las fibras de celulosa y que no es posible eliminar durante el pulpeo. El blanqueo con remoción de lignina, se aplica únicamente a pulpas químicas debido al bajo contenido de lignina que presentan, ya que las pulpas mecánicas de alto rendimiento emplean blanqueo con preservación de lignina, aunque presenta el inconveniente de la reversión del color marrón característico de la lignina. El blanqueo de pulpa se realiza por reacción de la lignina con agentes oxidantes como el cloro y algunos de sus derivados, oxígeno, peróxido y ozono; o bien con agentes reductores como hidrosulfito de sodio, bisulfito de sodio, borohidruro de sodio y tiosulfato de sodio aunque los agentes oxidantes son los más empleados [20].

Los agentes blanqueadores de pulpa de papel de primera generación empleaban cloro elemental o hipoclorito de sodio que es capaz de reaccionar con lignina por adición de cloro a los dobles enlaces en la cadena alifática o por sustitución aromática, con una relación estequiométrica de tres moles de cloro por unidad de fenil-propano.

El uso de estos agentes químicos, además de los inconvenientes técnicos que presenta bajo ciertas condiciones como es la reversión del color de las fibras, representan también un gran problema de salud, pues durante las reacciones de sustitución se generan compuestos organoclorados en los efluentes, principalmente en la fracción de bajo peso molecular. Algunos de estos compuestos como el 2,3,7,8 tetracloro-*p*-dibenzodioxina (2,3,7,8 TCDD) se encuentran listados en el grupo carcinogénico I de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) por sus siglas en inglés y mucho se sabe ya de los

daños causados por este, como es el caso de su acumulación en el organismo. Debido a esto en los últimos años se han buscado nuevas estrategias de blanqueo que permitan facilitar el control de procesos y disminuir costos, así como prevenir los posibles daños a la salud [31].

Algunas industrias adoptaron la tecnología “libre de cloro elemental” (elemental chlorine-free por sus siglas en inglés ECF) que consiste en la adición de dióxido de cloro y que representa a la segunda generación de agentes blanqueadores. No obstante, la tecnología ECF presenta algunos de los mismos problemas que su predecesora. La tercera generación de agentes de blanqueo se conocen como tecnología “totalmente libre de cloro” (total chlorine-free por sus siglas en inglés TCF) que emplea peróxido, oxígeno u ozono [13,24]. Esta tecnología ha sido adoptada por un gran número de empresas a nivel mundial, entre las que se encuentra CMPC y Arauco, ambas originarias de Chile [18]. Sin embargo, a pesar de las grandes ventajas que representa el proceso TCF en cuestión de eficiencia de blanqueo, (una disminución cercana al 90% de la lignina residual) así como la menor liberación de compuestos organoclorados a los efluentes, resulta ser una tecnología sumamente cara e impráctica pues se requieren secuencias de blanqueo y extracción combinadas en las que se emplean cada una de las tecnologías en diferentes etapas [32].

La tabla 2.5.1 muestra algunas de las secuencias de blanqueo empleadas industrialmente y las condiciones bajo las que se llevan a cabo.

Secuencia	Etapa	Reactivos
A	C	Cl ₂
	E	NaOH
	H	NaOCl
	D	ClO ₂
	E	NaOH
	O	ClO ₂
B	O	O ₂ +NaOH
	D ₄₀ C ₆₀	ClO ₂ , Cl ₂
	E0	NaOH+H ₂ O ₂
	D	ClO ₂
	E+P	NaOH+H ₂ O ₂
	D	ClO ₂
C	O	O ₂ +NaOH
	X	EDTA
	E+P	NaOH+ H ₂ O ₂
	D	ClO ₂
	E+P	NaOH+H ₂ O ₂
	D	ClO ₂

Tabla 2.5.1 Algunas de las secuencias empleadas durante blanqueo de pulpa de papel. Donde C = Cloro, E = extracción, D = dióxido de cloro, H = hipoclorito, O = oxígeno, P = peróxido. Fuente: E.Sjostrom [20]

2.5.1 Variables de control del proceso de blanqueo

Son cuatro las principales variables que se controlan durante los procesos de pulpeo y blanqueo. Tales variables son el brillo, la viscosidad, la lignina Klason y el número kappa.

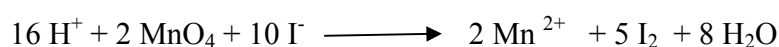
El brillo es una característica de la pulpa de papel sumamente difícil de manejar, pues el valor de compra de las fibras de celulosa obtenidas después de un proceso de blanqueo depende en gran medida de esta variable y cobra gran importancia durante la elaboración del papel. El uso de peróxido de hidrógeno ha sido difundido y planteado como una alternativa de uso industrial, pero vuelve a oscurecer las fibras después de un tiempo, a este fenómeno se le conoce como reversión del color [33]. Por su parte la viscosidad es una medida de la resistencia y el tamaño de las fibras y dicta el tipo de productos que serán elaborados a partir de ellas [33], es relevante después de los procesos de pulpeo. Por otra

Antecedentes

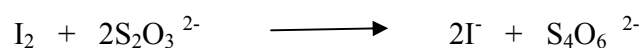
parte, la lignina Klason es un procedimiento que se basa en el contacto de la pulpa con disoluciones de ácido sulfúrico al 72 % y proporciona determinaciones cuantitativas de la cantidad de lignina real que permanece en pulpa [23]. Sin embargo, al ser un método tan selectivo, no es útil como variable de control, pues algunos de los componentes que proporcionan la coloración marrón característica de la madera, no son lignina, sino ácidos hexeurónicos para los que Klason no es un método sensible [28].

No obstante, el número kappa es la variable en función de la cual se han comparado los resultados de muchos trabajos de investigación [11,12,16] y se emplea regularmente como control de proceso durante la elaboración de pulpa de papel ya que no es selectivo a ningún componente como el método Klason. El número kappa se define como “El número de centímetros cúbicos consumidos de una solución de permanganato de potasio 0.1 N por un gramo de pulpa libre de humedad” [22]. Esta determinación se lleva a cabo empleando una útil valoración volumétrica por retroceso con KMnO_4 0.1 N y KI utilizando una solución 0.2 N de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) como agente reductor, donde los moles de permanganato que se valoran, son aquellos que no reaccionaron con la lignina de pulpa.

Es un método que nos permite conocer de manera indirecta, la cantidad de materia oxidable presente aún entre las fibras de la pulpa. El fundamento de esta determinación es la reacción que lleva a cabo el KMnO_4 con KI en medio ácido:



En donde se obtiene yodo como uno de los productos, el yodo reacciona con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ formando el ión tetrionato y yoduro:



Cerca del punto de equivalencia de la reacción, se utiliza una disolución de almidón soluble como indicador del punto final de la titulación. De esta forma, es posible relacionar directamente el consumo de tiosulfato con la cantidad de lignina presente en la pulpa, considerando que esta será equivalente a la diferencia entre el total de permanganato adicionado y el que se determina mediante la prueba. Por lo tanto, es posible estimar el número kappa resultante, solo conociendo las relaciones estequiométricas correspondientes, que indican que por cada 2 moles de ión manganato (MnO_4^-) se requieren 10 moles de tiosulfato [55].

2.6 ALTERNATIVAS DE BLANQUEO

Las tecnologías que han surgido como alternativas al uso de hipoclorito son muy diversas, desde sistemas químicos muy sencillos, hasta el uso de complejos sistemas de múltiples etapas que involucran procesos mecánicos acoplados que, sin embargo, no representan una mejora considerable en la blancura de la pulpa, y si un incremento en la inversión energética [13]. Por esta razón, gran parte de la investigación comenzó a dirigirse hacia sistemas biológicos, pues ofrecían una amplia gama de posibilidades.

2.6.1 Agentes biológicos

A mediados de la década de los 1980's comenzó a difundirse ampliamente el uso de microorganismos; principalmente hongos de podredumbre blanca, como auxiliares en los procesos de pulpeo. Los organismos usados para estos fines debían demostrar que poseían características útiles en la degradación de lignina. A esta práctica se le conoce como biopulpeo. Los estudios de biopulpeo se enfocan principalmente en la secuencia de pasos necesarios para la deslignificación de madera que procede, generalmente, de procesos mecánicos de pulpeo [34], por lo que la pulpa que se obtiene, no se utiliza en la elaboración de papel, debido a que las pulpas de origen mecánico no son recomendables para tal fin. Otros inconvenientes que presenta el biopulpeo son: la baja velocidad de consumo de lignina de los organismos empleados, en su mayoría hongos; y el mantenimiento de las condiciones necesarias para su crecimiento [35]. Estas dificultades hacen que el biopulpeo no se considere una opción seria de deslignificación a nivel industrial, sin embargo, estableció los antecedentes para el uso de sistemas biológicos en el blanqueo [20].

Han sido muchos los esfuerzos por utilizar a los hongos con capacidad ligninolítica, (particularmente del género *Trametes*) no sólo en el mejoramiento del blanqueo, sino en la decoloración de efluentes de la industria textil. Así, la búsqueda del mejoramiento de procesos ya conocidos, como la construcción de reactores de lote secuenciado, en las que el hongo es el principal producto, resultaron ser ineficientes debido principalmente a las bajas tasas de reacción [36].

2.6.2 Sistemas enzimáticos

Algunas enzimas, como las xilanasas y mananasas se emplearon en los sistemas de degradación de lignina con pocos resultados. La razón de que estas enzimas tengan un pobre efecto de blanqueo, se debe probablemente a impedimentos estéricos, ya que el tamaño de las enzimas dificulta su acceso a sitios en los que las fibras se encuentran muy unidas entre si [37].

Mas tarde, el uso de extractos enzimáticos obtenidos de los hongos de podredumbre blanca empleados en el bpolpeo [36] y, posteriormente, el uso de manera independiente, de las enzimas responsables de la fragmentación de las estructuras de lignina y la formación de compuestos de bajo peso molecular a partir de ellas, volvió aún más intensiva la investigación en este campo. Se identificaron tres principales grupos de enzimas presentes en hongos como *P. Chrysosporium* y *T. versicolor* [4, 11]: Lignina peroxidasas, Manganeso peroxidasas y Lacasas [5].

La presencia y actividad de estas enzimas, no está garantizada en todos los hongos de podredumbre blanca, y dependen en gran parte, de las condiciones de cultivo, además de que son inestables y dependientes de peróxido, en el caso particular de LiP y MnP. Así, la enzima que ha sido objeto de estudio con mayor insistencia es sin duda la lacasa.

2.6.2.1 Lacasa

La lacasa (difenoil: dioxígeno oxidoreductasa) es miembro del grupo de enzimas oxidasas multicobre y se encuentra emparentada con la nitrito reductasa y las enzimas tipo seroluplasmina; todas éstas forman parte de las proteínas azules multicobre [38]. Posee cuatro átomos de cobre en su sitio activo que pueden ser de tres tipos: T1, T2, y T3 [9] y son capaces de oxidar compuestos fenólicos, gracias a la transferencia de electrones entre ellos. Los sitios T2 y T3 forman un conjunto de tres núcleos en el que el oxígeno molecular se reduce para formar agua, mientras que el sitio T1 oxida al sustrato reducido y transfiere los electrones a T2 y T3 [10]. La figura 2.6.2.1.1 muestra el mecanismo de reacción que se lleva a cabo en el sitio activo de la enzima por parte de los sitios de cobre.

De acuerdo con el mecanismo de reacción propuesto, es posible llevar a cabo la oxidación de distintos compuestos en solución, solo en presencia de suficiente oxígeno disuelto. Sin embargo, cuando se implementó su uso en procesos de blanqueo, fueron poco alentadores los resultados, pues en numerosos textos científicos se cita la escasa acción de la lacasa por sí sola frente a la compleja estructura de lignina y demás compuestos presentes en las fibras [12]. Así, las lacasas, son incapaces de llevar a cabo la deslignificación de pulpa de papel por sí solas. No obstante, el uso de compuestos de bajo peso molecular, conocidos como mediadores redox, facilitan la reacción [11,12].

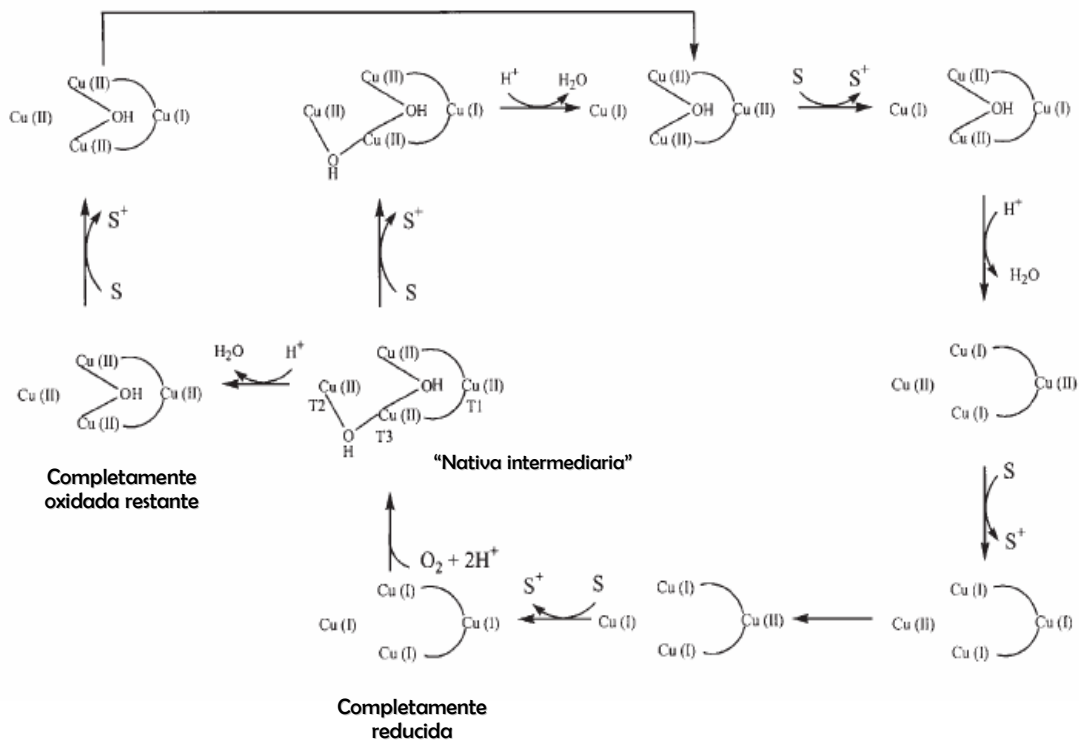


Figura 2.6.2.1.1 Mecanismo de reacción propuesto de la reducción de oxígeno molecular a agua por transferencia de 4 electrones en el sitio activo de la enzima lacasa de *Rhus vernicifera* [14].

Estos mediadores son oxidados por la enzima, y una vez oxidados, actúan sobre la lignina haciendo el papel de transportadores de electrones o mediadores, como lo indica su nombre. El conjunto de elementos formados por la enzima, el mediador y el sustrato (lignina) se conoce comúnmente como Sistema-Lacasa-Mediador (SLM) [11,12,16].

2.6.2.2 Sistemas Lacasa-mediador

La amplia gama de sustratos de las lacasas puede extenderse a algunos compuestos no fenólicos, de tal manera que unos cuantos de ellos funcionan no solo como sustratos, sino como acarreadores de electrones que oxidan a otros sustratos a costa de la reducción del sitio activo de la enzima. Estos compuestos son conocidos como mediadores redox. El Sistema-Lacasa-Mediador funciona en disolución acuosa, así, el mediador accede al sitio activo de la enzima, se oxida y es capaz de oxidar a la lignina en un ciclo que se repite continuamente, siempre que la enzima esté presente en la disolución, para llevar a cabo la reoxidación del mediador. La figura 2.6.2.2.1 muestra un esquema general del Sistema Lacasa-Mediador.

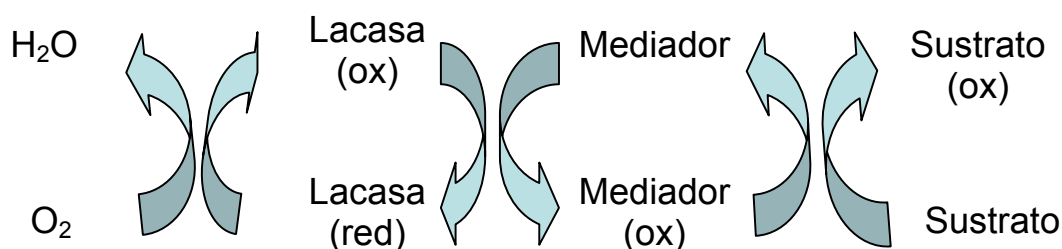


Figura 2.6.2.2.1. Esquema general del Sistema Lacasa- mediador [14].

Entre los mediadores redox de lacasas descritos se encuentran principalmente: 2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-1-yloxy (TEMPO) [39] y el 1- hidroxibenzotriazol (HBT)[25]. Pero sin duda, el que ha llamado más la atención de un gran número de investigadores es el ácido 2,2'-3-etil benzotiazolin-6-sulfónico conocido como ABTS²⁻ [11,12,16,41] que se describe a continuación.

2.7 Mediador ABTS²⁻

Las propiedades espectroscópicas del ABTS²⁻ han sido explotadas en los últimos años tras su uso en la elaboración de pruebas colorimétricas para la determinación de agentes oxidantes en alimentos y bebidas, de la misma forma, que se emplea en la industria farmacéutica. [42]. El ABTS²⁻ es un agente químico con características reductoras que puede oxidarse en dos etapas. Durante la primera etapa de oxidación (ABTS²⁻/ABTS^{•-}), cambia de incoloro a verde azulado, color característico que le confiere propiedades cromóforas y lo hacen tan útil en estudios cinéticos de oxidación [11,12,16,43]. Durante la segunda oxidación (ABTS^{•-}/ABTS⁰), pierde el color azul, aunque no existe un consenso en el color que adquiere, mientras algunos autores sugieren que su color es púrpura [16], otros señalan que posee un color café- rojizo y puede ser separado de disoluciones acuosas en forma de un precipitado [43].

El ABTS²⁻ disponible comercialmente está en forma de sal de amonio (NH₄)₂-ABTS por lo que en disolución a pH = 4-5, se encuentra ionizado (ABTS²⁻). A valores de pH cercanos a 2 se encuentra su pKa = 2.2, cuya constante de ionización ácida es Ka = 6.309 X 10⁻³ por lo que se le puede encontrar como un ácido débil (HABTS⁻). Cuando el pH baja hasta un valor cercano a 1, se encuentra completamente protonado (H₂ABTS) [44]. Además, tanto el ABTS²⁻ como HABTS⁻ y H₂ABTS se encuentran en equilibrio redox con sus especies oxidadas. Distintos autores identifican a la especie dianión (ABTS²⁻) como ABTS [14,15,45,51,46,43,47], al radical ABTS^{•-} como ABTS^{•+}, así como al ABTS⁰ se le conoce como ABTS²⁺, ignorando la carga formal que presenta cada una. A distintos valores de pH,

Antecedentes

éstas cargas formales se modifican por efectos de protonación. La figura 2.7.1 muestra la estructura del ABTS^{2-} y sus diferentes estados de oxidación, así como las condiciones en las que se presenta el equilibrio ácido-base entre las distintas especies químicas, así como la nomenclatura con la que se nombra cada una, a lo largo del presente trabajo.

En ciertos trabajos, se citan las longitudes de onda en los que el ABTS^{2-} presenta máximos de absorción en el espectro UV-Vis. La longitud de onda correspondiente a ABTS^{2-} es $\lambda = 340 \text{ nm}$ con un coeficiente de extinción molar $\epsilon_{340\text{nm}} = 3.66 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [45]. Por su parte, otros autores propusieron una longitud de onda adicional $\lambda = 214 \text{ nm}$ [17].

El $\text{ABTS}^{\cdot-}$ por su parte, es un radical que resulta de la primera etapa de oxidación del di anión (ABTS^{2-}). Posee un potencial de media onda correspondiente a la reacción de oxidación $\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^{\cdot-}$ $E_{1/2} = 0.469 \text{ V/Ag-AgCl}$ a $\text{pH} = 5$ [16, 17] y tiene máximos de absorción en el espectro visible a $\lambda = 417 \text{ nm}$, $\lambda = 645 \text{ nm}$, $\lambda = 728 \text{ nm}$ [17] y $\lambda = 810 \text{ nm}$ [43]. Existe una contradicción con respecto a las longitudes de onda a las que debe detectarse su presencia, pues algunos autores sugieren que la más adecuada se encuentra en $\lambda = 417 \text{ nm}$, mientras que otros autores indican que es a 414 nm a un valor de $\text{pH} = 6$ y, que su coeficiente de extinción molar (ϵ), que se encuentra en un intervalo de $3.15 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $3.6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [45]. Por otra parte, Sigma[®], la empresa que se encarga de producir y distribuir comercialmente el reactivo, establece que la longitud de onda a la cual se detecta la presencia del $\text{ABTS}^{\cdot-}$ es a $\lambda = 420 \text{ nm}$, en la metodología recomendada para determinar la actividad de enzimas oxidasas utilizando ABTS^{2-} como cromóforo [42].

Antecedentes

Otros autores, recomiendan las longitudes de onda $\lambda = 645 \text{ nm}$ y $\lambda = 728 \text{ nm}$ para una efectiva determinación cuantitativa de $\text{ABTS}^{\bullet-}$, pues a longitudes de onda menores ($\lambda = 397 \text{ nm}$ y $\lambda = 414 \text{ nm}$) se presenta un problema de estimación de la presencia de $\text{ABTS}^{\bullet-}$ [17]. Este problema se debe a la presencia de ABTS^{2-} en la mezcla y la formación de un complejo entre ambas especies que da como consecuencia una estimación menor de $\text{ABTS}^{\bullet-}$ que la real [47]. Durante la oxidación de ABTS^{2-} por métodos enzimáticos, solo es posible identificar la presencia de $\text{ABTS}^{\bullet-}$, debido a que no hay formación de la especie ABTS^0 [17].

La especie neutra ABTS^0 , que resulta de la segunda oxidación de ABTS^{2-} presenta un potencial de media onda $E_{1/2} = 0.870 \text{ V/Ag-AgCl}$ a $\text{pH} = 5$ correspondiente a la reacción de $\text{ABTS}^{\bullet-}/\text{ABTS}^0$. Existen discrepancias entre distintos autores [16,43] pues discuten las características físicas de este radical ya que se desconoce el color que posee y la longitud de onda a la que se puede determinar su presencia.

No obstante, fueron propuestas algunas longitudes de onda que son $\lambda = 214 \text{ nm}$, $\lambda = 256 \text{ nm}$ y $\lambda = 298 \text{ nm}$ con coeficientes de extinción molar de $\epsilon_{214 \text{ nm}} = 4.82 \times 10^4$, $\epsilon_{256 \text{ nm}} = 1.84 \times 10^4$ y $\epsilon_{298 \text{ nm}} = 2.00 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [17].

Por medio de estudios en voltamperometría cíclica se determinó que el ciclo de oxidación-reducción de este mediador es un sistema rápido y reversible además de ser sumamente estable [41].

Antecedentes

No es claro aún el mecanismo de reacción que sigue el $\text{ABTS}^{\cdot-}$ durante la oxidación de lignina, pues la baja solubilidad de la misma impide su manipulación en disoluciones acuosas. Por esta razón, se han elucidado mecanismos de reacción con compuestos que poseen estructuras modelo fenólico y no fenólico de lignina [10,39,48]. De acuerdo con los trabajos realizados al respecto, el $\text{ABTS}^{\cdot-}$ es capaz de oxidar compuestos modelo de lignina no fenólica como el alcohol veratrílico y algunos dímeros sintéticos entre los que se encuentra 1-(3,4-dimetoxifenil)-2-(2-metoxifenoxi)-propano-1,3 diol y el 1-(3,4-dimetoxifenil)-2-(2-feniletanodiol [12]; mientras que el principal representante de los compuestos con estructura modelo de lignina fenólica es el rojo fenol [11].

La mayoría de los estudios realizados en compuestos modelo, se centran en los de estructura no fenólica, pues poseen potenciales estándar aproximados a $E_{1/2} = 1.5 \text{ V}$, además de que se encuentran en mayor proporción en la estructura de la lignina. Esta proporción es cercana al 15 %, aunque este valor se modifica por efecto de los procesos de pulpeo que actúan sin aparente selectividad por algún tipo [39].

Sin embargo, el inconveniente del uso del ABTS^{2-} , no proviene de sus características estructurales o propiedades redox, sino de su alto costo, debido a que es una molécula que se obtiene por síntesis química. La tabla 2.7.1 muestra los precios por gramo de $(\text{NH}_4)_2\text{-ABTS}$ de acuerdo con los informes de las principales empresas comercializadoras de este compuesto.

Muchos de los trabajos en los que interviene el ABTS^{2-} como mediador redox en procesos de deslignificación [11] sugieren que se requieren cantidades aproximadas a los 150 mmoles

de ABTS²⁻ por gramo de pulpa de papel pre-blanqueado, lo que indica que en un hipotético proceso industrial, los costos de operación por concepto de compra de ABTS²⁻ serían sumamente elevados.

Tabla 2.7.1. Precios de venta por gramo de ABTS²⁻. Actualizados en enero del 2006.

Distribuidor	Precio (pesos)
Sigma®	\$805.06
Bioselec®	\$ 208.023

Algunos de los registros que constan en el sistema de patentes de los Estados Unidos de Norteamérica (USPTO por sus siglas en inglés), estiman que las cantidades de mediador empleado en un sistema de blanqueo que involucra enzimas oxidasas, están entre 1-500 milimoles U.S. Pat. No. 6,242,245. Por lo tanto, se ha vuelto de gran interés, estudiar procesos en los cuales se reutilice el mediador para abatir los costos inherentes al mismo.

No existen referencias que indiquen el uso de sistemas de deslignificación de pulpa de papel utilizando ABTS⁻ obtenido con la enzima lacasa, que no esté presente durante la reacción del ABTS⁻ con pulpa de papel. Esto es importante, pues algunos autores [41], sugieren que no es posible llevar a cabo la oxidación de la lignina en ausencia de la enzima, es decir, sin que se forme el Sistema-Lacasa-Mediador (SLM), pese a que la enzima, no es capaz de llevar a cabo la oxidación de lignina en pulpa de papel por si sola [11,12]. Las referencias de sistemas que no emplean enzima lacasa como oxidante de ABTS²⁻, proponen un sistema de oxidación de lignina presente en pulpa de papel con ABTS⁻ y ABTS⁰, siempre que sea oxidado por medio de un electrodo [41,49].

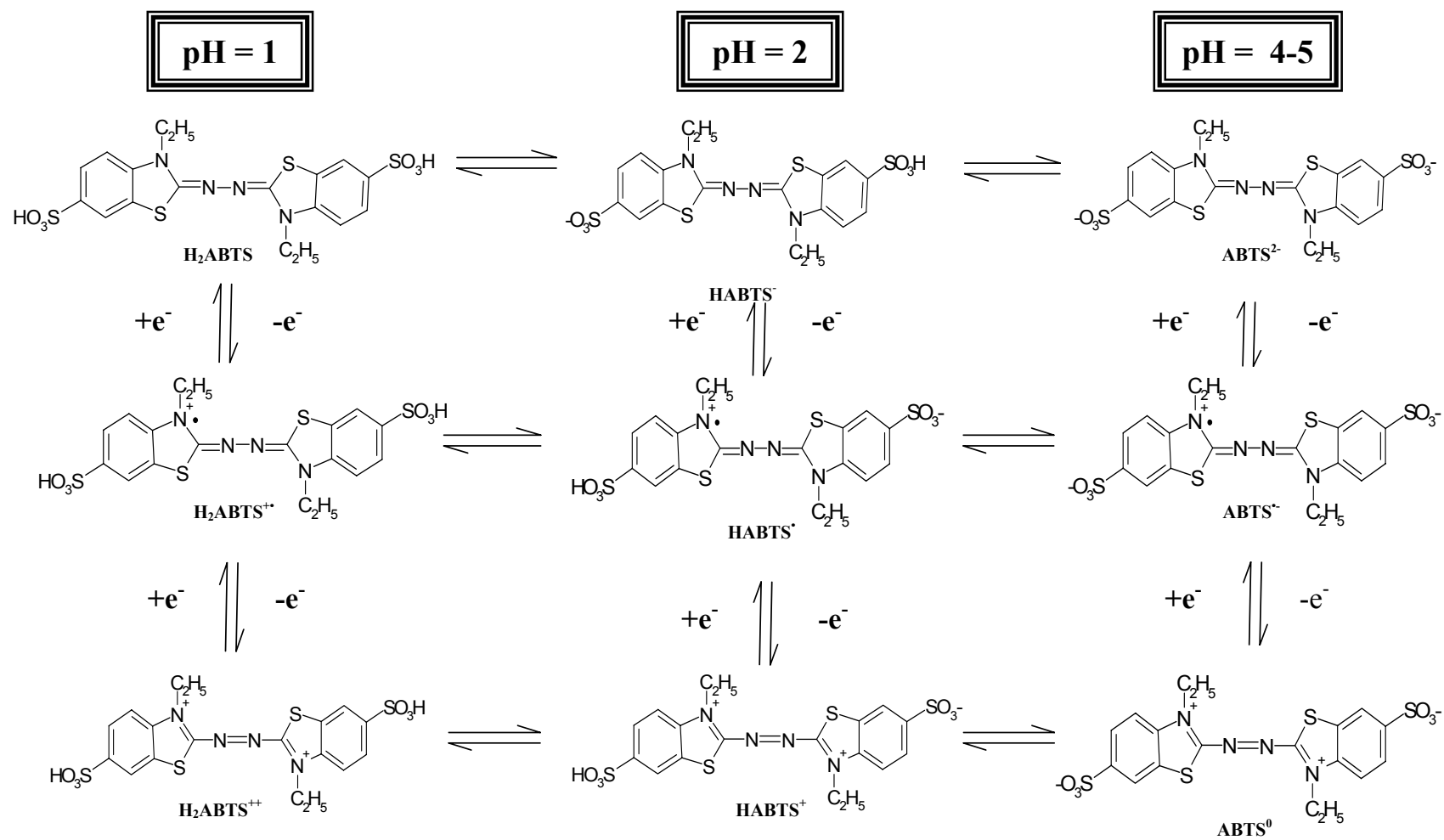


Figura 2.7.1 Estructuras del ABTS²⁻, sus posibles estados de oxidación en equilibrio ácido-base.

Antecedentes

Algunos autores comprueban que es posible llevar a cabo la oxidación de algunos de los compuestos aromáticos, presentes en la estructura de la lignina, en ausencia de la enzima, aunque ésta demostración se haya logrado empleando compuestos modelo y no directamente con lignina en pulpa de papel [28].

CAPÍTULO III

La hipótesis y los objetivos planteados para la realización de este trabajo se presentan a continuación.

HIPÓTESIS

Es posible disminuir considerablemente la cantidad de materia oxidable en pulpa de papel por medio de un pretratamiento enzimático empleando una mezcla del mediador ABTS^{2-} / $\text{ABTS}^{\cdot-}$. Este pretratamiento puede acoplarse a un proceso organosolv estimando la disminución final del contenido de materia oxidable por determinación de su valor de número kappa. Este pretratamiento, disminuye considerablemente el costo asociado a las condiciones energéticas empleadas en un proceso organosolv.

OBJETIVO GENERAL

Realizar el acoplamiento de un proceso químico organosolv y un proceso enzimático de reciclaje de ABTS^{2-} que permita reducir el contenido de lignina presente en pulpa de papel como una propuesta alternativa a los procesos de blanqueo empleados industrialmente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la disminución de la cantidad de materia oxidable presente en pulpa de papel por efecto del proceso organosolv en pulpa sin pretratamiento por medio de la determinación del número kappa.

Determinar la cantidad máxima de ABTS oxidado ($ABTS^{\bullet+}$) necesario para la reacción con materia oxidable presente en pulpa, sin pretratamiento (proceso enzimático).

Evaluar el efecto de la reacción de $ABTS^{\bullet+}$ en la disminución de la cantidad de materia oxidable presente en pulpa de papel previo al efecto de un proceso organosolv formando así un proceso combinado (enzimático-organosolv).

Establecer un método rápido y eficiente empleando procedimientos de voltamperometría cíclica para la cuantificación de la cantidad de lignina en pulpa de papel como una alternativa a la determinación del número kappa convencional.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Inicialmente, se determinó la cantidad máxima de lignina removible de pulpa de papel, únicamente, por parte del proceso organosolv, evaluando diferentes tiempos de reacción. Las determinaciones de lignina remanente en pulpa de papel, se realizaron por medio de una valoración volumétrica por retroceso, utilizando KMnO_4 en medio ácido, procedimiento conocido como número kappa. Además, se realizaron determinaciones del cambio en la intensidad catalítica (I_k) registrada por una disolución de ABTS^{2-} en presencia de pulpa de papel obtenida por el proceso organosolv a diferentes tiempos de reacción, mediante una modificación realizada al electrodo de trabajo, de acuerdo con lo propuesto por Bourbonnais, *et al.*, 2004. Por otra parte, se obtuvo la enzima lacasa a partir de un producto comercial de Novo, se realizó su caracterización en disolución a diferentes valores de pH, y se inmovilizó en un soporte de sílica gel, con la finalidad de recuperar la enzima cuando se empleara en la oxidación de disoluciones de ABTS^{2-} . El porcentaje de oxidación obtenido por este procedimiento se comparó con el que se obtuvo en disoluciones de ABTS^{2-} con peróxido de hidrógeno en distintos ácidos.

La mezcla ($\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^{\bullet}$) que resultó de la oxidación con peróxido de hidrógeno se empleó en diferentes cantidades para determinar el efecto del radical (ABTS^{\bullet}) en la

deslignificación de pulpa de papel y se evaluó su efecto combinado con el proceso organosolv.

4.2 LISTADO DE REACTIVOS.

A continuación se presenta un listado de los reactivos utilizados en el procedimiento experimental y algunas de sus propiedades físicas (Tabla 4.2.1).

Tabla 4.2.1. Propiedades físicas de reactivos utilizados

Reactivo	Fórmula	Características	Masa molecular	Proveedor
Butanol	C ₄ H ₁₀	Líquido volátil	58.04	J.T Baker
Hidróxido de sodio	NaOH	Sólido higroscópico	40.00	J.T Baker
Tiosulfato de sodio	Na ₂ O ₃ S ₂	Cristales	158.11	J.T Baker
Yoduro de potasio	KI	Cristales incoloros	166.00	J.T Baker
Permanganato de potasio	KMnO ₄	Cristales color púrpura	158.03	J.T Baker
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	Líquido incoloro	98.08	J.T Baker
Almidón soluble	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	Polvo blanco	-----	
ABTS (Ácido 2,2'-3-etil benzotiazolin-6-sulfónico)	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₆ S ₄ (NH ₄) ₂	Polvo verde	158.47	Sigma Aldrich
Ácido nítrico	HNO ₃	Líquido incoloro	63.01	J.T Baker
3-aminopropiltriétoxissilano	C ₉ H ₂₃ NO ₃ Si	Líquido incoloro	221.37	Sigma Aldrich
glutaraldehído	C ₅ H ₈ O ₂	Líquido incoloro	100.12	Sigma Aldrich
Acetona	C ₃ H ₆ O	Líquido volátil	58.08	Sima Aldrich
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂	Líquido incoloro	34.01	J.T Baker
Etanol anhidro	C ₂ H ₅ OH	Líquido volátil	34.01	J. T. Baker
Reactivo de Bradford		Líquido denso		Biorad

4.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS

4.3.1 Preparación de la pulpa de papel.

La pulpa de papel de papel que se utilizó como materia prima, se obtuvo por medio de un proceso de pulpeo kraft de *Eucalyptus globulus*, sin tratamiento de blanqueo y poseía un número kappa= 40.¹ Fue proporcionada por la doctora Ainhoa Arana y el grupo de investigación del doctor Juan Carlos Villar, del Instituto de Investigación Agraria y Alimentaria (INIA) España. La pulpa se secó y molió para obtener un tamaño de partícula de 0.23 mm, que se determinó haciendo pasar la pulpa a través de un tren de tamices.

4.3.2 Evaluación del efecto del proceso organosolv en la disminución de lignina en pulpa de papel.

Para realizar la determinación de la cantidad máxima removible de lignina presente en pulpa de papel y evaluar el efecto del proceso organosolv, fue necesaria la construcción de un gráfico, en el cual se mostrara el cambio del contenido de lignina en pulpa de papel sin pretratamiento alguno, con respecto al tiempo de reacción. Para tal objeto, se utilizaron muestras de 3.0 gramos de pulpa de papel libre de humedad y se llevó a cabo la reacción a 6 diferentes tiempos: 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 horas dentro de un Reactor Batch Nitto Koatsu SUS 316 (Vol = 0.450 L y P= 350 Kg/cm² Max). Las condiciones empleadas fueron: Temperatura de 150°C que se reguló automáticamente con un controlador recíproco-intermitente, 75 mL de

¹ De acuerdo con la relación logarítmica entre la cantidad de lignina determinada por el método de Klason y el número kappa.

Materiales y métodos

una mezcla con relación 10:1 (v/v) butanol: agua con 1 M de NaOH, para obtener un pH= 13, de acuerdo con referencias de la literatura [18]. El oxígeno que se encontraba dentro del reactor, fue desplazado del sistema antes de iniciar la reacción, mediante burbujeo con nitrógeno gaseoso durante 3 minutos. La presión generada dentro del reactor, durante el calentamiento y la fase estacionaria corresponden a la presión endógena del sistema, es decir, a la que se relaciona directamente con el cambio de la temperatura, ya que el reactor no fue presurizado. La pulpa obtenida fue mojada con etanol y exhaustivamente lavada con agua destilada para retirar el butanol excedente y los compuestos solubles residuales que pudieran causar errores en la determinación del número kappa. Posteriormente se filtró al vacío utilizando filtros Millipore de nitrocelulosa y se secó a temperatura ambiente.

4.3.3 Determinación del número kappa.

El número kappa es el volumen de solución estandarizada de permanganato de potasio 0.1 N que gasta un gramo de pulpa libre de humedad [22] y representa la cantidad de materia oxidable considerada sólo como lignina que está presente en la pulpa. La determinación se llevó a cabo empleando una valoración volumétrica por retroceso con disoluciones 0.2 N de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y 1 M de KI, utilizando una disolución de 2 g/ L de almidón soluble. La pulpa fue suspendida en 500 mL de agua, a la que se adicionan 100 mL 4 N de ácido sulfúrico y 100 mL 0.1 N de KMnO_4 con agitación constante y se dejó reaccionar durante 10 min. Transcurrido este tiempo se agregaron 20 mL de KI y comenzó la titulación con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

4.3.4 Caracterización voltamperométrica de ABTS²⁻ y adaptación del método de Bourbonnais, para la determinación del número kappa de muestras de pulpa de papel

La caracterización de la disolución 0.3 mM de ABTS²⁻, se realizó empleando una disolución 100 mM de amortiguador de acetatos pH = 4.5 como electrolito soporte, variando el potencial con respecto al tiempo y se registró como respuesta el cambio en la intensidad de la corriente, en función del potencial aplicado. Las velocidades de barrido de potencial que se probaron fueron: 0.004 V/s, 0.010 V/s, 0.020 V/s, 0.050 V/s, 0.100 V/s, 0.200 V/s , 0.500 V/s , 0.700 V/s y 1.000 V/s, utilizando un potencióstato-galvanostato EG&G PAR modelo 273.

La celda en la que se llevaron a cabo las determinaciones consta de un compartimiento de 5 mL, un electrodo de referencia Ag/AgCl (ER), un contra electrodo de alambre de platino (CE) y un electrodo de trabajo de carbón vítreo (ET). Para realizar las determinaciones de la intensidad de corriente catalítica en pulpa de papel, se hizo una modificación al electrodo de trabajo, adaptando una funda con fondo de malla plana (F), para permitir la difusión de la disolución durante las determinaciones, mantener constante el área de transferencia y presionar la pulpa contra la superficie del electrodo. La figura 4.3.4.1 muestra la celda de trabajo y la adaptación realizada al electrodo. Las determinaciones realizadas con pulpa de papel se hicieron a 0.1 V/s, empleando muestras que poseían distinto valor de número kappa obtenidas del reactor del proceso organosolv.

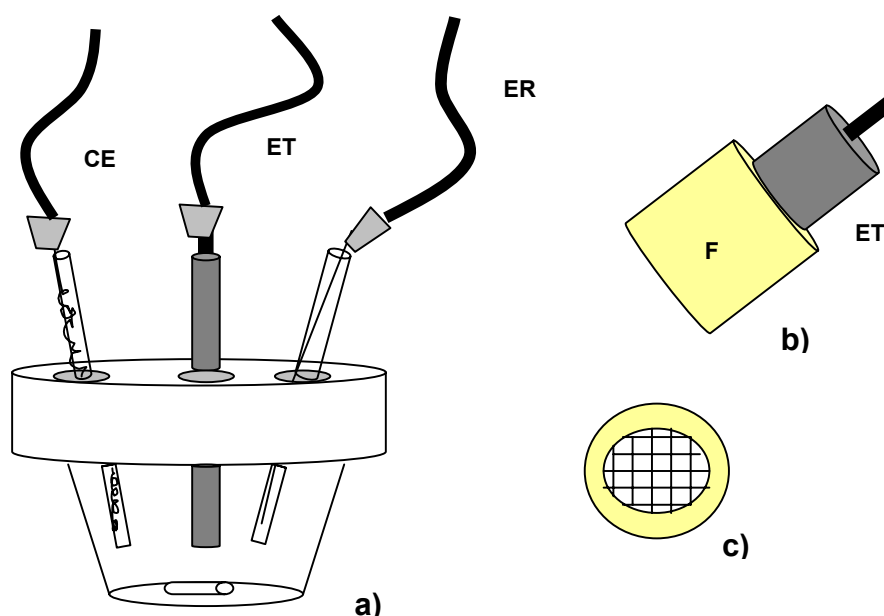


Figura.4.3.4.1. a) Esquema de la celda de trabajo y los tres electrodos empleados durante la caracterización voltamperométrica de $ABTS^{2-}$ y $ABTS^{2-}$ en presencia de pulpa de papel. Electrodo de trabajo (ET), electrodo de referencia (ER), contra electrodo (CE). b) Esquema del electrodo de trabajo y adaptación de la funda de fondo plano. c) Vista transversal de la funda y el fondo plano de malla.

4.3.5 Caracterización espectrofotométrica de $ABTS^{2-}$

Los espectros de absorción electrónica Ultravioleta- visible (UV-Vis) realizados durante la caracterización, se adquirieron cada 2 nm desde 190 a 820 nm, empleando una disolución 0.04 mM $ABTS^{2-}$, en una disolución 0.1 M de amortiguador de acetatos pH= 5. La curva de calibración de $ABTS^{2-}$ se construyó utilizando cuatro concentraciones diferentes de $ABTS^{2-}$ que fueron 0.5×10^{-5} M, 1×10^{-5} M, 2.5×10^{-5} M y 5×10^{-5} M, con la que se determinó su coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{341 \text{ nm}}$). Utilizando los parámetros obtenidos de la curva estándar, se determinó la concentración de $ABTS^{\cdot-}$ presente en una mezcla, de dos formas:

a) Por medio de la ecuación de Beer, conociendo la concentración de $ABTS_{\text{total}}$ en la disolución y determinando la concentración de $ABTS^{2-}$ espectrofotométricamente ($ABTS_{\text{tot}}$

= ABTS²⁻ + ABTS^{•-}) y b) Determinando la absorbancia a $\lambda = 728$ nm ($\epsilon = 15,230$ L/cm¹ mol⁻¹).

4.3.6 Separación de la enzima lacasa.

La enzima lacasa utilizada se separó de la mezcla comercial DeniLite II S de la empresa Novo. La mezcla fue inicialmente suspendida en buffer de acetatos 100 mM pH= 4 con agitación constante, a 4 °C aproximadamente durante 14 horas. Esta suspensión se centrifugó a 9000 rpm y 4 °C durante 1 hora. El líquido sobrenadante se recuperó y se filtró con papel filtro Whatmann #1 y con una membrana Millipore 0.45 μ m. Posteriormente se añadió acetona fría lentamente y con agitación constante para favorecer la precipitación de la enzima. Una vez precipitada la enzima se separó por decantación y se lavó mediante la adición de pequeñas cantidades de acetona fría, posteriormente se almacenó a -80 °C ó se suspendió en buffer de acetatos 100 mM pH= 4 cuando su uso era inmediato.

4.3.7 Cuantificación de la cantidad de proteína recuperada

La concentración de enzima recuperada durante la precipitación, se determinó por medio del método de Bradford, que consiste en la reacción de residuos aminoácidos básicos y aromáticos (esencialmente arginina) con el colorante azul brillante de Coomassie G-250 cuya absorción característica cambia de 465 nm a 595 nm, una vez que se halla unido a la proteína. La determinación se realiza mediante la construcción de una curva estándar de

concentraciones conocidas utilizando sero albúmina bovina, y reactivo de Bradford determinando su absorción a 595 nm.

4.3.8 Evaluación de la actividad enzimática de lacasa a diferentes valores de pH.

Con el fin de determinar las condiciones que propiciaran la obtención de actividades enzimáticas más altas, se probaron dos valores de pH distintos en la oxidación de una disolución 0.1 mM de ABTS²⁻ en una disolución 100 mM de amortiguador de acetatos pH = 4 y pH = 5 respectivamente. La actividad se determinó midiendo el incremento de absorbancia a $\lambda = 728$ nm en presencia de la enzima lacasa.

4.3.9 Inmovilización de la enzima lacasa en cristales de sílice.

Una vez que se determinó el pH en el que la enzima presentó la mayor actividad, y con el propósito de realizar la oxidación de ABTS²⁻ separando fácilmente la enzima, se llevó a cabo la inmovilización de la misma. Para esto, se requirió la preparación de un soporte de sílica gel, que se obtuvo mediante la mezcla de igual volumen (75 mL) de etanol anhidro, agua destilada y tetraetil ortosilicato, mezclando con agitación ligera y agregando gotas de ácido clorhídrico concentrado hasta hacer completamente homogénea la solución. Esta mezcla, se dejó secar a temperatura ambiente durante aproximadamente siete días, hasta obtener un gel, que pudo ser cortado para reducir el tamaño de partícula y aumentar el área de contacto con la enzima. Una vez obtenido el soporte, se trató primero con una solución 1 N de NaOH durante 1 hora y posteriormente con una disolución 1 N de HNO₃ también

Materiales y métodos

durante 1 hora a 25 °C. Posteriormente se activó con una solución 50 % (v/v) de 3-aminopropiltriétoxissilano y se dejó reposar por 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se separó el sólido por decantación y se hizo reaccionar con glutaraldehído al 10 % durante 24 horas más. Se retiró el excedente de glutaraldehído del sólido, que adquirió un color naranja debido a la formación de base de Schiff, y se lavó con agua destilada abundante para posteriormente hacerlo reaccionar con una suspensión de 25 mL de enzima lacasa en buffer de acetatos 0.1 mM a pH= 4 durante 24 horas. Los cristales obtenidos se separaron por decantación y se lavaron con agua destilada hasta que los lavados dejaron de presentar actividad cuando se ponían en contacto con alícuotas de una disolución 1 mM de ABTS²⁻. Este procedimiento se realizó para garantizar que no hubiera desprendimiento de enzima durante la reacción de oxidación de ABTS²⁻.

4.3.10 Determinación de la actividad enzimática de lacasa inmovilizada

Después de lavar exhaustivamente los cristales y comprobar que no hay presencia de enzima libre, se determinó la actividad de la enzima inmovilizada pesando una muestra de 0.2 gramos de soporte con enzima inmovilizada y se midió el cambio de absorbancia a $\lambda=728$ nm de una disolución 1mM de ABTS²⁻ disuelto en 0.1 M de amortiguador de acetatos pH= 4.

4.3.11 Oxidación de $ABTS^{2-}$ en solución con enzima inmovilizada

Para garantizar homogeneidad en la oxidación del $ABTS^{2-}$, se preparó una solución concentrada de $ABTS^{2-}$ 28 mM en buffer de acetatos 0.1 M pH 4, que se mantuvo en contacto con 10 gramos de cristales de sílice con enzima inmovilizada durante 5 días. Una vez transcurrido este tiempo se separaron los cristales, se lavaron y almacenaron a temperatura ambiente.

4.3.12 Determinación de la cantidad máxima de la mezcla $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$ capaz de reaccionar con lignina de pulpa de papel

Después de 6 días de reacción entre el $ABTS^{2-}$ y la enzima inmovilizada, se determinó el porcentaje de oxidación de la disolución, como se indica en la sección 4.3.5. La enzima fue separada de la mezcla de $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$ y se emplearon las alícuotas correspondientes de la disolución de $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$ para determinar su efecto en la eliminación de lignina presente en pulpa de papel. Se utilizaron muestras de 3 gramos en peso seco de pulpa de papel y se suspendieron en 200 mL de buffer de acetatos con la solución de $ABTS^{2-}$ previamente oxidada. Después del tratamiento con la disolución durante 19 horas, la pulpa fue lavada exhaustivamente con agua destilada para ser sometida al proceso organosolv, a 150 °C durante una hora. Posteriormente, la pulpa fue lavada con etanol y agua destilada a temperatura ambiente, y secada por filtración al vacío para la determinación del número kappa de acuerdo con la sección 4.3.3.

4.3.13 Determinación de la adsorción de $ABTS^{2-}/ABTS^{\bullet-}$ en cristales de sílica

Para determinar la disminución de la concentración de la disolución que contiene la mezcla $ABTS^{2-}$ y $ABTS^{\bullet-}$, se obtuvieron espectros de absorción UV-Vis de la disolución 2.84 mM de $ABTS^{2-}$ en una solución reguladora de acetatos pH = 4 que fue preoxidada con 5 gramos de enzima inmovilizada en sílica gel durante 5 días. Los espectros de absorción se obtuvieron después de 5 días de preoxidación y luego de 96 horas, monitoreando el cambio de absorbancia a $\lambda = 341$ y $\lambda = 728$ nm.

4.3.14 Oxidación de $ABTS^{2-}$ con peróxido de hidrógeno en medio ácido

Como una alternativa al uso de enzima inmovilizada, se planteó utilizar peróxido de hidrógeno para la oxidación de $ABTS^{2-}$ en medio ácido empleando disoluciones 0.05 M y 0.1 M de ácido clorhídrico, 0.05 M de ácido sulfúrico y 1 M de ácido acético. La obtención de espectros de absorción UV-Vis de $ABTS^{2-}$ en las diferentes disoluciones se realizó en el intervalo de 190 a 820 nm de la siguiente forma: a) cada vez que se adicionaba una alícuota de peróxido de hidrógeno correspondiente a 1.25×10^{-4} mmoles, a la disolución 0.025 mM de $ABTS^{2-}$, empleando ácido sulfúrico o ácido clorhídrico y b) cada 0.5 horas durante 12 horas, una vez que se adicionaron 1.25×10^{-3} mmoles de peróxido de hidrógeno a una disolución 0.05 mM de $ABTS^{2-}$ cuando se empleó ácido acético.

4.3.15 Deslignificación de pulpa de papel empleando la mezcla $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$ obtenida por oxidación con peróxido de hidrógeno.

Se emplearon diferentes cantidades de la disolución que contenía la mezcla $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$ obtenida por oxidación de una disolución 0.1 M de $ABTS^{2-}$ con H_2O_2 6.5 M. Las cantidades estequiométricas de $ABTS^{\cdot-}$ empleadas, se calcularon de acuerdo con la sección 5.6.1. La pulpa de papel fue tratada con la mezcla durante 19 horas, al término de este tiempo fue lavada exhaustivamente con agua destilada, y tratada a 150 °C, durante 1 hora como parte del proceso organosolv. Las fases orgánica y acuosa de cada tratamiento fueron recuperadas y se almacenaron a temperatura ambiente para análisis posteriores. La pulpa de papel fue lavada con etanol y agua destilada y filtrada al vacío para la determinación del número kappa como se indicó en la sección 4.3.3.

4.3.16 Determinación de la adsorción de $ABTS^{2-}$ y $ABTS^{\cdot-}$ en pulpa de papel

Se empleó una disolución 1 mM que presentaba la mezcla de $ABTS^{2-}$ y $ABTS^{\cdot-}$ que se mantuvo en contacto con 0.15 g de pulpa de papel durante 19 horas, dentro de un sistema hermético, que consiste en una botella serológica con tapón de hule y arillo de metal. La finalidad de mantener sellado el sistema, fue garantizar que no hubiera alteraciones del volumen de la solución de $ABTS^{2-}$ por efectos de evaporación. Para determinar la concentración final solución, se obtuvieron los espectros de absorción UV-Vis de la disolución al inicio y al cabo de 19 horas, verificando principalmente las longitudes de onda $\lambda= 341$ nm y $\lambda= 728$ nm.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 EFECTO DEL PROCESO ORGANOSOLV EN LA SOLUBILIZACIÓN DE LIGNINA EN PULPA DE PAPEL

El objetivo que persiguió este trabajo, fue realizar el acoplamiento de un proceso químico organosolv y un proceso enzimático de reciclaje de ABTS²⁻, a manera de un pretratamiento que se aplicó a la pulpa de papel para disminuir el contenido de lignina presente. Para cumplir el objetivo, fue necesario caracterizar y oxidar el ABTS²⁻ con el fin de emplearlo durante el pretratamiento; así como realizar los estudios correspondientes de eliminación de lignina, por parte del proceso organosolv.

Con el propósito de establecer el tiempo de reacción adecuado para obtener la máxima eliminación del contenido de lignina remanente en pulpa de papel, empleando exclusivamente un proceso organosolv, se realizó un estudio, para evaluar la efectividad del proceso en función del tiempo. La cantidad de lignina remanente en la pulpa de papel fue determinada por el procedimiento convencional de retrotitulación con KMnO₄ conocido como número kappa, que permite determinar la presencia de materia susceptible a la oxidación con permanganato de potasio, en medio ácido. Se da por hecho, que durante el proceso de pulpeo de la madera, se eliminó la mayor parte de la materia oxidable que se encontraba unida a la celulosa, con excepción de los ácidos hexeurónicos y lignina remanente que se intentó remover, por medio de procesos de blanqueo.

Resultados y discusiones

Debido a que la cantidad de ácidos antes mencionados fue prácticamente despreciable, se consideró a la materia oxidable por este método como cantidades de lignina presente.

Las condiciones de reacción empleadas fueron: 150 °C y una mezcla con relación de 10:1 butanol/agua con 1 M de NaOH. El oxígeno, se desplazó del sistema antes de iniciar la reacción y la presión generada dentro del reactor, corresponde a la presión endógena del sistema.

La figura 5.1.1 muestra los valores del número kappa obtenidos a diferentes tiempos de reacción (cinética de deslignificación), en la evaluación del proceso organosolv para la disminución del contenido de lignina en pulpa de papel sin pretratamiento.

El estudio cinético de deslignificación, puede dividirse en dos fases. La primera fase comprende tiempos menores a 2 horas de reacción, mientras que la segunda fase, se compone por tiempos mayores a 2 horas. Durante la primera fase, se observó una disminución de 18 unidades del número kappa, que corresponde a la eliminación del 46 % de la lignina total que se encontraba en la pulpa de papel. No obstante, durante la segunda fase del proceso global, a $t = 4$ horas de reacción, el número kappa disminuyó sólo 2 unidades adicionales, donde alcanzó una eliminación del 50 % de la lignina presente en pulpa de papel. Durante los tiempos de reacción posteriores, estadísticamente, no hay disminución del número kappa, debido a que la variación de las mediciones aumentó considerablemente con el tiempo.

Resultados y discusiones

Se estableció que el número kappa no mostró diferencias significativas a partir de $t= 2$ horas, a este tiempo, se alcanzó la máxima deslignificación posible, bajo las condiciones de reacción del proceso organosolv empleadas en este trabajo.

El patrón de decremento de los valores de número kappa, obtenidos a diferentes tiempos de reacción, fue consistente con lo citado en la literatura [50], aún cuando las condiciones de reacción como el tipo de disolvente utilizado, la temperatura, e incluso la relación sólido (pulpa)/ líquido (disolvente) varían ampliamente [34].

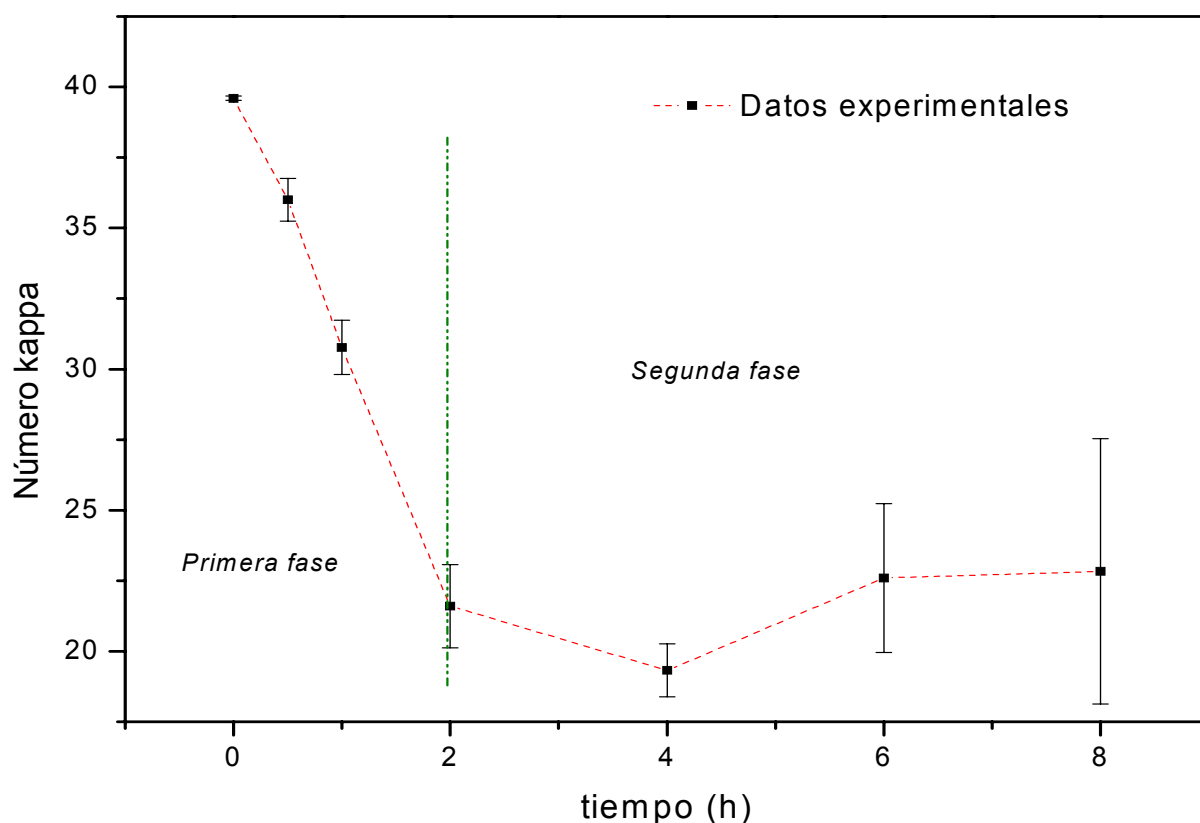


Figura 5.1.2 Representación gráfica del cambio del número kappa en función del tiempo, como una medida de la cantidad de lignina presente en pulpa de papel sin blanquear y sin pretratamiento, después de ser sometida al proceso organosolv.

Resultados y discusiones

Sin embargo, no es posible reproducir los resultados obtenidos por otros autores, a pesar de seguir las condiciones establecidas en la literatura [51], pues las referencias muestran la máxima deslignificación en tiempos de reacción no mayores a 0.5 horas, mientras que en el presente trabajo la deslignificación se extendió a tiempos de 2 horas, como lo muestra la figura 2.5.1.

De acuerdo con algunos autores, la primera fase de la reacción de deslignificación de los procesos organosolv, se caracteriza por un decremento exponencial de la cantidad de materia oxidable [34]. Sin embargo, los datos experimentales obtenidos, no se ajustan al modelo exponencial propuesto en la literatura [3, 52], debido a que presentan, en la primera fase un decremento lineal, que podría estar estrechamente relacionada con el cambio del valor del pH de la mezcla, que sufre modificaciones durante el proceso.

Inicialmente, la mezcla de reacción poseía un pH= 13. Una vez que el proceso concluyó, se determinó un valor de pH= 6.8. De acuerdo con algunos autores, tal disminución pudo deberse a la ruptura de enlaces β -*o*-4 durante la reacción en medio alcalino, que generó fragmentos solubles y de bajo peso molecular, uno de los cuales, es ácido acético [24]. El ácido producido, puede reaccionar con el NaOH presente, para formar el carboxilato correspondiente, disminuyendo en forma considerable el contenido de NaOH disponible para la reacción [21]. Es posible que a tiempos mayores de $t= 2$ horas, todo el NaOH se halla consumido en la reacción con los grupos fenólicos de la lignina o neutralizando los ácidos formados durante el proceso, impidiendo que la deslignificación continúe. Bajo las

Resultados y discusiones

nuevas condiciones sería muy difícil conseguir una disminución significativa del número kappa y las variaciones en su determinación fueron muy grandes.

Por otra parte, las grandes variaciones del número kappa en tiempos mayores a $t = 2$ horas, también podrían estar relacionadas con fenómenos de entrecruzamiento y asociación por condensación de las estructuras de lignina dentro del reactor [30]. Los fenómenos de condensación se vieron favorecidos por las altas concentraciones de fragmentos de lignina de bajo peso molecular; que fueron resultado del rompimiento de las estructuras de mayor tamaño; el grado de asociación por condensación aumentó, cuando creció la concentración de solutos en el seno del líquido. Esto puede explicar la oscilación de los valores del número kappa después de 2 horas de reacción, e indicaría que la mezcla se encontraba saturada de fragmentos de lignina que se reasociaron por efecto de la temperatura, especialmente durante el periodo de enfriamiento del reactor. Los fenómenos de condensación y entrecruzamiento fueron completamente aleatorios y heterogéneos. De esta forma, la mala distribución del calor dentro del reactor por la ausencia de agitadores, pudo contribuir para obtener las grandes variaciones del número kappa en los tiempos de reacción superiores a 4 horas.

Es necesario profundizar en el estudio de las variables que controlan al proceso organosolv, pues manipulando las condiciones de reacción, sería posible mejorar la eliminación de la lignina presente en pulpa de papel. Sin embargo, la optimización de las condiciones del proceso organosolv, no forma parte de los objetivos de este trabajo. No obstante, la información obtenida permitió cumplir el objetivo perseguido por este estudio:

Resultados y discusiones

demostrando que el número kappa permaneció prácticamente constante a partir de $t = 2$ horas, e indicando que la extensión del tiempo de reacción, no aumentó el efecto de deslignificación, permitiendo así establecer las condiciones adecuadas para el proceso organosolv: temperatura = 150 °C y $t = 1$ hora, con las que se alcanza la eliminación del 22 % de la lignina. El establecimiento de las condiciones de reacción, así como el tiempo en el que se alcanzó la mayor disminución del número kappa, por parte del proceso organosolv, fueron de gran utilidad para posteriormente, realizar la comparación de la disminución del número kappa que presentó la pulpa de papel tratada únicamente con el proceso organosolv y la pulpa que fue pretratada con ABTS²⁻. Para llevar a cabo el estudio de deslignificación, fue necesario realizar previamente una caracterización voltamperométrica y espectrofotométrica del mediador ABTS²⁻.

5.2 ESTUDIO VOLTAMPEROMÉTRICO DEL ABTS²⁻

El estudio voltamperométrico de ABTS²⁻ tuvo como finalidad establecer un método alternativo para la determinación del número kappa, mediante la asociación de la intensidad de corriente catalítica (I_k) registrada por ABTS²⁻ en presencia y ausencia de pulpa de papel, con distintos niveles de número kappa, de acuerdo con el método propuesto por Bourbonnais [41]. Este método requiere realizar una modificación al electrodo de trabajo, que genera cambios en la interfase, por lo que es necesario realizar previamente una caracterización electroquímica del ABTS²⁻ en disolución, a fin de identificar los procesos redox de éste. Posteriormente, se comparará con los resultados que se obtengan con las modificaciones sugeridas en el método antes citado, para evaluar los efectos en los procesos

Resultados y discusiones

redox del ABTS^{2-} generados por las modificaciones al electrodo. Finalmente se determinará la confiabilidad y reproducibilidad del nuevo método.

La figura 5.2.1 muestra el voltamperograma de una disolución 0.3 mM de ABTS^{2-} obtenido a 0.1 V/s sobre un electrodo de carbón vítreo (0.706 cm^2) empleando un electrodo de referencia de Ag-AgCl, y como electrolito soporte, una disolución 100 mM de amortiguador de acetatos a pH= 4.5. El barrido de potencial se inició en sentido positivo, a partir de un potencial de circuito abierto $E_{i=0}$, y hasta el potencial de inversión anódico ($E_{+\lambda} = 1.3 \text{ V}$) en este intervalo se observaron dos procesos de oxidación, cuyos valores de potencial de pico anódico son $E_{pa1} = 0.578 \text{ V}$ ($I_{pa1} = 1.52 \mu\text{A}$) y $E_{pa2} = 0.969 \text{ V}$ ($I_{pa2} = 1.45 \mu\text{A}$). Cuando la dirección del barrido se invirtió, se observaron dos procesos de reducción en dirección $E_{-\lambda}$, con valores de potencial de pico catódico de $E_{pc1} = 0.477 \text{ V}$ ($I_{pc1} = 1.67 \mu\text{A}$) y $E_{pc2} = 0.896 \text{ V}$ ($I_{pc2} = 1.23 \mu\text{A}$).

Una forma común, empleada para determinar el valor de $E_{1/2}$ es mediante la expresión $E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2$, de este modo se obtuvo un valor de $E_{1/2} = 0.525 \text{ V/Ag-AgCl}$, correspondiente al sistema $\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^{\bullet-}$ y de $E_{1/2} = 0.929 \text{ V/Ag-AgCl}$ correspondiente al sistema $\text{ABTS}^{\bullet-}/\text{ABTS}^0$. Ambos procesos son monoeléctricos y reversibles, de acuerdo con informes previos [46].

Los valores de potencial antes mostrados, están directamente relacionados con el cambio en la energía libre, asociada a la transferencia neta de un electrón por cada pico, para formar las especies oxidadas correspondientes, de acuerdo con la ecuación de Nernst [53].

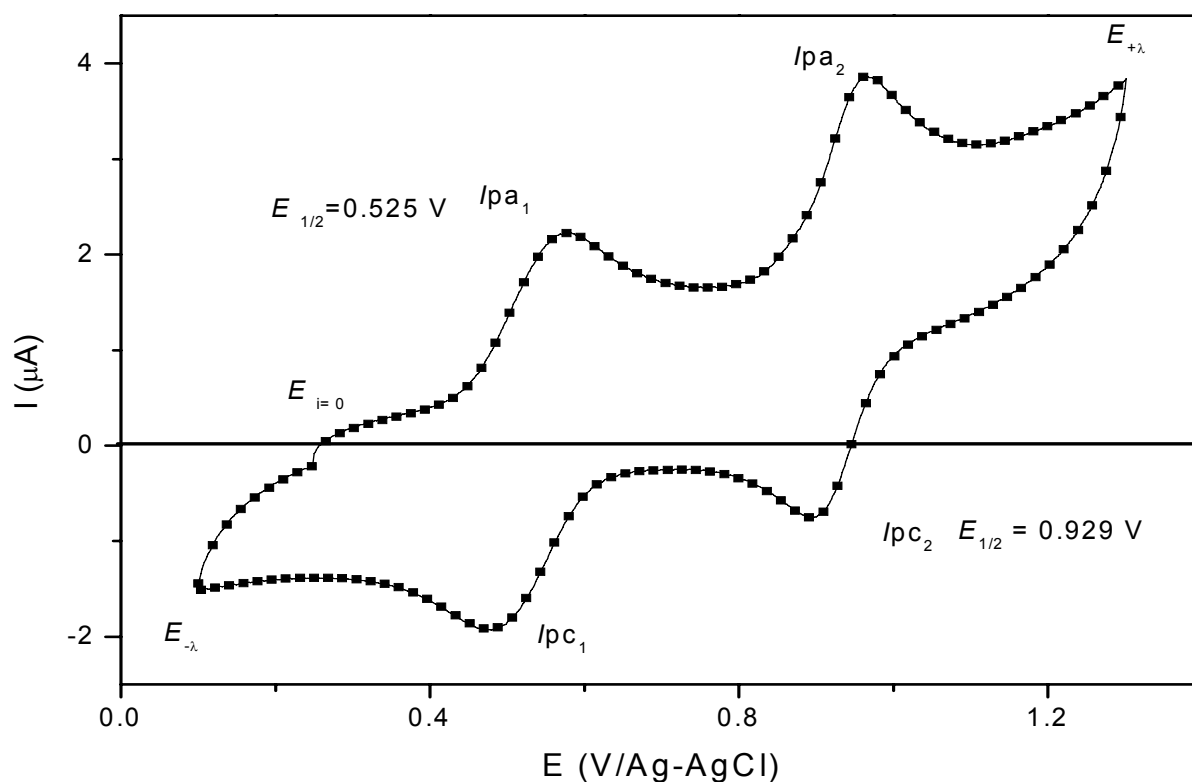
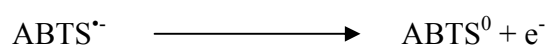
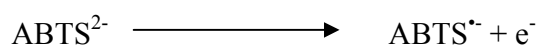
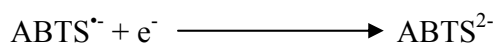
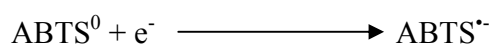


Figura. 5.2.1. Voltamperograma de una disolución 0.3 mM de ABTS^{2-} obtenido a 0.1 V/s utilizando un electrodo de carbón vítreo y una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M pH = 4.5 como electrolito soporte. El barrido de potencial se realizó en dirección positiva.

Esta transformación se presenta en el voltamperograma de la figura 5.2.1 cuando el barrido de potencial se realizó en dirección positiva, y se observaron las reacciones de oxidación siguientes:



Cuando la dirección del barrido de potencial se invirtió, se presentaron las reacciones de reducción correspondientes:



La caracterización de los procesos redox del ABTS^{2-} antes descritos, en especial, el correspondiente al sistema $\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^{\cdot-}$ fue de gran trascendencia en este trabajo, ya que el radical $\text{ABTS}^{\cdot-}$ es señalado como el responsable directo de la oxidación de las estructuras de lignina en pulpa de papel, particularmente lignina fenólica [16,41] por lo que fue importante identificarlo plenamente, antes de realizar cualquier modificación para la determinación del número kappa.

5.2.1 Efecto de la velocidad de barrido.

Como parte de la caracterización del ABTS^{2-} en disolución, se realizó un estudio a diferentes velocidades de barrido, para determinar posibles cambios en la cinética de los procesos redox del ABTS^{2-} . Implícitamente, un cambio en la velocidad de barrido equivale a un cambio en el perfil de concentraciones del ABTS^{2-} , dado que la reacción electroquímica se lleva a cabo en la superficie del electrodo de trabajo. De esta forma, cuando la velocidad de barrido aumenta, aumenta la velocidad de difusión de las especies redox en la superficie del electrodo, ya que se modifica más rápidamente la concentración de la especie electroactiva en la superficie del electrodo. La figura 5.2.1.1 muestra los voltamperogramas de una disolución 0.3 mM de ABTS^{2-} a distintas velocidades de barrido, utilizando un

electrodo de carbón vítreo como electrodo de trabajo y una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH = 4.5 como electrolito soporte.

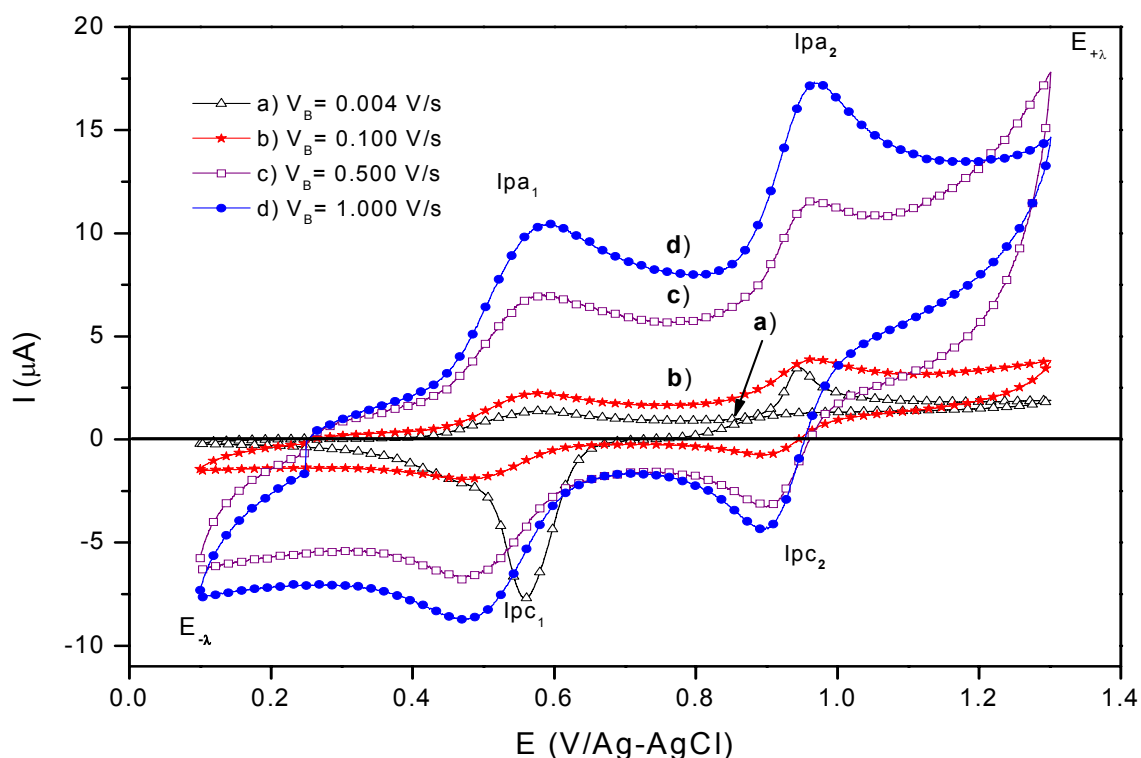
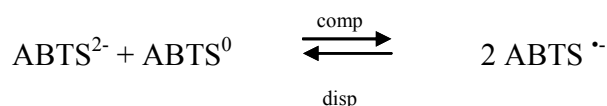


Figura 5.2.1.1. Voltamperogramas de una disolución 0.3 mM de $ABTS^{2-}$ obtenidos a diferentes velocidades de barrido utilizando un electrodo de carbón vítreo y una disolución 0.1 M de amortiguador de acetatos pH = 4.5 como electrolito soporte.

Los potenciales de oxidación y reducción se desplazaron ligeramente cuando la velocidad de barrido aumentó, así como la intensidad de corriente correspondiente se incrementa, especialmente en el pico que determina los procesos de reducción de $ABTS^0$ a $ABTS^{\cdot-}$ y de $ABTS^{\cdot-}$ a $ABTS^{2-}$. Bourbonnais [41], sugirió que a bajas velocidades de barrido, no es posible apreciar el pico correspondiente al proceso $ABTS^0$ a $ABTS^{\cdot-}$, debido a reacciones de comproporciónación entre $ABTS^{2-}$ y $ABTS^0$, como se describe en la siguiente ecuación química:



Cuando la velocidad de barrido se incrementó, las transformaciones electroquímicas al electrodo se realizaron rápidamente y ambos procesos redox se observaron reversibles. La reacción de comproporciónación en estas condiciones, sucedió en menor proporción; mientras que a baja velocidad de barrido la transformación se llevó a cabo más lentamente, permitiendo la difusión del ABTS^{2-} al electrodo, favoreciendo así la reacción de comproporciónación entre éste y ABTS^0 . Lo anterior, permitió establecer la velocidad de barrido más conveniente para la siguiente etapa experimental (0.1 V/s) a fin de favorecer la reversibilidad de la reacción, especialmente para el sistema $\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^{\cdot -}$.

5.2.2 Adaptación del método de Bourbonnais para la determinación del número kappa de muestras de pulpa de papel

Una vez que se realizó la caracterización del ABTS^{2-} en disolución y se conocieron bien los procesos redox que llevaron a cabo, se tuvieron las condiciones apropiadas para abordar el método propuesto [41], y hacer las modificaciones pertinentes para su implementación. De acuerdo con la referencia antes citada, en presencia de pulpa de papel, el ABTS^{2-} funciona como transportador de electrones, haciendo posible la oxidación de lignina presente en pulpa, bajo condiciones establecidas de concentración de ABTS^{2-} .

Resultados y discusiones

La intensidad de corriente (I_p) determinada, fue directamente proporcional a la concentración del analito en disolución [41]. De acuerdo con las modificaciones descritas en la sección 4.2.4 (figura 4.2.4.1), para el electrodo de trabajo, en estas condiciones, se esperó un incremento en la intensidad de corriente asignada a la oxidación de $ABTS^{2-}$, debido a la regeneración de $ABTS^{2-}$ al electrodo, formado a partir de la reacción entre el $ABTS^{\bullet-}$ y la lignina contenida en la pulpa de papel. A dicha corriente, se denomina intensidad de corriente catalítica (I_k). La figura 5.2.2.1 muestra el mecanismo de la reacción que se llevó a cabo en la superficie del electrodo entre el sistema $ABTS^{2-}/ABTS^{\bullet-}$ y la lignina en pulpa de papel.

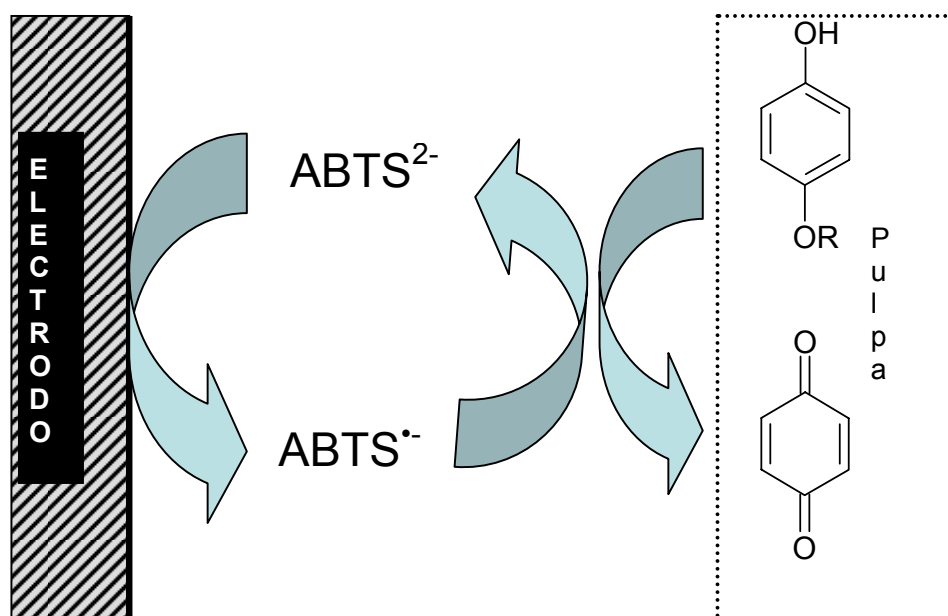


Figura 5.2.2.1. Esquema del mecanismo de reacción que se lleva a cabo en la superficie del electrodo entre $ABTS^{2-}/ABTS^{\bullet-}$ y lignina.

Resultados y discusiones

De acuerdo con el mecanismo mostrado, se siguió la metodología propuesta por Bourbonnais [41], como una alternativa para determinar la cantidad de materia oxidable presente en pulpa de papel. La determinación del incremento en la intensidad de corriente catalítica (I_k) medida en el proceso de oxidación de $ABTS^{2-}$ a $ABTS^{\bullet-}$ en presencia y ausencia de pulpa de papel fue asociado con el contenido de materia oxidable. En presencia de lignina, se esperó que las intensidades de corriente catalítica fueran mayores en proporción directa a su concentración. Los voltamperogramas mostrados en la figura 5.2.2.2 se obtuvieron empleando una disolución 0.3 mM de $ABTS^{2-}$ en disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH = 4.5 en presencia de pulpa de papel, y obedecen a un patrón de difusión distinto al obtenido con la misma disolución sin pulpa de papel (figura 5.2.1.1), debido al impedimento físico que provocó la pulpa en la superficie del electrodo. Cuando el patrón de difusión se modificó, las transformaciones químicas sucedieron lentamente, favoreciendo la reacción de comproporciónación.

Los voltamperogramas que se muestran en la figura 5.2.2.2, se obtuvieron con un electrodo de carbón vítreo empleando muestras de pulpa de papel con distinto contenido de lignina. La figura 5.2.2.2a corresponde a una disolución 0.3 mM de $ABTS^{2-}$ en presencia de pulpa de papel con bajo contenido de lignina, es decir, con un valor de número kappa ≈ 0 , mientras que la figura 5.2.2.2b corresponde a una disolución 0.3 mM de $ABTS^{2-}$ en presencia de pulpa de papel, con un contenido de lignina correspondiente a un valor de número kappa = 40.

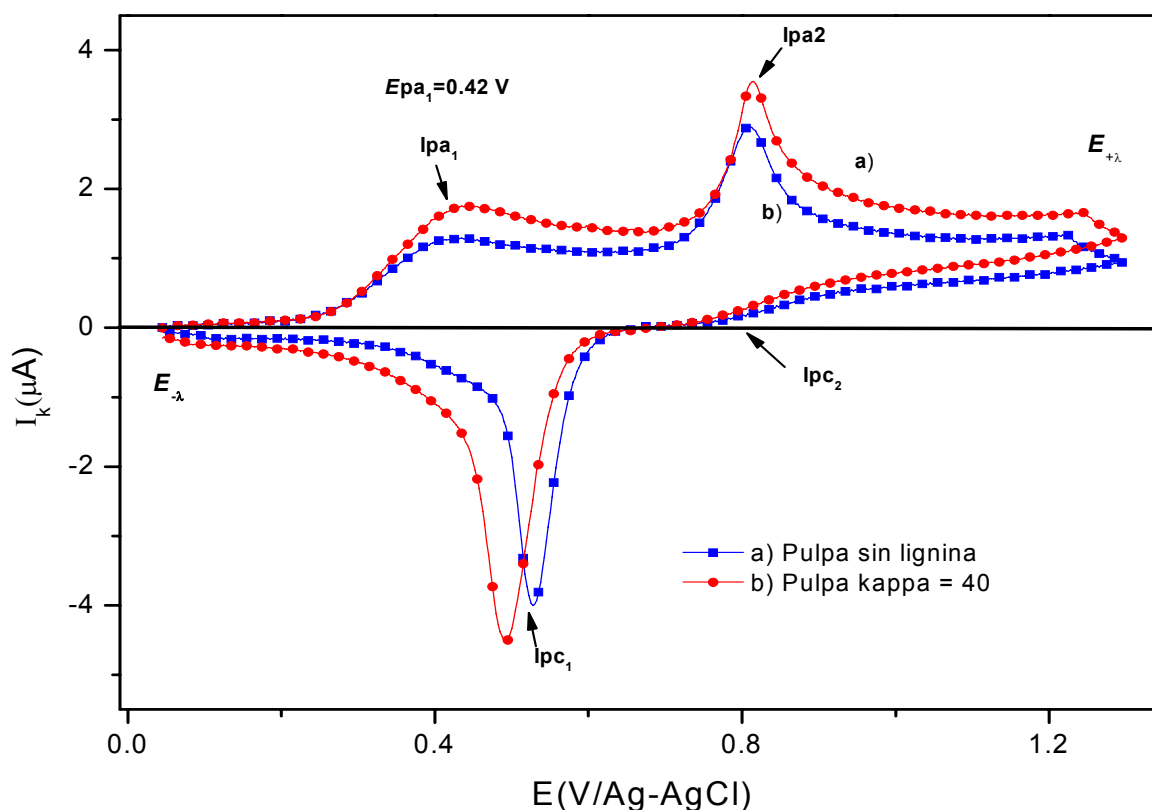


Figura 5.2.2.2 Voltamperogramas de una disolución 0.3 mM de ABTS^{2-} en buffer de acetatos 100 mM a pH = 4.5 en presencia de pulpa de papel a) sin lignina y b) con kappa= 40.

En el potencial de oxidación $E_{pa1} = 0.42 \text{ V/Ag-AgCl}$, se observó un incremento de la intensidad de corriente catalítica (I_k), desde $I_k = 0.81 \mu\text{A}$ (I_{pa1} , figura 5.2.2.2a) a $I_k = 1.31 \mu\text{A}$ (I_{pa1} , figura 5.2.2.2b), cuando la disolución de ABTS^{2-} estaba en presencia de lignina. Esto se relacionó directamente con la cantidad de lignina presente, que originó un incremento en la intensidad de corriente de acuerdo con lo descrito en la figura 5.2.2.1.

Para garantizar la reproducibilidad de este resultado, se realizaron tres determinaciones de I_k de la disolución de ABTS^{2-} en presencia de pulpa de papel con lignina. La figura. 5.2.2.3 muestra los voltamperogramas de la misma disolución de ABTS^{2-} en presencia de pulpa de papel con un valor de número kappa= 40 y sus respectivas repeticiones.

Resultados y discusiones

Los valores de potencial de oxidación de la disolución de $\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^{\cdot-}$ y $\text{ABTS}^{\cdot-}/\text{ABTS}^0$ en presencia de pulpa de papel con un número kappa= 40, no coincidieron entre sus respectivas repeticiones, así como las intensidades catalíticas de cada uno.

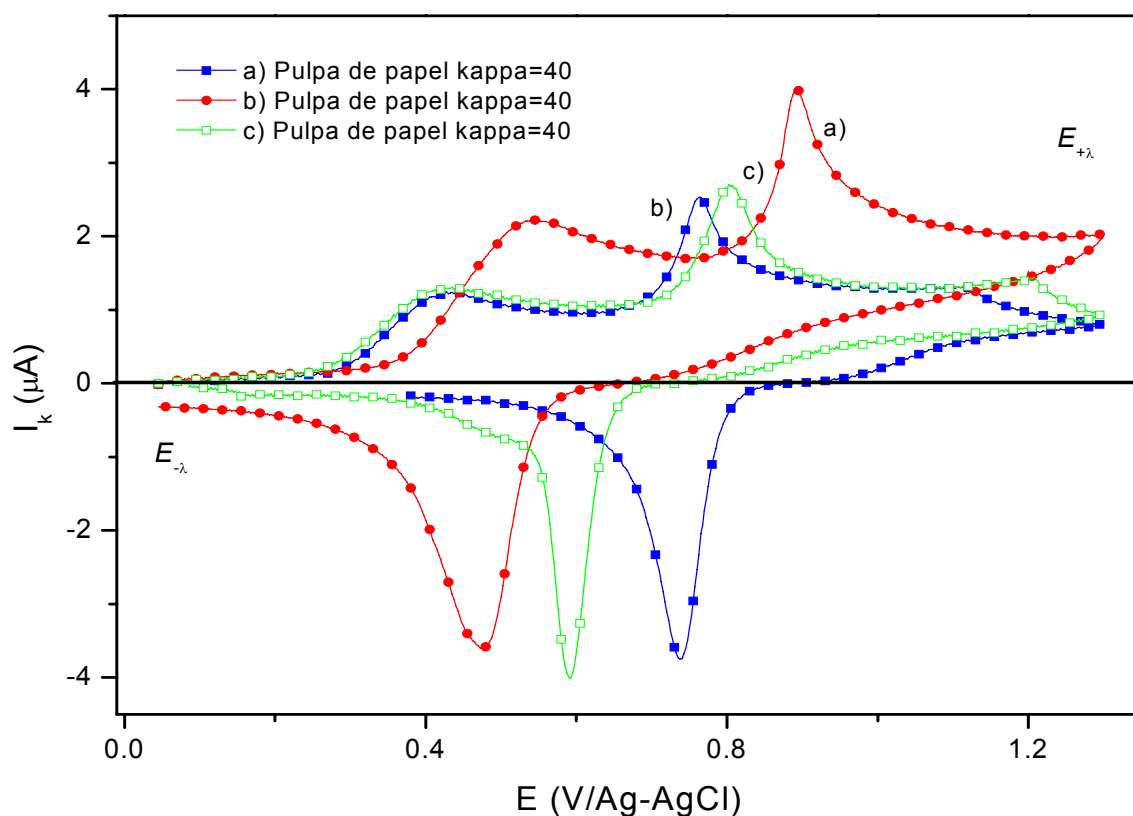


Figura 5.2.2.3. Voltamperogramas de una disolución 0.3 mM de ABTS^{2-} en una disolución 0.1 M de amortiguador de acetatos pH= 4.5 en presencia de pulpa de papel con un valor de número kappa=40 y sus respectivas repeticiones.

La ausencia de reproducibilidad entre las determinaciones de I_k , con pulpa de papel que posee el mismo contenido de lignina (número kappa), indicó que el experimento, no es confiable para establecer un método alternativo, que determine la cantidad de materia oxidable presente en pulpa de papel, por medio de la técnica de voltamperometría cíclica.

Por lo que fue necesario abandonar la posibilidad de establecer el método, realizando en lo sucesivo, las determinaciones del número kappa por el procedimiento convencional de retrotitulación.

5.3 CARACTERIZACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ABTS²⁻.

Con el fin de conocer mejor el sistema, y realizar una caracterización más completa del ABTS²⁻ para realizar así, las determinaciones cinéticas de la oxidación de ABTS²⁻ a ABTS^{•-} con enzima inmovilizada, se realizó la caracterización por espectrofotometría UV-Vis de una disolución de ABTS²⁻ y una disolución de ABTS^{•-} para determinar las longitudes de máxima absorción de ambos.

La figura 5.3.1 muestra los espectros de absorción y las señales que presentaron las disoluciones empleadas: la figura 5.3.1a, muestra el espectro de absorción de una disolución de ABTS²⁻ 0.04 mM en una disolución 0.1 M de amortiguador de acetatos pH=5, mientras que 5.3.1b, muestra el espectro de absorción de una disolución 0.04 mM de ABTS^{•-}. La disolución de ABTS²⁻ fue incolora, y las longitudes de onda en las que su presencia fue detectada se encuentran en el intervalo del ultravioleta cercano [54].

El espectro correspondiente a la especie ABTS²⁻ presentó dos máximos de absorción en las longitudes de onda $\lambda = 224$ nm y $\lambda = 340$ nm, mientras que el espectro de ABTS^{•-} presentó máximos de absorción en las longitudes de onda $\lambda = 394$ nm, $\lambda = 414$ nm, $\lambda = 646$ nm y $\lambda = 728$. En ambos casos, la concentración total de la disolución fue la misma, esto se hizo

evidente a $\lambda = 370$ nm, longitud de onda en la que se localiza el punto isobéptico, que representa un equilibrio entre dos especies, el ABTS^{2-} (especie reducida) y $\text{ABTS}^{\cdot-}$ (especie oxidada).

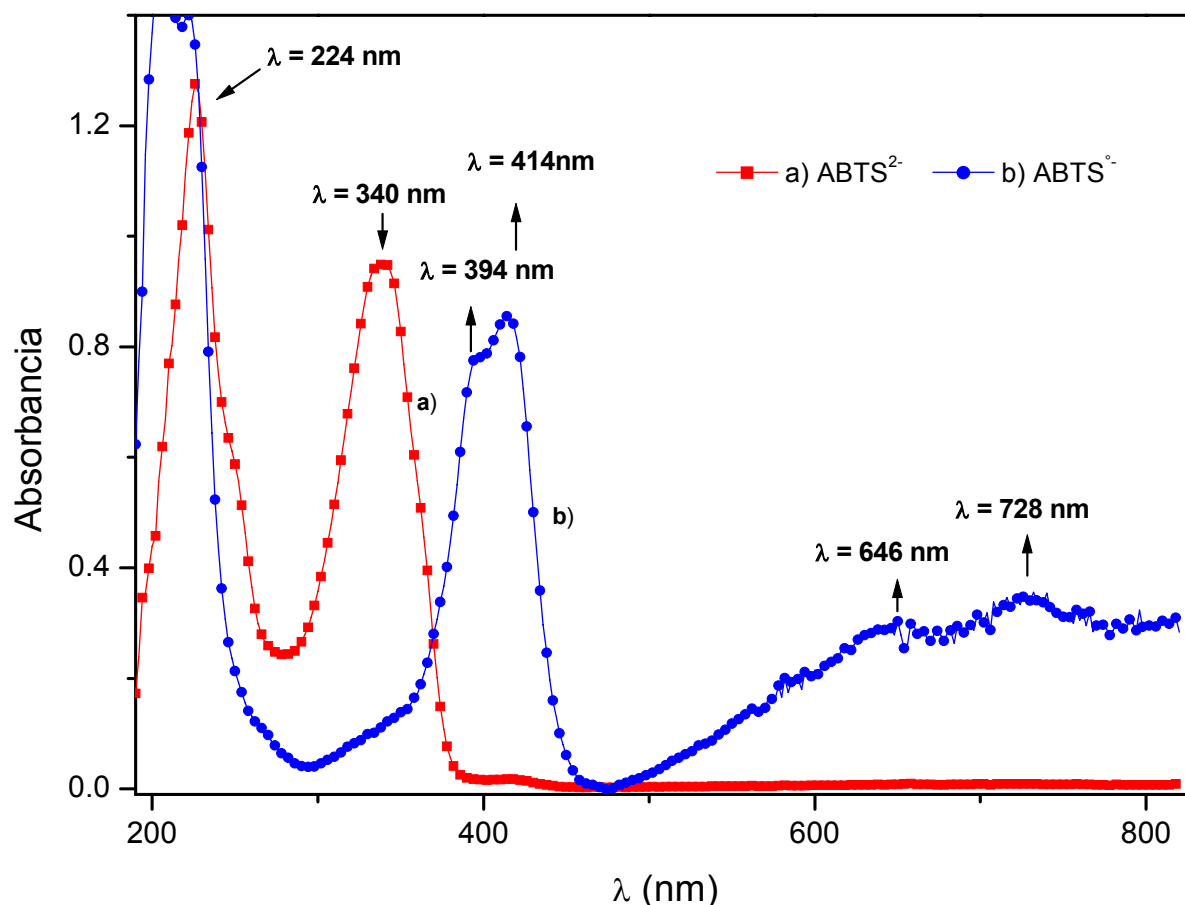


Figura 5.3.1 Espectros de absorción de una disolución 0.04 mM de ABTS^{2-} y $\text{ABTS}^{\cdot-}$ en disolución 0.1 M de amortiguador de acetatos pH= 5.

La longitud de onda característica para determinar la presencia de ABTS^{2-} fue $\lambda = 340$ nm, que coincidió con la absorción del grupo azo [55]. El ABTS^{2-} , posee otros grupos cromóforos, entre los que se encuentran los grupos sulfónicos que absorben en $\lambda = 224$ nm y presentan equilibrios ácido-base [44], de acuerdo con lo descrito previamente en la figura 2.7.1.

Resultados y discusiones

Cuando el ABTS^{2-} se oxidó a $\text{ABTS}^{\bullet-}$, se obtuvo una disolución cuyos máximos de absorción se observaron en $\lambda = 394 \text{ nm}$, $\lambda = 414 \text{ nm}$, $\lambda = 646 \text{ nm}$ y $\lambda = 728 \text{ nm}$. Muchos trabajos [41,11,12,16,46,56,43] en los que se realizaron estudios cinéticos de enzimas con actividad oxidasa, emplean diferentes longitudes de onda alrededor de $\lambda = 420 \text{ nm}$ para determinar cuantitativamente la presencia del radical $\text{ABTS}^{\bullet-}$; sin embargo, existe un fenómeno que se presenta durante la oxidación de ABTS^{2-} a $\text{ABTS}^{\bullet-}$ que depende de la concentración de ABTS^{2-} presente en la disolución. En presencia de ABTS^{2-} , el $\text{ABTS}^{\bullet-}$ revela una menor absorción entre 414 nm y 420 nm , con respecto a la que se registra por una disolución en donde sólo hay $\text{ABTS}^{\bullet-}$, así como un desplazamiento en la señal a $\lambda = 646 \text{ nm}$, causada por la formación de un complejo $\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^{\bullet-}$. Por lo tanto, en la señal $\lambda = 420 \text{ nm}$ se subestima la presencia del radical, pero es posible corregir este efecto empleando un factor de 1.33. En $\lambda = 728 \text{ nm}$, no se muestra un efecto debido a la formación del complejo antes mencionado [47], de tal forma que la longitud de onda con menor interferencia espectral y en consecuencia, más recomendable para la determinación cuantitativa de $\text{ABTS}^{\bullet-}$ es $\lambda = 728 \text{ nm}$. La información anterior, permite garantizar que $\lambda = 728 \text{ nm}$ y $\lambda = 340 \text{ nm}$, son las longitudes de onda más confiables para realizar la determinación cuantitativa de $\text{ABTS}^{\bullet-}$ y ABTS^{2-} respectivamente.

Otra forma de realizar determinaciones cuantitativas de $\text{ABTS}^{\bullet-}$ cuando se obtiene a partir de la oxidación de ABTS^{2-} y se mantiene la concentración total constante, es considerando las concentraciones de ABTS^{2-} y $\text{ABTS}^{\bullet-}$ de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{ABTS}_{\text{total}} = \text{ABTS}^{2-} + \text{ABTS}^{\bullet-}$$

Resultados y discusiones

Como se conocía la concentración de $ABTS_{total}$, y se pudo determinar la de $ABTS^{2-}$ espectrofotométricamente, entonces $ABTS^{*} = ABTS_{total} - ABTS^{2-}$.

De acuerdo con la ley de Beer [54], la absorbancia en disoluciones diluidas, está linealmente relacionada con la concentración de la especie absorbente, la longitud de paso óptico y el coeficiente de extinción molar

$$A = \epsilon bc$$

donde

A = absorbancia

b = longitud de paso óptico [cm]

c = Concentración [M]

Para conocer la concentración precisa de $ABTS^{2-}$, fue necesario conocer el coeficiente de extinción molar (ϵ). Para ello, se realizó la construcción de una curva de calibración, empleando disoluciones con distintas concentraciones de $ABTS^{2-}$. La figura 5.3.2, muestra la representación gráfica de los datos experimentales de absorbancia en $\lambda = 340$ nm, como una función de la concentración, utilizando cuatro distintas concentraciones de $ABTS^{2-}$ (5×10^{-5} M, 2.5×10^{-5} M, 1×10^{-5} M y 5×10^{-6} M) en una disolución 0.1 M de amortiguador de acetatos pH= 4.

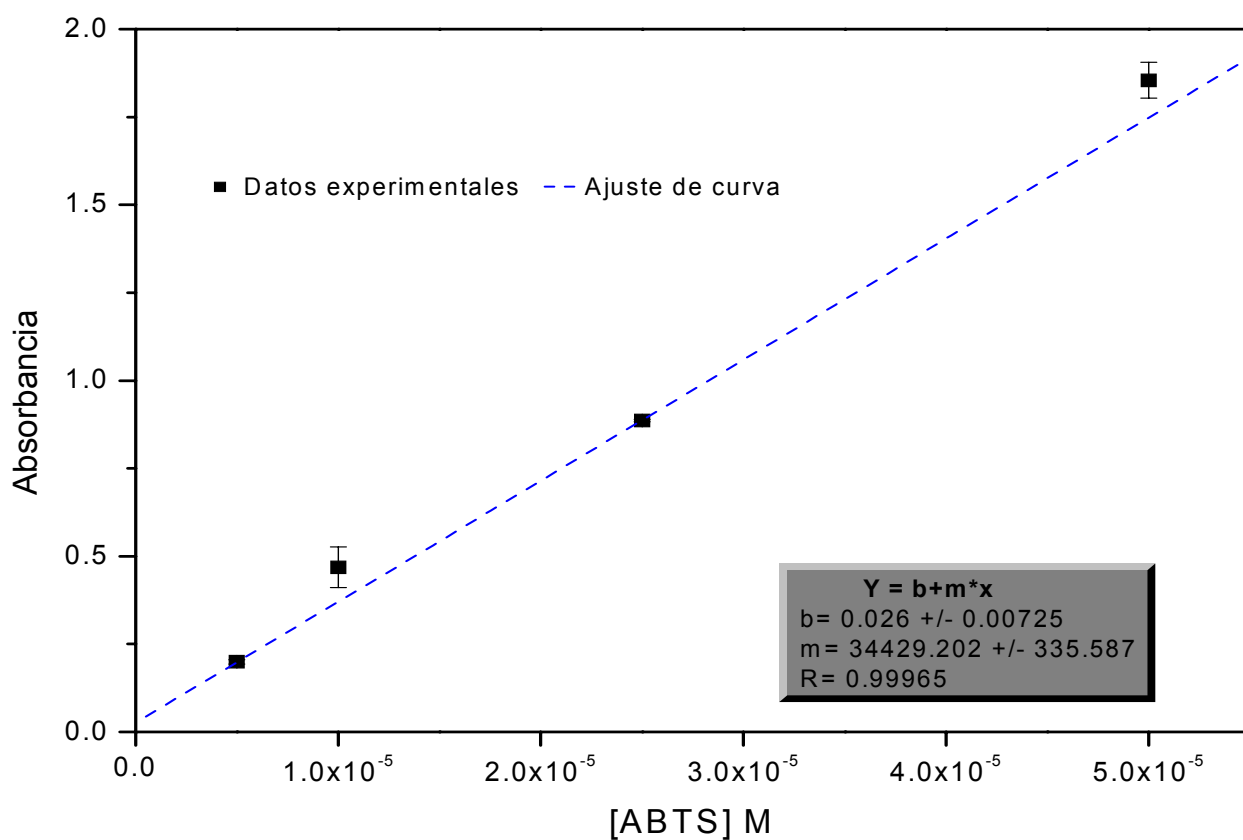


Figura. 5.3.2. Representación gráfica de los datos experimentales del cambio de absorbancia a 340 nm con respecto a la concentración, empleando disoluciones de $ABTS^{2-}$ a diferentes concentraciones en disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 4. El ajuste lineal y los parámetros obtenidos (m , b y R^2) también se muestran en la figura.

Los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración de $ABTS^{2-}$ empleada, se ajustaron a una recta, cuya pendiente corresponde al valor del coeficiente de extinción molar (ϵ). El valor estimado fue de $\epsilon_{340nm} = 34,400 \pm 336. L\ cm^{-1}\ mol^{-1}$.

Los resultados obtenidos, permitieron en lo sucesivo, determinar la concentración de $ABTS^{\bullet-}$ en una mezcla a partir de la oxidación de $ABTS^{2-}$.

5.4 EFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA LACASA EN DISOLUCIÓN

El diseño experimental, en el cual se fundamentó el presente trabajo, consideró la oxidación *in situ* de lignina en pulpa de papel empleando el sistema enzima inmovilizada/mediador ABTS²⁻. La inmovilización de la enzima, tuvo como fin, hacer posible su reutilización y brindarle estabilidad, además de llevar a cabo la oxidación de ABTS²⁻ y separar la enzima de la disolución de ABTS²⁻/ABTS⁻ de forma sencilla y rápida, una vez terminada la reacción.

Con el propósito de obtener información que permitiera establecer las mejores condiciones en las que se llevara a cabo la oxidación de ABTS²⁻, en presencia de la enzima lacasa inmovilizada, fue necesario realizar la determinación de actividad de la enzima en disolución. Se probaron dos valores de pH, para comparar las actividades obtenidas con la enzima lacasa en disolución.

La figura. 5.4.1, muestra los datos experimentales obtenidos del cambio de absorbancia a $\lambda = 728$ nm, para la determinación de la actividad de la enzima lacasa de Novo Nordsdisk en una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 4 y pH= 5 respectivamente, a 25 °C, utilizando una disolución 0.1 mM de ABTS²⁻. La actividad enzimática se obtuvo como función del valor de la pendiente de la recta obtenida con cada valor de pH.

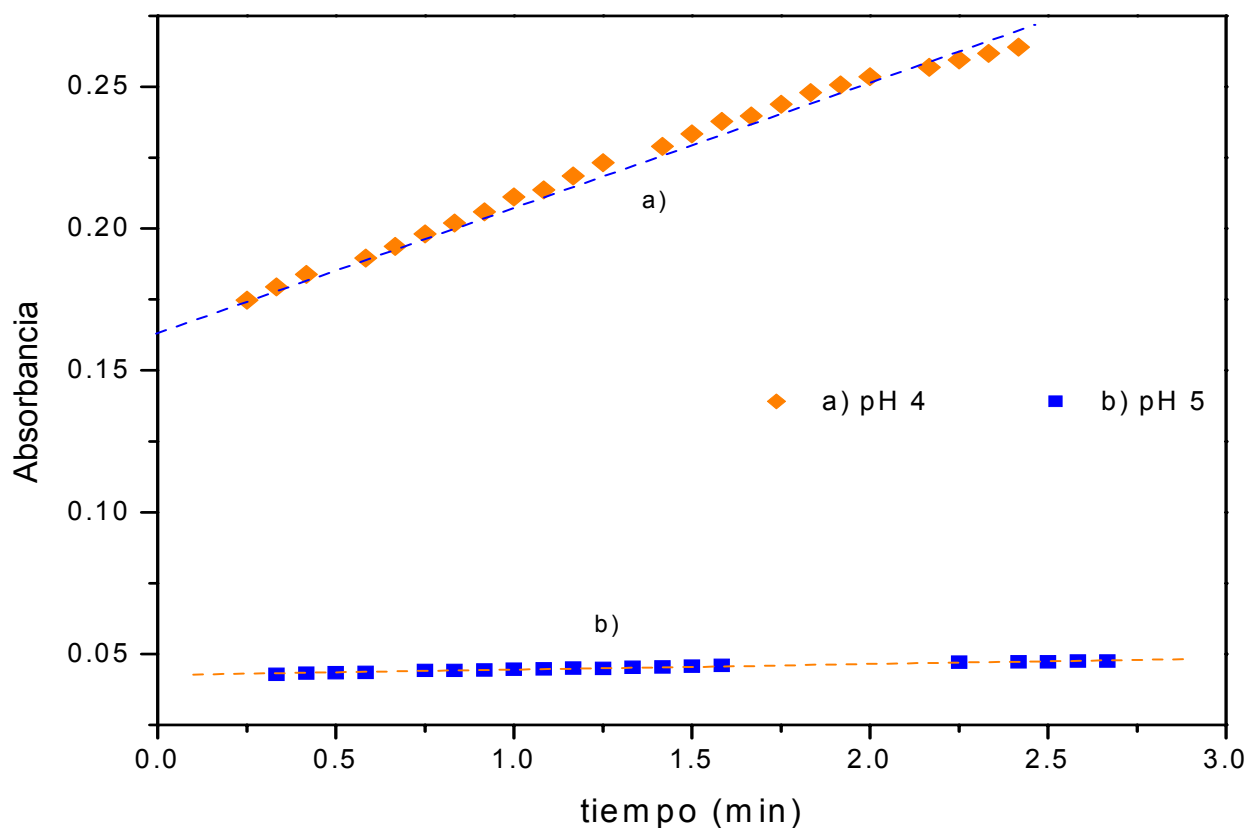


Figura 5.4.1. Representación gráfica del cambio de absorbancia a $\lambda = 728$ nm, para la determinación de la actividad de la enzima lacasa empleando una disolución 0.1 mM de ABTS²⁺ en disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH = 4 y pH = 5.

Las unidades de actividad obtenidas fueron de 1.17 U/mL y 0.05 U/mL para pH = 4 y pH = 5 respectivamente. A pH = 4, se incrementó la actividad enzimática hasta un 95 %, con respecto a pH = 5.

La lacasa de *Myceliophthora thermophila*, posee un punto isoeléctrico $pI = 4.2$ y los valores óptimos de pH en los que opera la enzima se encuentran entre 4 y 7 [56]. Algunos autores [57] sugieren que el pH interviene directamente en el aumento en la interacción de los sitios de cobre T1 y T3 de la enzima; así como con la alta concentración de protones en

Resultados y discusiones

el medio, que favorece el intercambio de electrones entre ambos cobres, de acuerdo con estudios realizados con la lacasa de *Rhus vernicifera*. De acuerdo con informes previos [58], cuando el pH disminuye una unidad de pH = 5 a pH = 4, no se modifica la velocidad de formación del complejo enzima-sustrato y su grado de disociación es bajo. Sin embargo existe mayor afinidad de la enzima por el sustrato, debido probablemente a cambios conformacionales de la enzima en medio ácido.

La información obtenida, permitió establecer las condiciones bajo las cuales fue posible realizar la oxidación de una disolución de ABTS²⁻ de manera rápida y eficaz, obteniendo actividades enzimáticas más altas, empleando una disolución amortiguadora de acetatos con un valor de pH= 4, para la obtención de ABTS^{•-}. Estas condiciones se utilizaron para la determinación de la actividad enzimática de la lacasa inmovilizada.

5.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASA INMOVILIZADA

De acuerdo con la información obtenida en la sección 5.4, se procedió a realizar la determinación de la actividad de la enzima inmovilizada, empleando cristales de sílica gel, como soporte de la enzima. La figura 5.5.1 muestra el cambio de absorbancia a $\lambda = 728$ nm en función del tiempo, empleado para la determinación de la actividad de la enzima lacasa inmovilizada en cristales de sílica, empleando una disolución 0.1 mM de ABTS²⁻ en una disolución 0.1 M de amortiguador de acetatos a pH= 4 a 25 °C. El aumento en la

absorbancia indica la aparición del radical $ABTS^{\bullet-}$ y el cambio de su concentración con respecto al tiempo.

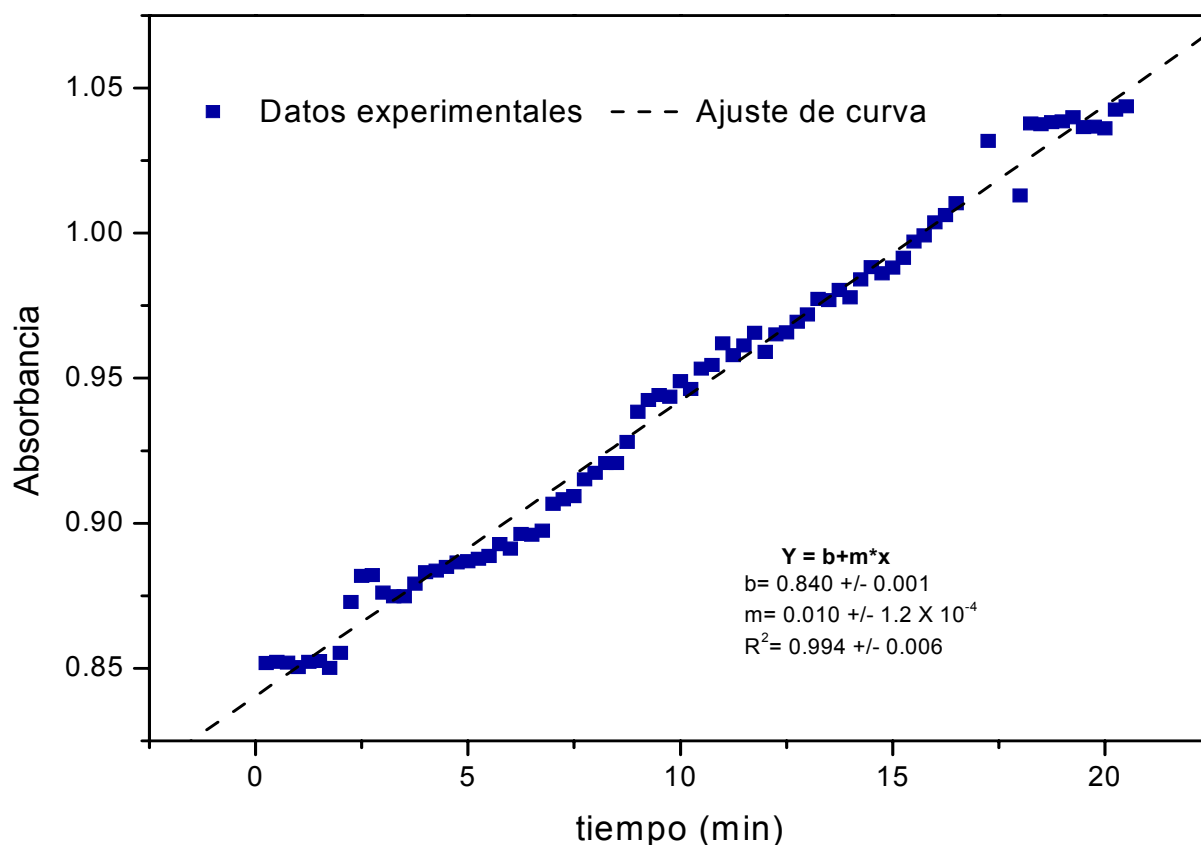


Figura 5.5.1. Representación gráfica del cambio de absorbancia a $\lambda=728$ nm para la determinación de la actividad de la enzima lacasa inmovilizada en cristales de sílica gel, empleando una disolución 0.1 mM de $ABTS^{2-}$ en una disolución 0.1 M de amortiguador de acetatos pH= 4.

La actividad de la enzima inmovilizada en cristales de sílica gel, tuvo un valor de 0.121 U/mL, que corresponde a 0.046 U/mg de proteína. La actividad obtenida, fue considerablemente menor, con respecto a la actividad registrada a pH= 4, según informes previos [58].

Resultados y discusiones

La considerable disminución de la actividad de la enzima en estas condiciones, se explicó por el método de inmovilización. Tal disminución puede ser un indicativo de limitaciones debidas a la difusión, al aumentar el área de contacto hasta cerca de $10 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$, si la inmovilización no fue efectiva, la alta solubilidad de la enzima, facilita su liberación desde el soporte hacia el medio, cuando se encuentra en disoluciones acuosas [59].

El método de inmovilización empleado, posee baja retención de la actividad enzimática, y proporciona poca estabilidad a la enzima debido a los cambios conformacionales que sufre [60]. La estabilidad de la enzima, es un criterio muy importante para la evaluación del método, debido a que una razón fundamental por la que se inmoviliza una enzima, es la de proporcionarle estabilidad y hacerla menos susceptible al ataque de algunos microorganismos, además de facilitar su reutilización [61].

Después de la inmovilización de la enzima, se determinó que posee una actividad de 0.046 U/mg de proteína a pH= 4. Bajo estas condiciones se realizó la oxidación de una disolución 0.28 mM de ABTS^{2-} durante 6 días, para la obtención de $\text{ABTS}^{\cdot-}$. Los espectros de absorción obtenidos no mostraron la presencia de ABTS^0 , cuya señal característica se presenta a $\lambda= 214 \text{ nm}$, $\lambda= 256 \text{ nm}$ y $\lambda= 298 \text{ nm}$, e indica que la enzima inmovilizada no es capaz de realizar la oxidación de ABTS^{2-} hasta la formación de ABTS^0 , como lo informan referencias previas [17]. La eficiencia de oxidación que se obtuvo al término de seis días, fue del 34 %. La mezcla ABTS^{2-} $\text{ABTS}^{\cdot-}$ obtenida, se empleó durante la oxidación de lignina en pulpa de papel.

5.6 DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD MÁXIMA DE LA MEZCLA ABTS²⁻/ABTS⁻ CAPAZ DE REACCIONAR CON LIGNINA DE PULPA DE PAPEL.

El objetivo general que persiguió este trabajo, fue realizar el acoplamiento de un proceso químico organosolv y un proceso enzimático de reciclaje de ABTS²⁻, para disminuir el contenido de lignina presente en pulpa de papel. Para tal fin, se llevó a cabo el proceso de oxidación, de ABTS²⁻ a ABTS⁻ empleando enzima inmovilizada (sección 5.5). En dicho proceso se obtuvo una mezcla ABTS²⁻/ABTS⁻, con un 34 % de oxidación. La disolución obtenida, fue separada de la enzima y utilizada para la oxidación de lignina en pulpa de papel, como un tratamiento previo al proceso organosolv y así determinar la disminución del número kappa, asociada a distintas cantidades empleadas de oxidante en la mezcla.

Para determinar la cantidad de oxidante en la mezcla (ABTS²⁻/ ABTS⁻) que favoreciera la máxima disminución de lignina en pulpa de papel, se diseñó un experimento en el cual se empleó la mezcla de ABTS²⁻ y ABTS⁻ obtenida con enzima inmovilizada. Se determinó el efecto de este pretratamiento, en la disminución del número kappa, con respecto a un control que no poseía el efecto de pretratamiento. Las cantidades empleadas fueron: 0.8, 0.95 y 1.1 mmoles totales de la mezcla ABTS²⁻/ABTS⁻ por cada 3 gramos de pulpa. Las muestras de cada pretratamiento, se sometieron posteriormente al proceso organosolv durante una hora, y se compararon con un testigo sin pretratamiento. La determinación del número kappa de las muestras con efecto de pretratamiento, se realizó después de someterlas al proceso organosolv. Debido a que la pulpa de papel presentó señales de

ABTS^{•-} adsorbido (color verde característico), se tomó esta decisión, pues la presencia de ABTS^{•-} o ABTS²⁻ podría sobrestimar el valor del número kappa. La figura 5.7.1 muestra la disminución del número kappa, por efecto de la cantidad de la mezcla de ABTS²⁻/ABTS^{•-} empleada.

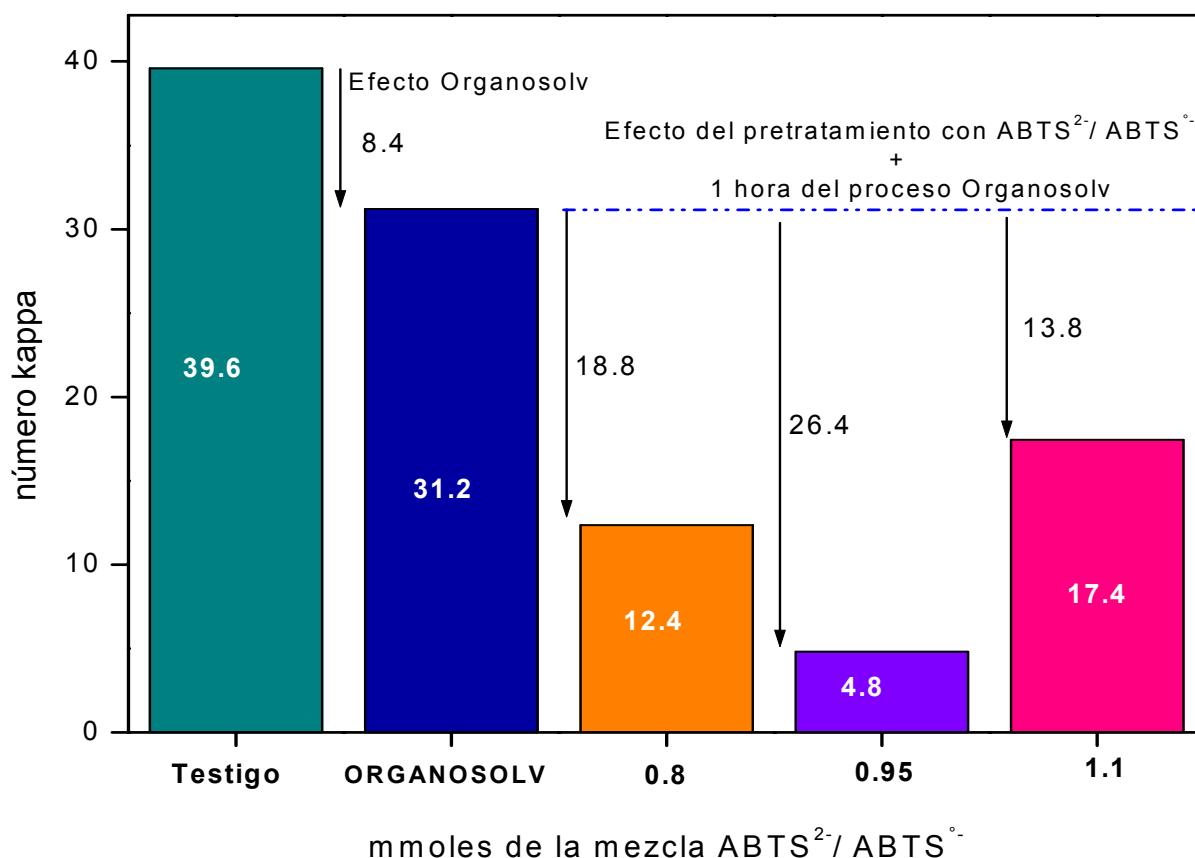


Figura 5.6.1. Efecto de diferentes cantidades de la mezcla de ABTS²⁻/ABTS^{•-} empleada como pretratamiento, asociado a un proceso organosolv, para la disminución del número kappa de muestras de pulpa de papel.

Cuando solamente se aplicó el proceso organosolv a una muestra de pulpa de papel con un número kappa de ≈ 40 , se observó un efecto de disminución del número kappa de 8.4 unidades, mientras que la diferencia entre las muestras que se sometieron a un pretratamiento, con respecto a la anterior, presentan una disminución del número kappa

Resultados y discusiones

superior a 17 unidades, con la mezcla $\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^-$ empleada. Cuando la cantidad total de la mezcla fue de 0.8 mmoles totales, se obtuvo una disminución de 18.8 unidades del número kappa; cuando se emplearon 0.95 mmoles, se obtuvo una disminución de 26.4 unidades, mientras que cuando la cantidad de la mezcla empleada aumentó a 1.1 unidades, el valor del número kappa descendió sólo 13.8 unidades. Esta disminución no estuvo asociada con el proceso organosolv, ya que se debió sólo al efecto del pretratamiento con la mezcla $\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^-$, como se observa en la figura 5.6.1 al comparar estos valores con la disminución debida únicamente al proceso organosolv.

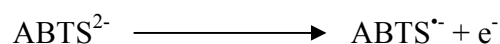
Es visible, que la deslignificación, pudo llevarse a cabo en ausencia de la enzima, y las cantidades de ABTS^- empleadas, fueron mucho menores a las que se han usado en los sistemas lacasa- ABTS^{2-} , con las mismas cantidades de pulpa [11]. De acuerdo al planteamiento hecho en la sección 5.2.2, una cantidad de lignina, requiere de cierta cantidad de ABTS^- para ser oxidada y tiene una disminución de número kappa asociada. Esto es consistente con la disminución del número kappa que se obtuvo con 0.8 y 0.95 mmoles de la mezcla; sin embargo, no explica la disminución que se presenta con 1.1 mmoles, ya que es mucho menor a la que se esperaba de acuerdo con la cantidad de la mezcla empleada. La causa de la baja disminución de número kappa observada con 1.1 mmoles, puede explicarse debido a la sobrestimación de la cantidad de lignina, por la presencia de ABTS^{2-} o ABTS^- adsorbido en la pulpa, durante la determinación del número kappa. De acuerdo con el balance teórico realizado, empleando las reacciones que dan fundamento al número kappa, se encontró que el 34 % de ABTS^- presente en la mezcla

empleada en cada pretratamiento, no fue suficiente para oxidar la cantidad de lignina presente en la pulpa. Por esta razón, en la siguiente sección se realiza una revisión detallada del contenido de materia oxidable, así como las cantidades de $ABTS^{\bullet-}$ requeridos para su eliminación.

5.6.1 Relación entre el número kappa y la cantidad requerida de $ABTS^{\bullet-}$ durante la reacción de oxidación de lignina.

La determinación teórica de la cantidad de $ABTS^{\bullet-}$ necesaria para la reacción con lignina en pulpa de papel, se realizó con base en el fundamento de las titulaciones que se realizan con permanganato de potasio en medio ácido, para la estimación del número kappa, en la que $KMnO_4$ intercambia 5 electrones con I_2 y éste a su vez, intercambia 2 electrones en la reacción con $Na_2S_2O_3$, (ver sección 2.8).

Una vez que se estableció el consumo teórico de $Na_2S_2O_3$, fue posible calcular los equivalentes de $ABTS^{\bullet-}$ necesarios para disminuir en una unidad el número kappa, si sabemos que el $ABTS^{2-}$ intercambia un electrón en la reacción de oxidación a $ABTS^{\bullet-}$, de acuerdo con la siguiente ecuación química:



La relación estequiométrica que el $ABTS^{2-}$ guarda con permanganato es de 5 equivalentes; entonces, es posible establecer el consumo de $ABTS^{\bullet-}$ para la disminución de unidades

equivalentes del número kappa. La tabla 5.6.1.1 muestra los valores teóricos de ABTS⁻ necesarios para la disminución del número kappa.

Tabla 5.6.1.1 Valores teóricos de la cantidad de ABTS⁻ necesario para la disminución del número kappa.

MnO₄⁻ consumido por fibra (mmol)	MnO₄⁻ residual (mmol)	MnO₄⁻ residual (meq)	I₂ generado por MnO₄⁻ Residual (meq)	Tiosulfato (S₂O₃) (meq)	(ABTS⁻) (mmol)	Número Kappa asociado
2	0	0	0	0	0	100
1	1	5	5	10	5	50
0.4	1.6	8	8	16	8	20
0	2	10	10	20	10	0

De acuerdo con los datos de la tabla anterior, se requieren 9.5 mmoles de ABTS⁻ para obtener un número kappa= 4.7 unidades, esta cantidad es muy superior a la empleada en los experimentos descritos en la sección 5.6. De tal forma, que es necesario corroborar los resultados obtenidos, determinando con precisión el número de moles de ABTS⁻ empleados en la reacción. Una aportación importante de este trabajo, basado en el balance teórico realizado, fue la implementación de una nueva escala, que permitió establecer de forma clara, el valor del número kappa, en función de los equivalentes químicos de las disoluciones empleadas durante la determinación. Esto difiere del método en el que se utiliza el algoritmo establecido con base en la determinación de lignina Klason en pulpa de papel, que se emplea comúnmente [22]. Los apéndices I y II, muestran la comparación del cálculo del número kappa con el método propuesto, basado en los equivalentes químicos de KMnO₄, Na₂S₂O₃ y su comparación con los valores de número kappa obtenidos por el algoritmo basado en la determinación de lignina Klason. A partir de esta sección, habrá que notar que los valores del número kappa, fueron informados, de acuerdo con la nueva escala establecida y no con base en el algoritmo antes citado. Como un ejemplo, se informa el

número kappa de muestras sometidas durante una hora al proceso organosolv, cuyo valor, de acuerdo a la antigua escala era de 30.8 unidades, mientras que en la nueva escala, corresponde a un valor de 40.

Antes de realizar el experimento, que permitiera comprobar los resultados de la sección 5.6, se detectó un cambio en la concentración total de la mezcla de $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$, durante el monitoreo de la reacción de oxidación de esta disolución, en presencia de enzima inmovilizada en cristales de sílica gel, por lo que fue necesario realizar primero, una evaluación del posible efecto de la enzima inmovilizada.

5.7 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE ADSORCIÓN DE $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$ EN CRISTALES DE SÍLICA

Durante la oxidación de una disolución de $ABTS^{2-}$ que se emplearía para la oxidación de lignina en pulpa de papel, se observó que la presencia de enzima inmovilizada en cristales de sílica gel, generó un cambio en la concentración de $ABTS^{\cdot-}$. Para evaluar la magnitud del problema, se determinó el cambio de la concentración total de la disolución, mediante la obtención de los espectros de absorción UV-Vis, de una disolución 2.84 mM de $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$, que fue preoxidada con enzima inmovilizada. La figura 5.7.1, muestra los espectros de absorción que se obtuvieron después de 5 días de oxidación y luego de 96 horas de contacto con enzima inmovilizada en cristales de sílica gel. La figura 5.7.1, muestra la disminución en todo el espectro de absorción, antes y después de 96 horas de contacto de la mezcla de $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$ con la enzima inmovilizada.

Resultados y discusiones

Para determinar la concentración de ABTS^{2-} y $\text{ABTS}^{\cdot-}$ que se perdió por efecto del contacto con la enzima inmovilizada, se obtuvieron los valores de absorbancia a dos longitudes de onda $\lambda = 340 \text{ nm}$ y $\lambda = 728 \text{ nm}$, que corresponden a las longitudes de máxima absorción de ABTS^{2-} y $\text{ABTS}^{\cdot-}$ respectivamente.

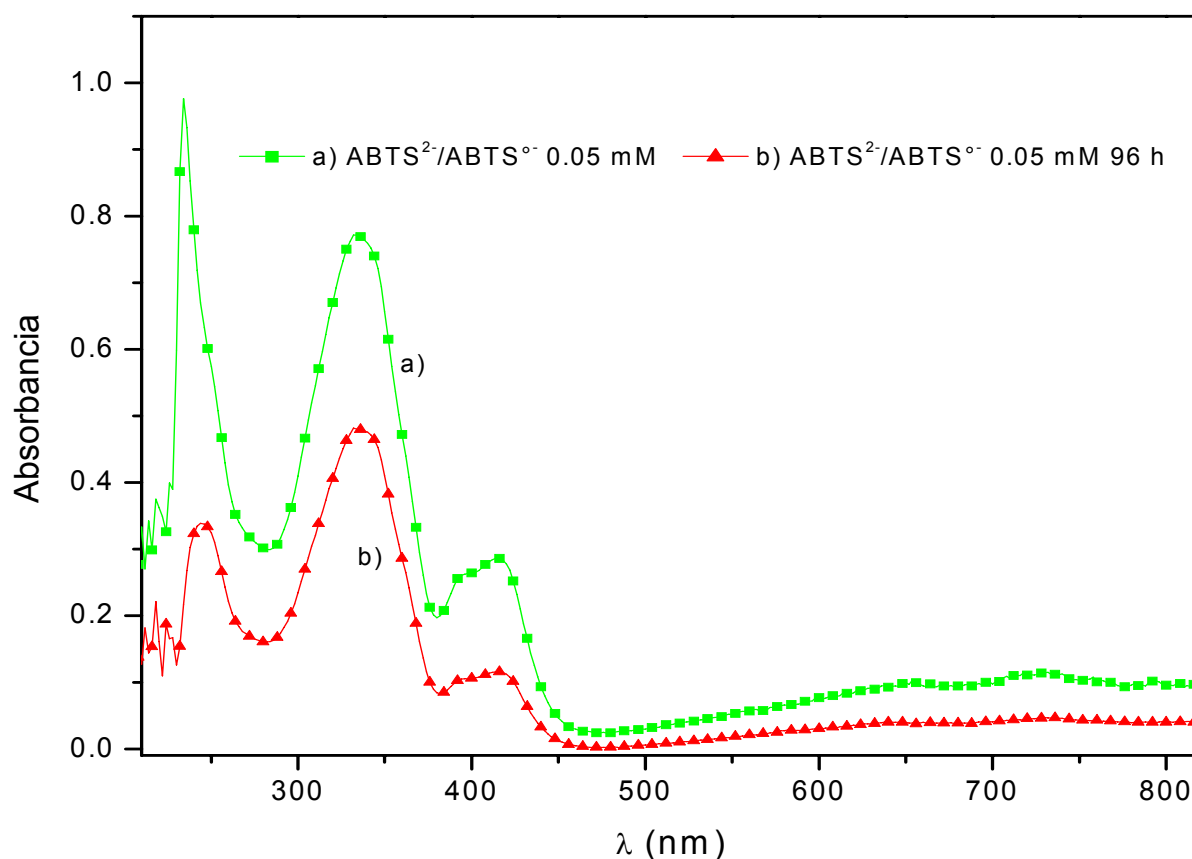


Figura 5.7.1 Espectros de absorción de una disolución 0.05 mM de $\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^{\cdot-}$ antes y después de 96 horas de contacto con enzima inmovilizada en cristales de sílica gel.

El equilibrio entre las especies ABTS^{2-} y $\text{ABTS}^{\cdot-}$, que se caracteriza por la presencia de un punto isobéptico, no se presentó en los espectros de absorción, lo que indica un cambio en la concentración total de la disolución. El cambio de la concentración de ABTS^{2-} y $\text{ABTS}^{\cdot-}$ en la disolución antes y después de 96 horas se obtuvo empleando los coeficientes de

Resultados y discusiones

extinción molar $\epsilon_{340\text{ nm}} = 34,400$ y $\epsilon_{728\text{ nm}} = 15,230$ de acuerdo a referencias [17] y haciendo uso de la ley de Beer [54]. La tabla 5.7.1 muestra los valores de concentración obtenidos para ABTS^{2-} , $\text{ABTS}^{\bullet-}$ y la concentración total de la disolución.

Tabla 5.7.1. Concentración de ABTS^{2-} , $\text{ABTS}^{\bullet-}$ y $\text{ABTS}_{\text{total}}$ de una disolución antes y después de 96 horas de contacto con enzima inmovilizada en cristales de sílica.

tiempo	$A^{\lambda=340\text{ nm}}$	$[\text{ABTS}^{2-}]$ M	$A^{\lambda=728\text{ nm}}$	$[\text{ABTS}^{\bullet-}]$ M	$[\text{ABTS}_{\text{total}}]$ M
Inicial	0.775	1.1×10^{-4}	0.112	0.36×10^{-4}	1.5×10^{-4}
96 horas	0.482	0.7×10^{-4}	0.046	0.15×10^{-4}	0.85×10^{-4}

La disolución de ABTS^{2-} empleada para la obtención de $\text{ABTS}^{\bullet-}$, tenía una concentración de 2.84 mM originalmente. Al cabo de 5 días de oxidación (tiempo inicial) la concentración total de la disolución disminuyó a 0.15 mM, esto representa el 95 % de pérdida de $\text{ABTS}_{\text{total}}$. Después de 96 horas disminuyó a 0.085 mM, que representa una disminución del 43 % con respecto al tiempo inicial y 97 % con respecto a la concentración de $\text{ABTS}_{\text{total}}$ original. Desde el tiempo inicial y hacia 96 horas, la concentración de ABTS^{2-} disminuyó 36 %, mientras que la concentración de $\text{ABTS}^{\bullet-}$ disminuyó 58 %. De acuerdo con los valores antes mencionados, el $\text{ABTS}^{\bullet-}$ presenta la mayor disminución de concentración después de 96 horas en presencia de enzima inmovilizada. Existen muchas posibles causas por las que se modificó la concentración del ABTS^{2-} y $\text{ABTS}^{\bullet-}$ en presencia de la enzima inmovilizada. Una de ellas, pudo ser la adsorción en la superficie del soporte de sílica, o una reacción entre el glutaraldehído no ligado y ABTS^{2-} o $\text{ABTS}^{\bullet-}$, aunque no se tiene claro el mecanismo. Puede descartarse que el cambio en la concentración se debiera a la

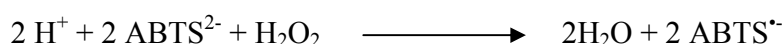
formación de $ABTS^0$, ya que no se encontraron señales a $\lambda= 214$ nm, $\lambda= 256$ nm y $\lambda= 298$ nm que son longitudes de onda características de $ABTS^0$, además de que el $ABTS^{2-}$ solo se oxida hasta $ABTS^{\cdot-}$ en presencia de enzima inmovilizada, de acuerdo a informes previos [17].

Lo cierto es, que modificar la concentración de $ABTS^{2-}$ y $ABTS^{\cdot-}$ que se emplea en una reacción de oxidación cuantitativa de lignina, puede traer problemas analíticos, y da muestra de que la elección del método de inmovilización es sumamente importante.

Para garantizar el control de la concentración del $ABTS^{\cdot-}$ durante la reacción con lignina en pulpa de papel, se buscaron nuevas alternativas de oxidación, que permitieran obtener beneficios adicionales como simplicidad y velocidad de oxidación, así como la obtención de un mayor porcentaje de oxidación y mejor eficiencia; empleando agentes químicos y descartando el uso de la enzima inmovilizada. Dichas alternativas, incluyen la oxidación de $ABTS^{2-}$ con peróxido de hidrógeno en medio ácido.

5.8 OXIDACIÓN DE $ABTS^{2-}$ CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MEDIO ÁCIDO

Sin perder de vista el objetivo de realizar la oxidación *in situ* de lignina en pulpa de papel empleando $ABTS^{\cdot-}$, aún sin el uso de enzima inmovilizada, se buscaron alternativas mediante las cuales fuese posible oxidar $ABTS^{2-}$ de manera cuantitativa. La alternativa planteada de acuerdo a la siguiente reacción, fue oxidar el $ABTS^{2-}$ con peróxido de hidrógeno en medio ácido.



La ecuación química, indica que la oxidación de 2 moles de ABTS^{2-} requiere un mol de peróxido de hidrógeno y la presencia de una cantidad suficiente de iones H^+ (pH ácido). Por tal motivo, se planteó una estrategia de trabajo en la cual se probaron tres tipos de ácidos, de distinta naturaleza y con constantes de acidez diferentes. Los ácidos empleados fueron: ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido acético, y se utilizaron en distintas concentraciones, para comprobar su efecto en la oxidación de ABTS^{2-} .

5.8.1 Oxidación de ABTS^{2-} con H_2O_2 en una disolución 0.05 M de ácido clorhídrico.

Se realizó primero la oxidación de 2 mL de una disolución 0.025 mM de ABTS^{2-} con ácido clorhídrico 0.05 M, mediante la adición de 10 alícuotas de 50 μL de peróxido de hidrógeno 2.5 mM; las adiciones se realizaron *in situ* en la celda de cuarzo y los espectros de absorción UV-Vis, se adquirieron inmediatamente después de la adición de cada alícuota. La figura 5.8.1.1 presenta los espectros de absorción obtenidos después de la adición de cada alícuota de peróxido de hidrógeno a la disolución de ABTS^{2-} indicada.

Los espectros de absorción mostraron siete longitudes de onda que presentaron máximos de absorción característicos y corresponden a $\lambda = 223 \text{ nm}$, $\lambda = 273 \text{ nm}$, $\lambda = 319 \text{ nm}$, $\lambda = 394 \text{ nm}$, $\lambda = 414 \text{ nm}$, $\lambda = 646 \text{ nm}$ y $\lambda = 728 \text{ nm}$. Después de cada alícuota de peróxido de hidrógeno adicionada se observó el abatimiento de las señales registradas a $\lambda = 223 \text{ nm}$, $\lambda = 273 \text{ nm}$ y $\lambda = 319 \text{ nm}$, así como el aumento de absorción en las señales a $\lambda = 394 \text{ nm}$, $\lambda = 414$

Resultados y discusiones

nm, $\lambda=646$ nm y $\lambda=728$ nm. Un punto isobéptico se presentó en $\lambda=365$ nm, lo cual indicó la presencia de especies en equilibrio ($\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^{\cdot-}$).

La disminución de la absorción a $\lambda=223$ nm, $\lambda=273$ nm y $\lambda=319$ nm indicaron el consumo de ABTS^{2-} , mientras que el incremento en las longitudes de onda ubicadas a $\lambda=394$ nm, $\lambda=414$ nm $\lambda=646$ nm y $\lambda=728$ nm, indicaron la presencia de $\text{ABTS}^{\cdot-}$, lo que confirmó la reacción de H_2O_2 con ABTS^{2-} .

Los valores de absorbancia a $\lambda=319$ nm, mostraron una disminución del 33 %, desde la primera hasta la última adición de peróxido, mientras que la absorbancia a $\lambda=728$ nm mostró un incremento de 1.4 %, esto se explica por el coeficiente de extinción molar, pues valor de $\epsilon_{728\text{ nm}}$, es más bajo que el de $\epsilon_{340\text{ nm}}$. Lo anterior indica, que se obtuvo el 33 % de oxidación de la disolución, a pesar del exceso tanto de H_2O_2 como de HCl, que debió favorecer la reacción. El porcentaje de oxidación obtenido por este procedimiento y bajo estas condiciones, fue similar al que se obtuvo empleando la enzima inmovilizada. La tabla 5.8.1.1 muestra los cambios de absorbancia (ΔA) registrados tras la adición de alícuotas de H_2O_2 a dos diferentes longitudes de onda ($\lambda=319$ y $\lambda=728$ nm).

La disolución 0.05 M de HCl tuvo una concentración de iones H^+ equivalente a la concentración analítica del ácido, debido a que se disocia completamente en disolución acuosa. Así, la disolución tuvo un valor de $\text{pH}=1.3$.

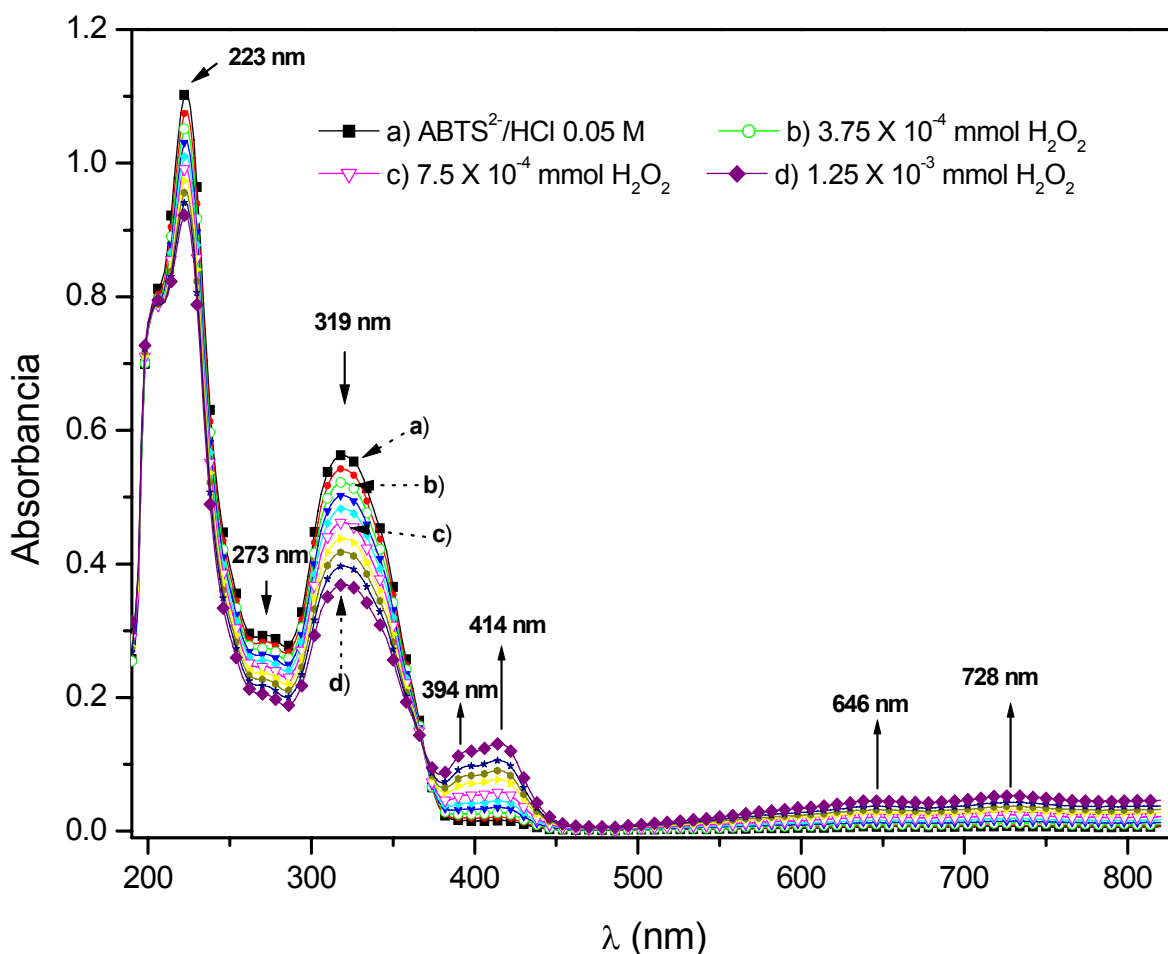


Figura 5.8.1.1 Espectros de absorción de 2 mL de una disolución 0.025 mM de ABTS²⁻ en ácido clorhídrico 0.05 M obtenidos después de la adición de 10 alícuotas de 50 μL de una disolución 2.5 mM de peróxido de hidrógeno.

De acuerdo con la estequiometría, la concentración de protones requerida para la reacción con H₂O₂, fue del doble que la de ABTS²⁻ utilizada, por lo que la especie H⁺, se encontró en exceso para favorecer la reacción. Cuando el pH de la disolución fue menor a 1, la especie ABTS²⁻ se encontró protonada (H₂ABTS), de acuerdo con el esquema de equilibrio ácido-base mostrado en la figura. 2.7.1. A valores de pH cercanos a 2.2 ± 0.3 se encontró el pK de la especie HABTS⁻ [41] que es capaz de establecer un equilibrio con ABTS²⁻, y se observa por medio del ensanchamiento de la banda, así como su desplazamiento de $\lambda = 340$ nm, que

Resultados y discusiones

es la longitud característica de ABTS^{2-} , hacia $\lambda = 319$ nm. El pH empleado en este apartado, es menor que el propuesto por algunos autores, para el equilibrio ácido base ($\text{HABTS}^- / \text{ABTS}^{2-}$) [44]. Sin embargo, este equilibrio no pudo descartarse, y la presencia del H_2ABTS a este valor de pH tampoco. El ensanchamiento de la banda a $\lambda = 319$ nm, así como la señal a $\lambda = 273$ nm, podrían explicarse por la protonación del cromóforo que involucra a los grupos sulfonato, situados en los extremos del ABTS^{2-} .

Tabla 5.8.1.1 Registro de absorbancia a $\lambda = 319$ nm y $\lambda = 728$ nm tras la adición de H_2O_2 a 2 mL de una disolución 0.025 mM de ABTS^{2-} en HCl 0.05 M.

mmol de H_2O_2	$A_{\lambda=319}$	$\Delta A_{\lambda=319}$	$A_{\lambda=728}$	$\Delta A_{\lambda=728}$
1.25×10^{-4}	0.568	0	9×10^{-4}	0
3.75×10^{-4}	0.522	0.046	0.018	0.017
7.5×10^{-4}	0.463	0.059	0.026	8×10^{-3}
1.25×10^{-3}	0.378	0.084	0.065	0.039

Los valores que presenta la tabla 5.8.1.1 permitieron realizar la estimación numérica del abatimiento en la absorbancia que presentó la disolución de ABTS^{2-} a $\lambda = 319$ nm y el aumento a $\lambda = 728$ nm. Los ΔA indican el cambio de absorbancia entre una adición de peróxido y otra. Así, se determinó el porcentaje de oxidación, cercano al 33 % que es similar al que se obtuvo utilizando enzima inmovilizada. Es posible, que aumentar la concentración del ácido, sea un factor que favorezca más la oxidación del ABTS^{2-} , por lo que se probó incrementar su concentración al doble.

5.8.2 Oxidación de $ABTS^{2-}$ con H_2O_2 en una disolución 0.1 M de ácido clorhídrico.

Los resultados obtenidos en la sección anterior, indicaron que era necesario modificar las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción entre peróxido de hidrógeno y $ABTS^{2-}$ a fin de aumentar el porcentaje de oxidación. La primera alternativa, fue elevar la cantidad de H^+ presentes durante la reacción, aumentando la concentración del ácido al doble.

Las adiciones de 10 alícuotas de 50 μ L de peróxido de hidrógeno 2.5 mM, para la oxidación de 2 mL de una disolución 0.025 mM de $ABTS^{2-}$ disuelto en una disolución 0.1 M de ácido clorhídrico, se hicieron directamente en la celda de cuarzo. La adquisición de los espectros de absorción UV-Vis, se realizó inmediatamente después de la adición de cada alícuota. La figura 5.8.2.1 muestra los espectros de absorción obtenidos.

Los espectros de absorción mostraron ocho longitudes de onda, que presentaron máximos de absorción característicos a $\lambda= 206$ nm, $\lambda= 273$ nm, $\lambda= 319$ nm, $\lambda= 394$ nm, $\lambda= 414$ nm, $\lambda= 646$ nm y $\lambda= 728$ nm. Después de la adición de cada alícuota de peróxido de hidrógeno se observó el abatimiento de las señales registradas a $\lambda= 223$ nm, $\lambda= 273$ nm y $\lambda= 319$ nm, que indicó el consumo de $ABTS^{2-}$, mientras que el aumento en las señales a $\lambda= 394$ nm, $\lambda= 414$ nm, $\lambda= 646$ nm y $\lambda= 728$ nm, indicaron la presencia de $ABTS^{\cdot-}$ y confirmaron nuevamente la reacción de $ABTS^{2-}$ con H_2O_2 . El punto isobéptico se presentó a $\lambda= 369$ nm, corroborando la presencia del equilibrio entre dos especies ($ABTS^{2-}$ y $ABTS^{\cdot-}$).

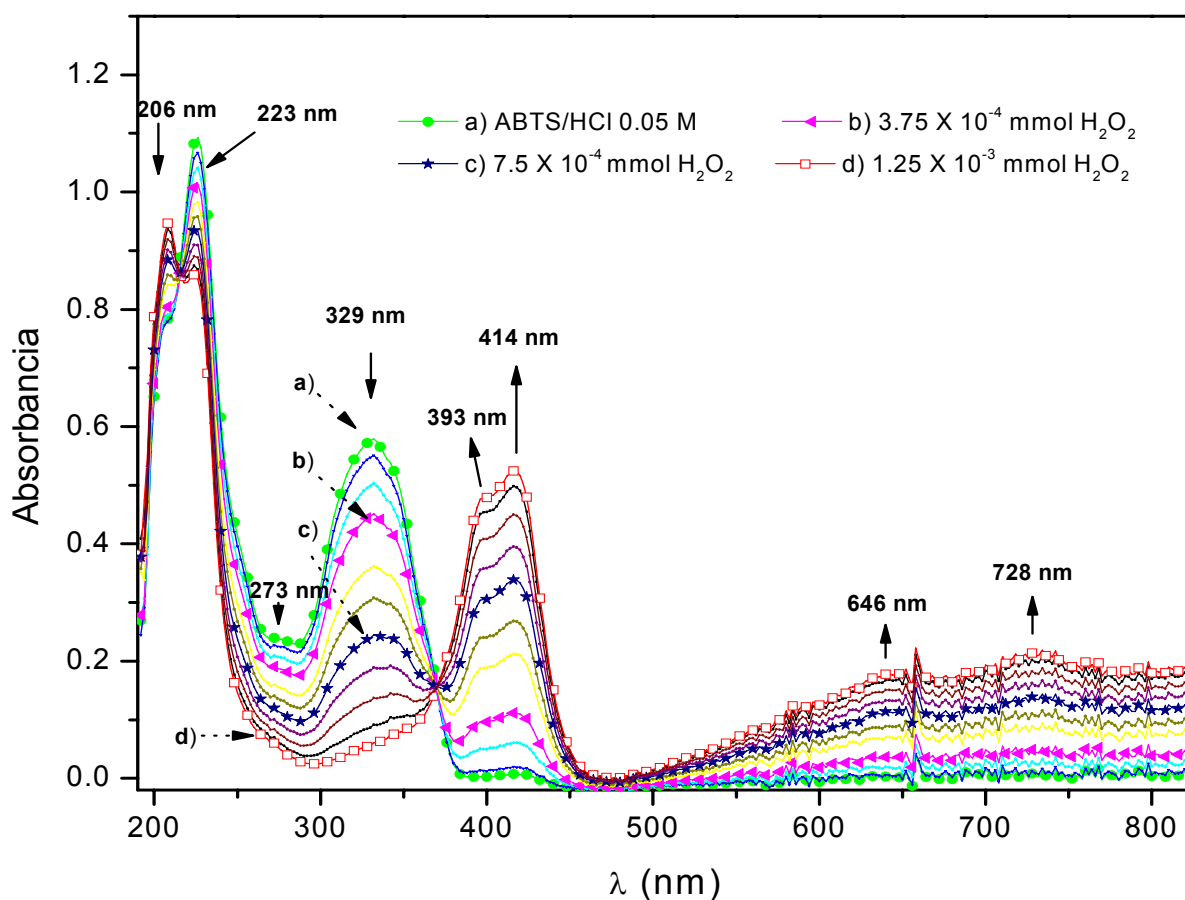


Figura 5.8.2.1. Espectros de absorción UV-Vis de una disolución 0.025 mM de ABTS²⁻ empleando una disolución 0.1 M de ácido clorhídrico, tras la adición de 10 alícuotas de 50 μ L de peróxido de hidrógeno 2.5 mM

Nuevamente, se comprobó la oxidación de ABTS²⁻ a ABTS[•] [17,47] por la reacción con H₂O₂. No obstante, la principal característica de los espectros de absorción obtenidos con la disolución 0.1 M de HCl, fue la oxidación completa de la disolución de ABTS²⁻, que se alcanzó después de la adición de las alícuotas de peróxido. Los valores que presenta la tabla 5.8.2.1 permitieron realizar una estimación numérica del abatimiento en la absorbancia que presentó la disolución de HABTS[•] a $\lambda = 329$ nm y su correspondiente incremento a $\lambda = 728$ nm.

Resultados y discusiones

Tabla 5.8.2.1 Registro de absorbancias a $\lambda= 319$ nm y $\lambda= 728$ nm, tras la adición de H_2O_2 a 2 mL de una disolución 0.025 mM de $ABTS^{2-}$ en HCl 0.1 M.

mmol de H_2O_2	$A^{\lambda=329}$	$\Delta A^{\lambda=329}$	$A^{\lambda=728}$	$\Delta A^{\lambda=329}$
0	0.588	0	0.01	0
3.75×10^{-4}	0.451	0.137	0.049	0.039
7.5×10^{-4}	0.244	0.344	0.137	0.088
1.25×10^{-3}	0.068	0.176	0.223	0.086

Los ΔA indican el cambio de absorbancia entre una adición de peróxido y otra. De acuerdo con estos valores, se obtuvo una disminución de casi el 100 % de la absorbancia en $\lambda= 329$ nm desde la primera, hasta la última adición. La disminución de la absorbancia correspondiente a $\lambda= 329$ nm alcanzó el 98 %, mientras que el incremento a $\lambda= 728$ nm, que indica la formación de $ABTS^{\cdot-}$, alcanzó el 96 %. De esta forma, se obtuvo la oxidación completa de $ABTS^{2-}$ con la formación del $ABTS^{\cdot-}$.

De acuerdo con lo indicado en la sección 5.8.1, la concentración de H^+ determina el equilibrio ácido-base entre $ABTS^{2-}$ y $HABTS^-$ o H_2ABTS , que se observó como el desplazamiento de la banda de absorción a $\lambda= 329$ nm. La concentración de la disolución 0.1 M de ácido clorhídrico da un valor de $pH= 1$, favoreció la formación de la especie H_2ABTS en la disolución. Aunque fue probable que la presencia de H_2ABTS dependa del pK_a del par $H_2ABTS / HABTS^-$ así como del pH del medio.

Además de la diferencia del porcentaje de oxidación obtenido con ambas concentraciones de HCl, se observaron desplazamientos de los valores de absorción característica, en el intervalo $310 \text{ nm} < \lambda < 350 \text{ nm}$, así como la amplitud de la banda que se encontró en $\lambda= 329$ nm y la que se encontró desplazada 10 nm en $\lambda= 319$ nm con HCl 0.05 M.

Resultados y discusiones

La figura 5.8.2.2 muestra los espectros de absorción de las disoluciones de ABTS^{2-} obtenidos con ambas concentraciones de HCl con y sin H_2O_2 , su comparación con el espectro obtenido con una disolución 0.1 M de amortiguador de acetatos (Buffer) pH= 4 y el desplazamiento de las señales de máxima absorción en el intervalo $310 \text{ nm} < \lambda < 350 \text{ nm}$.

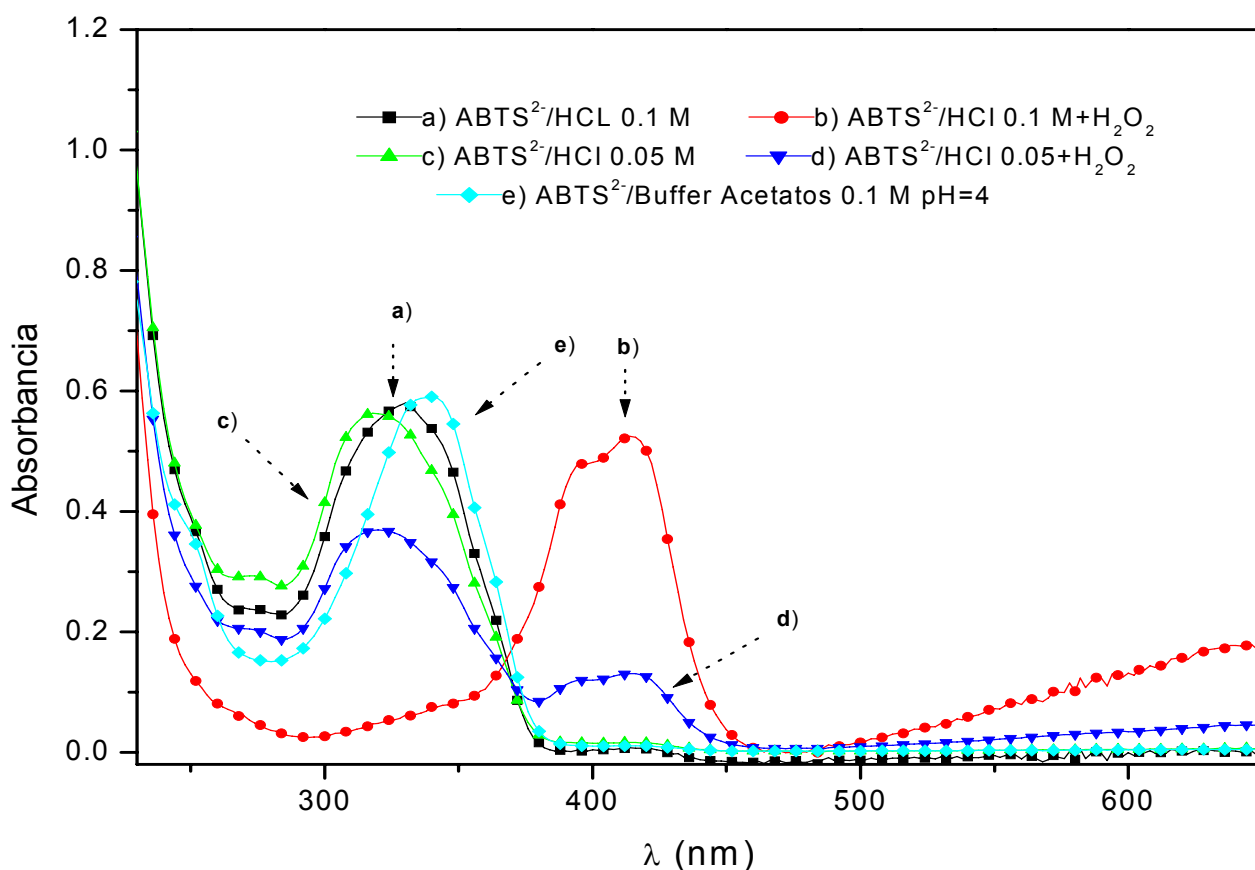


Figura 5.8.2.2 Espectros de absorción de disoluciones 0.025 mM de ABTS^{2-} empleando disoluciones 0.05 M y 0.1 M de HCl con y sin H_2O_2 y su comparación con el espectro de absorción de ABTS^{2-} en una disolución 0.1 M de amortiguador de acetatos pH= 4.

El cambio en la relación de absorbancia a $\lambda = 394 \text{ nm}$ y $\lambda = 414$, presentes con HCl 0.05 M y HCl 0.1 M después de las diez adiciones de peróxido, se debió a la cantidad de ABTS^{2-} presente en la disolución, pues en el primer caso, la oxidación fue incompleta [62].

Resultados y discusiones

Cuando se empleó una disolución 0.1 M de HCl, se buscó aumentar la concentración de H^+ en el medio, para favorecer la formación de $ABTS^{\cdot-}$, no obstante, fue posible también modificar las condiciones de reacción, utilizando un ácido con características distintas, que pudieran proporcionar resultados aún mejores, que los obtenidos con HCl, durante la oxidación de $ABTS^{2-}$, por lo que se decidió emplear H_2SO_4 .

5.8.3 Oxidación de $ABTS^{2-}$ con H_2O_2 en una disolución 0.05 M de ácido sulfúrico.

Una vez que se determinó el efecto que tuvo el HCl, en la oxidación del $ABTS^{2-}$, se buscó analizar las consecuencias que tendría emplear un ácido con características completamente distintas, en la oxidación de $ABTS^{2-}$, para lo cual se buscó utilizar la misma concentración de H^+ que en la sección 5.8.1. Con la finalidad de observar modificaciones durante la oxidación de 2 mL de una disolución de $ABTS^{2-}$, por efecto del tipo de ácido, empleando una disolución 0.05 M de H_2SO_4 como donador de H^+ . La figura 5.8.3.1 muestra el espectro de absorción de la disolución de $ABTS^{2-}$ en ácido sulfúrico (figura 5.8.3.1a) y los espectros obtenidos tras realizar diez adiciones de 50 μ L de H_2O_2 2.5 mM sucesivamente (figuras 5.8.3.1b-d).

Las señales a $\lambda= 394$ nm, $\lambda= 414$ nm, $\lambda= 646$ nm y $\lambda= 728$ nm, que son características del $ABTS^{\cdot-}$ mostraron un incremento en la absorción tras cada adición de H_2O_2 , con la correspondiente disminución en la absorción a $\lambda= 310$ nm, que se asignó a la presencia del $HABTS^-$ [41]. Sin embargo, esta señal no desapareció por completo, incluso durante la última adición de H_2O_2 . Además de $\lambda= 310$ nm, se presentaron nuevos máximos de

Resultados y discusiones

absorción a $\lambda = 236$ nm y $\lambda = 273$ nm, que también mostraron un abatimiento después de cada adición de peróxido. El punto isobéptico, que indicó el equilibrio entre las especies ABTS^{2-} y $\text{ABTS}^{\cdot-}$ se ubicó a $\lambda = 359$ nm.

De acuerdo con la concentración de la disolución de ABTS^{2-} , tanto la concentración del H_2O_2 como la del ácido, se encontraban en exceso. Con base en la estequiometría de la reacción, las condiciones son adecuadas para oxidar por completo el ABTS^{2-} .

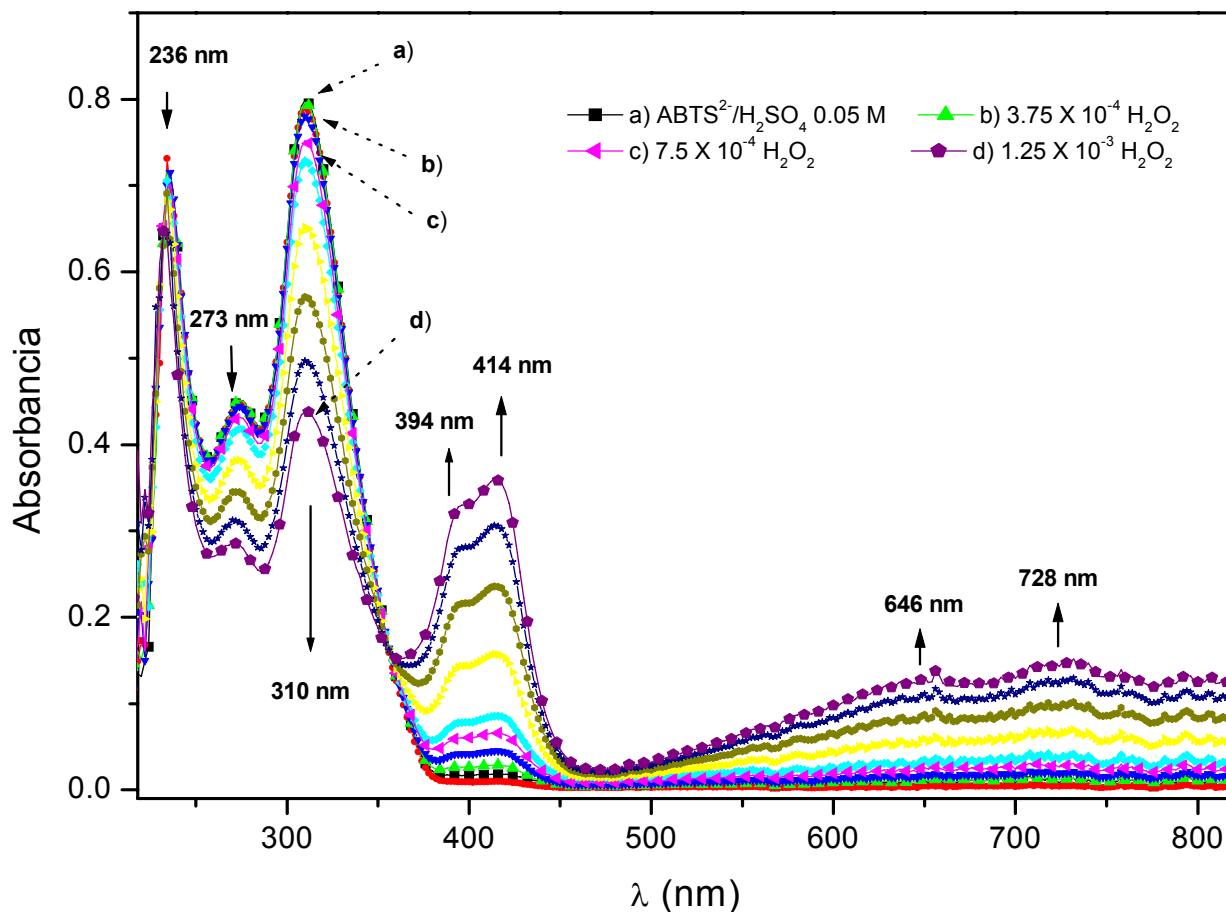


Figura 5.8.3.1. Espectros de absorción UV-Vis de una disolución 0.025 mM de ABTS^{2-} empleando una disolución 0.05 M de H_2SO_4 obtenidos tras cada adición de 10 alícuotas de 50 μL de peróxido de hidrógeno 2.5 mM.

Resultados y discusiones

Sin embargo, no se llevó a cabo la oxidación completa del ABTS^{2-} . La disminución de absorbancia que se alcanzó a $\lambda = 310 \text{ nm}$ fue de 42 % mientras que el incremento que se obtuvo a $\lambda = 728 \text{ nm}$ fue de 10 %, de acuerdo a los cambios de absorbancia registrados en la tabla 5.8.3.1. Esto planteó la posibilidad de determinar un posible efecto cinético en la oxidación de ABTS^{2-} por parte del H_2O_2 en presencia de H_2SO_4 . Así, una vez que se realizó la última adición de H_2O_2 , se obtuvieron los espectros de absorción después de 1 hora, 2.5 horas y 3.5 horas. La figura 5.8.3.2 muestra los espectros de absorción obtenidos sin adición de H_2O_2 (figura 5.8.3.2a) y con adición de 1.25×10^{-3} moles de H_2O_2 a $t=0 \text{ h}$, $t=1 \text{ h}$, $t=2.5 \text{ h}$ y $t=3.5 \text{ h}$ (figuras 5.8.3.2b-d).

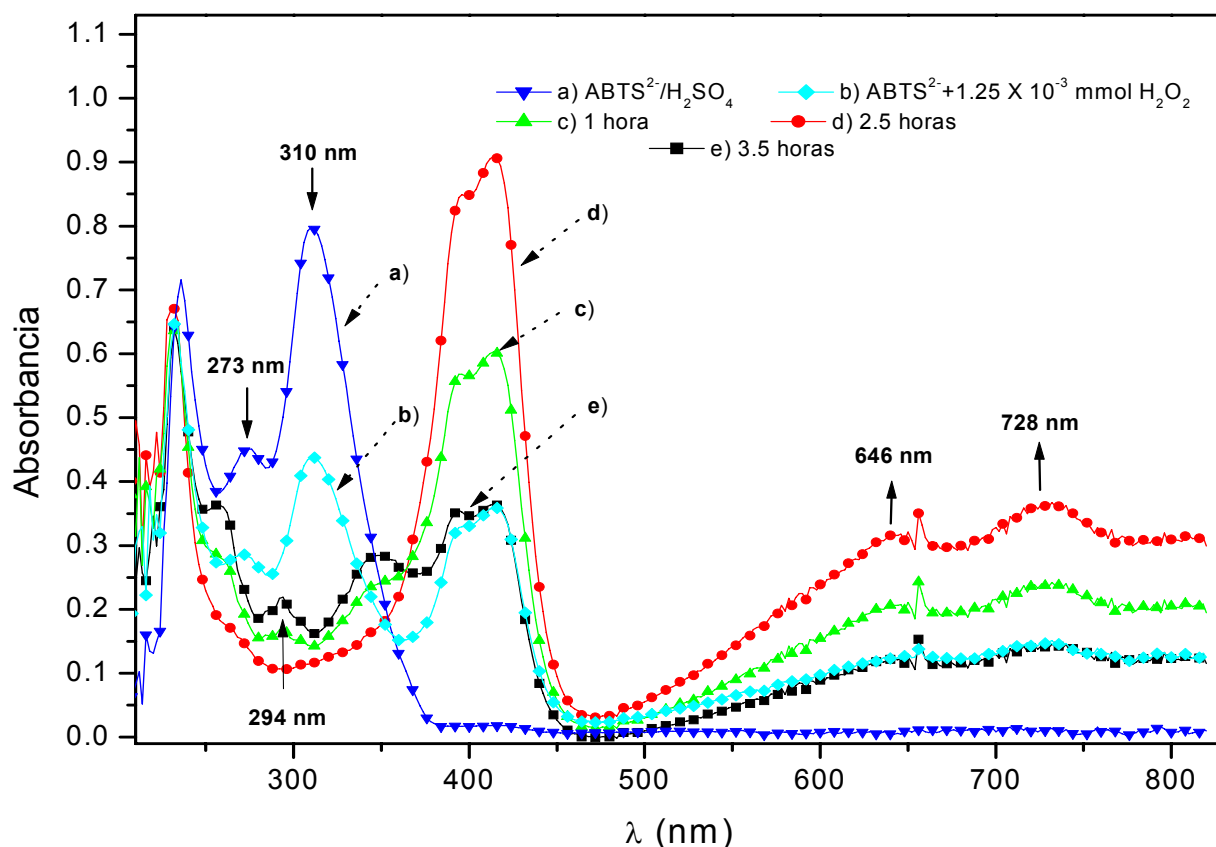


Figura. 5.8.3.2 Espectros de absorción UV-Vis de 2 mL de una disolución 0.025 mM de ABTS^{2-} a diferentes tiempos, después de la adición de 1.25×10^{-3} mmoles de H_2O_2 .

Resultados y discusiones

Después de 1 hora (figura 5.8.3.2c), la señal a $\lambda= 310$ nm, sufrió una disminución considerable con el aumento simultáneo a $\lambda= 394$ nm, $\lambda= 414$ nm, $\lambda= 646$ nm y $\lambda= 728$ nm, en el que se alcanzó el 94 % de oxidación. Cuando transcurrieron 2.5 horas (figura 5.8.3.2d), se observaron los cambios máximos de absorbancia, en el que se alcanzó el 96 % de oxidación, mientras que a 3.5 horas (figura 5.8.3.2e), se observó un abatimiento en la absorbancia a $\lambda= 728$ nm, con un incremento simultáneo a $\lambda= 310$ nm. Esta disminución de la absorbancia a $\lambda= 728$ nm, representa una disminución del 6 % de oxidación con respecto al observado a 2.5 horas. La tabla 5.8.3.1 muestra los cambios de absorbancia registrados en $\lambda= 310$ nm y $\lambda= 728$ nm, durante las adiciones de H_2O_2 y después de 1 h, 2.5 h y 3.5 h sin adición de H_2O_2 .

Tabla 5.8.3.1 Absorbancia a $\lambda= 310$ nm y $\lambda= 728$ nm y los incrementos que registra una disolución 0.025 mM de $ABTS^{2-}$ en H_2SO_4 0.05 mM después de la adición de 10 alícuotas de peróxido de hidrógeno, y 3.5 horas después.

	$A^{\lambda=310}$	$\Delta A^{\lambda=310}$	$A^{\lambda=728}$	$\Delta A^{\lambda=728}$
3.75×10^{-4}	0.794	0	0.014	0
7.50×10^{-4}	0.751	-0.043	0.029	0.015
1.25×10^{-3}	0.462	-0.289	0.147	0.118
1 hora	0.146	-0.316	0.249	0.102
2.5 horas	0.119	-0.027	0.368	0.119
3.5 horas	0.167	<u>+0.048</u>	0.155	<u>-0.213</u>

Las diferencias con signo negativo indican un decremento en la absorbancia, mientras que el signo positivo indica un incremento. A 2.5 horas, se observó la mayor disminución de la absorbancia en $\lambda= 310$ nm y el mayor incremento a $\lambda= 728$ nm, con la formación de $ABTS^{\bullet}$ y la correspondiente desaparición de $HABTS^{\bullet}$. El cambio en $\lambda= 728$ nm ($\Delta A^{\lambda=728}$) mostró un incremento en todos los casos, excepto a 3.5 horas, donde se observó un decremento a $\lambda=$

Resultados y discusiones

310 nm que no es proporcional a la disminución a $\lambda = 728$ nm. El equilibrio de las especies ABTS^{2-} y $\text{ABTS}^{\cdot-}$ representado por el punto isobéptico, se desplazó 9 nm con respecto al valor registrado durante las adiciones de H_2O_2 , y cuyo nuevo valor se ubicó en $\lambda = 364$ nm.

El espectro de absorción que corresponde a 3.5 horas, presentó un incremento a $\lambda = 345$ nm, una longitud de onda que no había sido observada anteriormente. Esta señal corresponde a ABTS^{2-} y su aparición, coincidió con el desplazamiento del punto isobéptico. Es posible que después de 2.5 horas de reacción, el equilibrio ácido-base, favoreciera la formación de ABTS^{2-} y no la de $\text{HABTS}^{\cdot-}$, lo que originó como consecuencia, que no se observaran incrementos considerables a $\lambda = 310$ nm. Es claro que el H_2SO_4 posee un fuerte efecto cinético en la oxidación de $\text{HABTS}^{\cdot-}$, ya que se alcanzaron los máximos valores de oxidación después de 2.5 horas de reacción, aunque estos decrecieran a las 3.5 horas. Probablemente la presencia del ión HSO_4^- jugó un papel importante en la concentración de la especie $\text{ABTS}^{\cdot-}$, efecto que no fue observado cuando se empleó HCl. Por tal motivo, se propuso el uso de un nuevo ácido, que satisficiera la condición de la concentración de protones y cuyo anión no aportara efectos cinéticos a la reacción. De tal forma, se decidió probar el ácido acético.

5.8.4 Oxidación de ABTS con H_2O_2 en ácido acético 1.0 M

Para cumplir el objetivo de realizar la oxidación de lignina en pulpa de papel, se requirió oxidar previamente al ABTS^{2-} , mantener la concentración del $\text{ABTS}^{\cdot-}$ obtenido constante, y que ésta no se modificara con el tiempo; manteniendo además, un alto porcentaje de

Resultados y discusiones

oxidación. Para cumplir con estas condiciones, se planteó el uso de una disolución 1 M de ácido acético, para realizar la oxidación de ABTS^{2-} , así como una estrategia para facilitar la formación *in situ* de una disolución reguladora, que se obtuvo neutralizando el ácido acético, al final del proceso. La metodología sufrió algunos cambios, pues en esta ocasión la adición del volumen total de H_2O_2 se realizó al inicio de la reacción, se duplicó la concentración de ABTS^{2-} , y el cambio de absorbancia se monitoreó cada 0.5 horas, durante 12 horas. La figura 5.8.4.1 muestra los espectros de absorción de 2 mL de una disolución 0.05 mM de ABTS^{2-} disuelto en una disolución 1 M de ácido acético después de la adición de 0.5 mL de una disolución 2.5 mM de H_2O_2 .

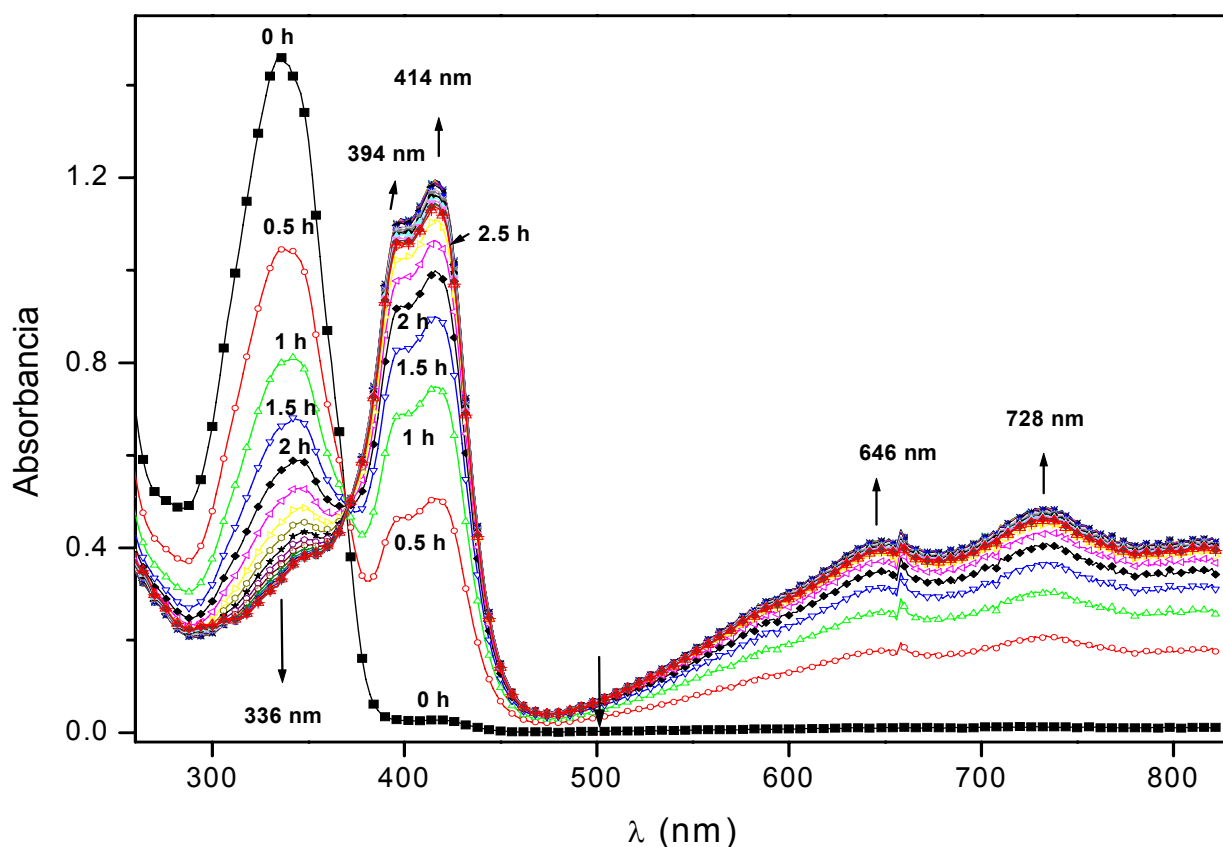


Figura 5.8.4.1 Espectros de absorción de 2 mL de una disolución 0.05 mM de ABTS^{2-} empleando una disolución 1 M de ácido acético, después de la adición de 0.5 mL de H_2O_2 2.5 mM

Resultados y discusiones

Los espectros de absorción de la figura 5.8.4.1, muestran seis máximos de absorción característica, que corresponden a las longitudes de onda $\lambda = 336$ nm, $\lambda = 394$ nm, $\lambda = 414$ nm, $\lambda = 646$ nm y $\lambda = 728$ nm. A $\lambda = 336$ nm, se observó el abatimiento en la absorbancia en función del tiempo, así como el correspondiente aumento en las longitudes de onda a $\lambda = 394$ nm, $\lambda = 414$ nm, $\lambda = 646$ nm y $\lambda = 728$ nm, que indicaron la formación $\text{ABTS}^{\cdot-}$. El punto isobéptico, que representa el equilibrio entre las especies ABTS^{2-} y $\text{ABTS}^{\cdot-}$, se presentó a $\lambda = 370$ nm.

El cambio en la absorbancia a $\lambda = 728$ nm, indicó que la formación de $\text{ABTS}^{\cdot-}$ se volvió más lenta a partir de las 4 horas, y entre las 10 y 12 horas se apreció una disminución de las mismas. Entre las 4-6 horas de reacción, se alcanzó el 72 % de disminución de la absorbancia a $\lambda = 336$ nm y el 97.4 % de incremento en la absorbancia a $\lambda = 728$ nm, que indicó el máximo porcentaje de oxidación de la disolución. La tabla 5.8.4.1 mostró el cambio de los valores de absorbancia a $\lambda = 336$ nm y $\lambda = 728$ nm, después de 0, 1, 4, 6, 9.5 y 12 horas de reacción.

Tabla 5.8.4.1 Absorbancia a $\lambda = 336$ nm y $\lambda = 728$ nm y los incrementos que registra una disolución 0.05 mM de ABTS^{2-} en Ácido acético 1 M, 12 horas después de la adición de 0.5 mL de una disolución 2.5 mM de H_2O_2 .

Tiempo (h)	Abs $\lambda = 336$ nm	ΔA	Abs $\lambda = 728$ nm	ΔA
0	1.4484	0	0.0126	0
1	0.8030	-0.644	0.3038	0.291
4	0.4040	-0.399	0.4708	0.167
6	0.3559	-0.048	0.4831	0.012
9.5	0.3396	-0.016	0.4722	- 0.010
12	0.3427	+ 3.1 X10⁻³	0.4578	- 0.014

Resultados y discusiones

Los valores de ΔA con signo negativo indican decremento de absorbancia entre un valor y otro, mientras que el signo positivo indica incremento. La figura 5.8.4.2 muestra la evolución de la reacción mediante el trazo de la absorbancia a $\lambda = 336$ nm, $\lambda = 414$ nm y $\lambda = 728$ nm. Después de 4 horas de reacción, el cambio en la absorbancia a $\lambda = 336$ nm (figura 5.8.4.2c) fue mínimo y se mantuvo sin cambios hasta las doce horas de la reacción, donde se observó un ligero incremento, mientras que a $\lambda = 728$ nm (figura 5.8.4.2b), la absorbancia se mantuvo sin cambios hasta las 9.5 horas, donde se observó que el porcentaje de oxidación disminuyó 0.4 % con respecto a las 6 horas.

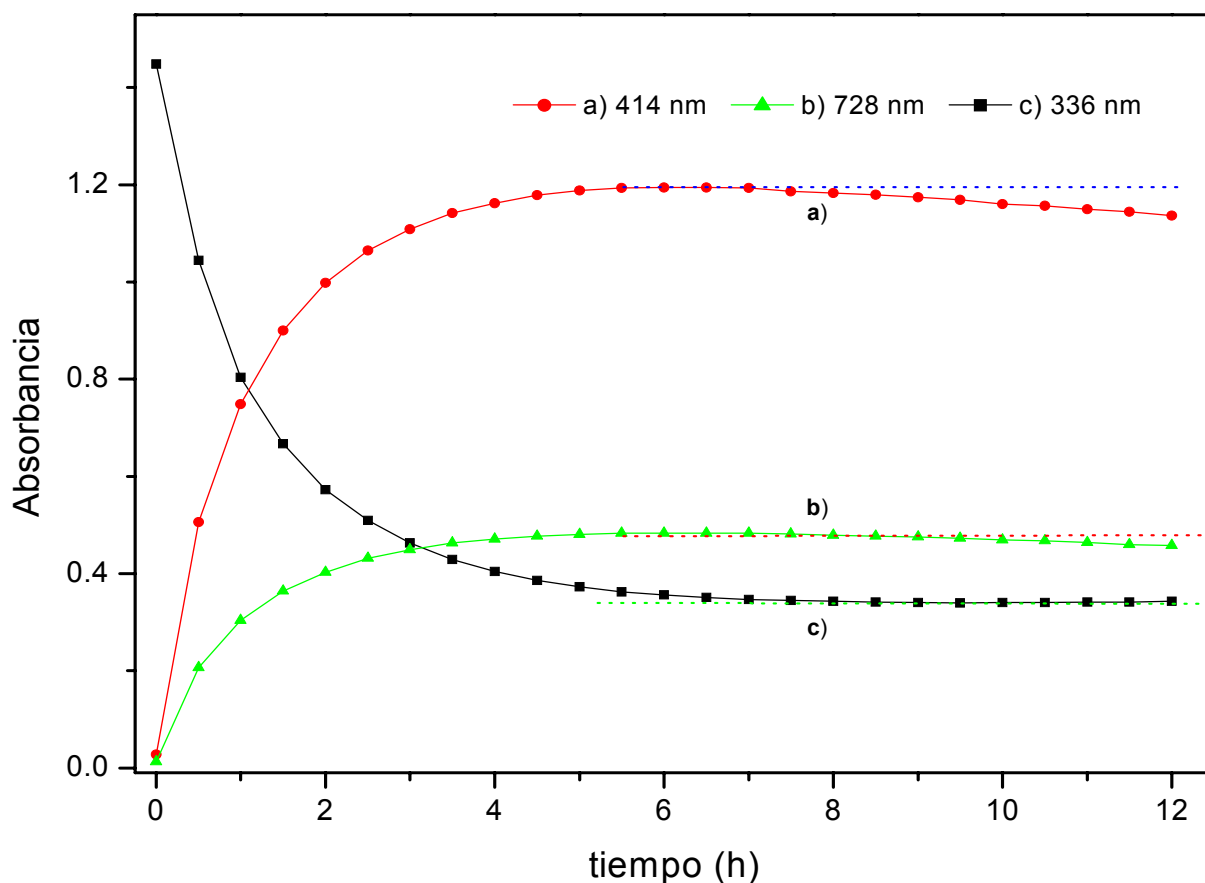


Figura 5.8.4.2 Evolución de la reacción de oxidación de una disolución 0.05 mM de $ABTS^{2-}$ en ácido acético 1 M con 0.5 mL de peróxido de hidrógeno 2.5 mM observada por medio del trazo de las absorbancias a $\lambda = 336$ nm y $\lambda = 414$ nm.

Resultados y discusiones

Después de 7.5 horas de reacción, se observó un descenso en la absorbancia a $\lambda= 414$ nm (figura 5.8.4.2), que no mostró un incremento simultáneo a $\lambda= 336$ nm. Lo anterior indica que a pesar de que la concentración de HABTS⁻ no cambió, sí se modificó la del ABTS^{•-}, a pesar de que a $\lambda= 728$ nm, no es evidente el decremento de la absorbancia, hasta después de 9.5 horas. Informes previos indican la formación de un complejo entre ABTS²⁻ y ABTS^{•-} genera una interferencia en la absorbancia a $\lambda= 414$ nm y se manifiesta como una baja estimación de la concentración de ABTS^{•-}, no obstante, esta interferencia no se observa a $\lambda= 728$ nm [47]. Es posible entonces, que el descenso en la absorbancia a $\lambda= 414$ nm después de 7.5 horas, se deba a la formación del complejo y no al cambio en la concentración de ABTS^{•-}, que aparentemente fue consumido sin la recuperación de HABTS⁻.

Esta interacción entre ABTS²⁻ y ABTS^{•-}, no impidió que la estrategia de oxidación de ABTS²⁻ con H₂O₂ en ácido acético 1 M, fuera utilizada para la oxidación de lignina en pulpa de papel, determinando la presencia de ABTS^{•-} antes de las 10 horas de reacción, utilizando la longitud de onda $\lambda=728$ nm. La estrategia empleada, permitió además la formación del amortiguador de acetatos *in situ*, empleando NaOH. Este amortiguador de acetatos, permitió llevar a cabo la reacción de oxidación del ABTS^{•-} con lignina de pulpa de papel, bajo las mismas condiciones empleadas durante la oxidación de ABTS²⁻ utilizando enzima inmovilizada, obteniendo un mayor porcentaje de oxidación, que fue superior al 90 %, con respecto al porcentaje alcanzado con enzima inmovilizada.

5.9 EFECTO DE LA MEZCLA ABTS²⁻/ ABTS^{•-} EN LA DESLIGNIFICACIÓN DE PULPA DE PAPEL

Una vez que se oxidó la disolución de ABTS²⁻ y se realizó la determinación cuantitativa de ABTS^{•-} en la mezcla obtenida, se tuvieron las condiciones adecuadas para llevar a cabo la oxidación *in situ* de lignina en pulpa de papel. Para esto, fue necesario determinar la cantidad máxima de ABTS^{•-}, capaz de llevar a cabo la oxidación de la lignina en pulpa de papel.

Se diseñó una estrategia experimental, en la cual se emplearon diferentes cantidades de ABTS^{•-} que provino de la mezcla (ABTS²⁻/ABTS^{•-}) obtenida de una disolución 0.1 M de ABTS²⁻ oxidada con alícuotas de H₂O₂ 6.5 M, en ácido acético 1 M. Durante la oxidación, la cantidad de H₂O₂ utilizado correspondió a los moles necesarios para llevar a cabo cuantitativamente la oxidación de ABTS²⁻ de acuerdo con la relación estequiométrica que guardan. El porcentaje de ABTS^{•-} que se obtuvo, fue menor al que se obtuvo en la sección 5.8.4, debido en parte a la concentración de ABTS²⁻ de la disolución inicial, así como el reciclamiento de la mezcla, pues debido a la limitada disponibilidad del mediador, fue utilizada en experimentos preliminares, lo que disminuyó la concentración del ABTS^{•-}.

Las cantidades de la mezcla utilizada, se calcularon de acuerdo con la concentración exacta de ABTS^{•-} a emplear en cada tratamiento, de acuerdo con lo descrito en la sección 5.6.1, con muestras de 3 gramos de pulpa de papel libre de humedad, y su efecto se comparó con

Resultados y discusiones

la disminución debida únicamente al proceso organosolv, empleando los resultados obtenidos en la sección 5.1. La tabla 5.9.1 muestra las cantidades de $\text{ABTS}^{\bullet-}$ proveniente de la mezcla con ABTS^{2-} empleada en cada tratamiento, así como la nomenclatura usada para cada uno.

Tabla 5.9.1. Cantidades de $\text{ABTS}^{\bullet-}$ y ABTS^{2-} empleadas en cada tratamiento.

Tratamiento	$\text{ABTS}^{\bullet-}$ (mmol)	ABTS^{2-} (mmol)
Testigo	0	0
organosolv (1 h)	0	0
organosolv (2 h)	0	0
8 $\text{ABTS}^{\bullet-}$ /92 ABTS^{2-}	0.24	2.76
4 $\text{ABTS}^{\bullet-}$ /96 ABTS^{2-}	0.12	2.88
ABTS^{2-}	0	0.12

La figura 5.9.1 muestra el efecto de cada uno de los tratamientos en la disminución del número kappa, empleando diferentes cantidades de $\text{ABTS}^{\bullet-}$ (8 $\text{ABTS}^{\bullet-}$ /92 ABTS^{2-}), (4 $\text{ABTS}^{\bullet-}$ /96 ABTS^{2-}) y (ABTS^{2-}), combinado con el efecto del proceso organosolv. Los coeficientes utilizados para nombrar cada tratamiento, muestran el porcentaje en el que se encontraron el ABTS^{2-} y $\text{ABTS}^{\bullet-}$ en la mezcla empleada.

La primera columna de la figura 5.9.1, muestra el valor del número kappa de un testigo, es decir, de pulpa sin tratamiento. La segunda columna, muestra la disminución del número kappa de una muestra que poseía el efecto únicamente del proceso organosolv, durante 1 hora de reacción; mientras que la tercera columna, presenta el mismo tratamiento por un periodo de 2 horas, ya que a $t=2$ horas se presentó la mayor disminución del número kappa, como se indica en la sección 5.2. Las tres últimas barras, presentan la disminución

del número kappa de muestras que fueron pretratadas con diferentes cantidades de la mezcla $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$ y tratadas posteriormente con el proceso organosolv durante una hora.

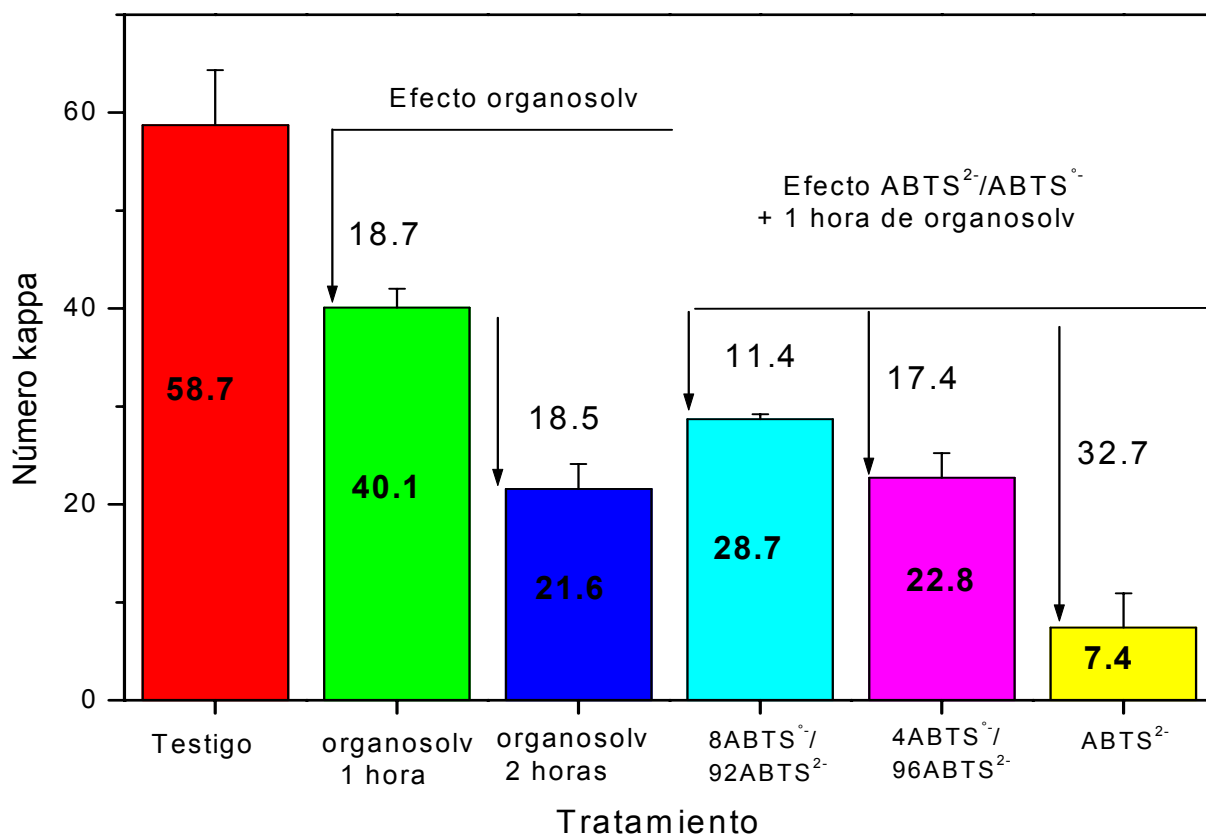


Figura 5.9.1 Efecto de la cantidad de $ABTS^{\cdot-}$ y $ABTS^{2-}$ en la disminución del número kappa de pulpa de papel.

La disminución del número kappa, entre el testigo y la muestra de organosolv con $t=1$ hora, fue de 18.7 unidades, mientras que la disminución para $t=2$ horas, fue de 39.4 unidades. La disminución del número kappa por efecto del tratamiento $8ABTS^{\cdot-}/92ABTS^{2-}$ fue de 11.3 unidades con respecto al de organosolv $t=1$ hora y de 30 unidades comparado con el testigo. El tratamiento $4ABTS^{\cdot-}/96ABTS^{2-}$, presentó una disminución de 17.4 unidades con respecto a $t=1$ hora y 36 unidades con respecto al testigo. Por otro lado, la

Resultados y discusiones

disminución del número kappa del tratamiento $ABTS^{2-}$ fue de 32.6 unidades con respecto a $t=1$ hora y 51.3 unidades con respecto al testigo.

Como se indicó en la sección 5.1, la mayor disminución del número kappa, por parte del proceso organosolv, se obtuvo a $t=2$ horas y no fue posible aumentarla, prolongando el tiempo de reacción. Esta disminución, fue comparable con la disminución obtenida con el tratamiento $4ABTS^{\cdot-}/96ABTS^{2-}$ y no varió considerablemente con el valor obtenido con el tratamiento $8ABTS^{\cdot-}/92ABTS^{2-}$. Sin embargo, el tratamiento $ABTS^{2-}$, presentó la mayor disminución del número kappa, comparado con los demás tratamientos. Es claro, que cuando la relación $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$ aumentó, se observó también un aumento en la disminución del número kappa. Estos resultados, fueron contradictorios con la hipótesis planteada para este trabajo, pues de acuerdo con algunas referencias [12,11,41], el $ABTS^{\cdot-}$ es el encargado de realizar la oxidación de las estructuras de lignina, no obstante, los valores experimentales indicaron, que la presencia de $ABTS^{2-}$, favoreció de alguna manera la deslignificación de pulpa de papel. Esto, no indica que fuera el responsable directo de llevar a cabo la deslignificación, sino sólo que estuvo involucrado en ella, y que actúa formando parte de un mecanismo de reacción que se desconoce. La explicación de este mecanismo de reacción, no forma parte de los objetivos de este trabajo, por lo que se propone que se aborde en futuras investigaciones.

A pesar de la aparente contradicción de los resultados presentados en esta sección, se obtuvo un comportamiento consistente con los resultados que se presentaron en la sección 5.6, no solo en lo referente a la presencia de $ABTS^{2-}$ en mayor proporción en la mezcla de

Resultados y discusiones

reacción, sino en la sobreestimación del valor del número kappa obtenido, con respecto a la disminución calculada con base en el balance teórico, como se indicó en la sección 5.6.1. Esta sobreestimación del valor del número kappa, podría ser un indicio de que el mecanismo de reacción desconocido, en el que el ABTS^{2-} está involucrado en uno o más ciclos.

Con el fin de encontrar evidencias que sustenten la existencia de un ciclo de oxidación en que el ABTS^{2-} y/o $\text{ABTS}^{\cdot-}$, estén involucrados en la destrucción de las estructuras de lignina, se recuperaron los extractos orgánico/acuoso, obtenidos en el reactor, después del proceso organosolv.

5.9.1 Recuperación de la fase orgánica y acuosa del proceso organosolv

Con el propósito de determinar la presencia de ABTS^{2-} o $\text{ABTS}^{\cdot-}$, en los extractos recuperados del reactor, utilizado en el proceso organosolv, se obtuvieron los espectros de absorción UV-Vis de las fases orgánica y acuosa de manera independiente, utilizando butanol y una disolución 1 M de NaOH como blancos de calibración. La figura 5.9.1.1 muestra los espectros de absorción de ambas fases.

Tanto la fase orgánica, como la fase acuosa, procedieron de la emulsión recuperada del reactor y pertenecían a los extractos de los tratamientos ABTS^{2-} y $4\text{ABTS}^{\cdot-}/96\text{ABTS}^{2-}$. Ambas fases fueron separadas y sus espectros de absorción, se compararon con el espectro de la única fase recuperada de una muestra que poseía solo el efecto del proceso organosolv.

Una característica importante del proceso organosolv, fue el rompimiento de las estructuras de lignina, para formar compuestos de bajo peso molecular, solubles en agua [51]. Este comportamiento, se comprobó, con la distribución de los componentes de las fases recuperadas, que se distribuyeron en mayor proporción en la fase acuosa, que en la fase orgánica, como lo muestra la figura 5.9.1.1.

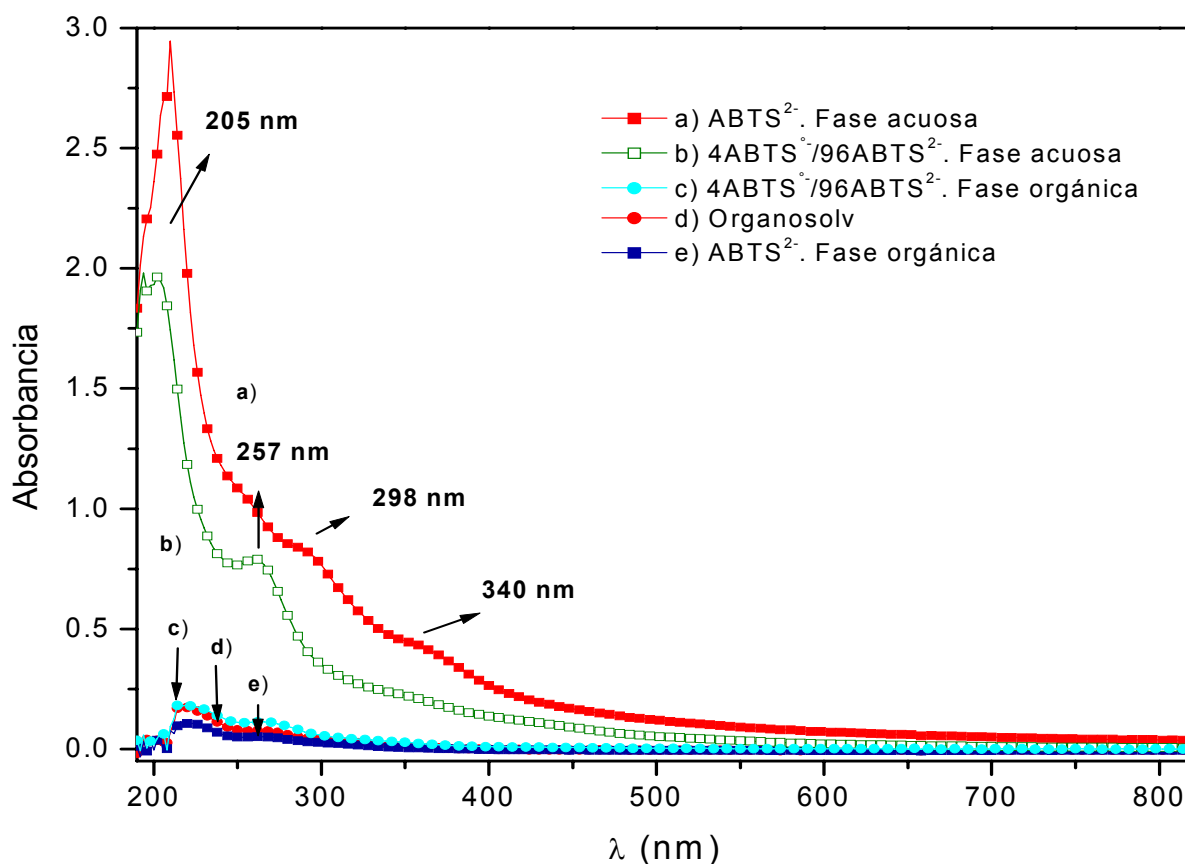


Figura 5.9.1.1. Espectros de absorción de las fases recuperadas después del proceso organosolv.

Las fases orgánicas presentaron una absorción muy baja, con respecto a la que mostraron las fases acuosas. A pesar de esto, presentaron tres máximos de absorción: el primero, se localizó entre 213-227 nm, el segundo entre $\lambda = 262$ y $\lambda = 268$ nm y el tercero entre $\lambda = 306$ y $\lambda = 316$ nm. En las fases acuosas se observaron diferencias considerables entre los

Resultados y discusiones

espectros de absorción de cada tratamiento. El espectro correspondiente a la fase acuosa del tratamiento 4ABTS^{•-}/96ABTS²⁻ (figura 5.9.1.1b) mostró señales de máxima absorción entre $\lambda = 205-210$ nm, $\lambda = 289-297$ nm y $\lambda = 351-379$ nm, mientras que el espectro de la fase acuosa, correspondiente al tratamiento ABTS²⁻ (figura 5.9.1.1a) presentó máximos de absorción entre $\lambda = 202-205$ nm, $\lambda = 260$ nm y $\lambda = 339-345$ nm.

La señal que se presentó en las fases acuosas cerca de los 205 nm corresponde a lignina soluble [28,34,65] y fue considerablemente más grande en la fase acuosa de ABTS²⁻ (figura 5.9.1.1a) que en la de 4ABTS^{•-}/96ABTS²⁻ (figura 5.9.1.1b). Esto fue consistente con lo indicado en la sección 5.9, donde la mayor disminución del número kappa se presentó con el tratamiento ABTS²⁻. La señal que presentó la fase acuosa del tratamiento ABTS²⁻ entre 339-345 nm, coincidió con la longitud de onda en la que se presentó la señal de máxima absorción del ABTS²⁻.

Los máximos de absorción restantes en las fases acuosas, no correspondieron con los informados en la literatura para estructuras de lignina [30]. Las fases orgánicas, presentaron un espectro de absorción muy semejante a un espectro típico de lignina, sin embargo, las longitudes de onda de máxima absorción se desplazaron de 10 a 12 nm [28,66]. La figura 5.9.1.2 muestra la ampliación de los espectros de absorción correspondientes a las fases orgánicas.

Finalmente, los resultados obtenidos no proporcionaron evidencia contundente de la presencia del ABTS²⁻ al final de la reacción del proceso organosolv. Tampoco fue posible

Resultados y discusiones

garantizar, por medio de los espectros de absorción de las fases recuperadas, si alguna especie oxidada $ABTS^{\cdot-}$ o $ABTS^0$, estuvieron involucradas en la oxidación y el rompimiento de las estructuras de lignina, cuando se intentó determinar su presencia al final de la reacción del organosolv.

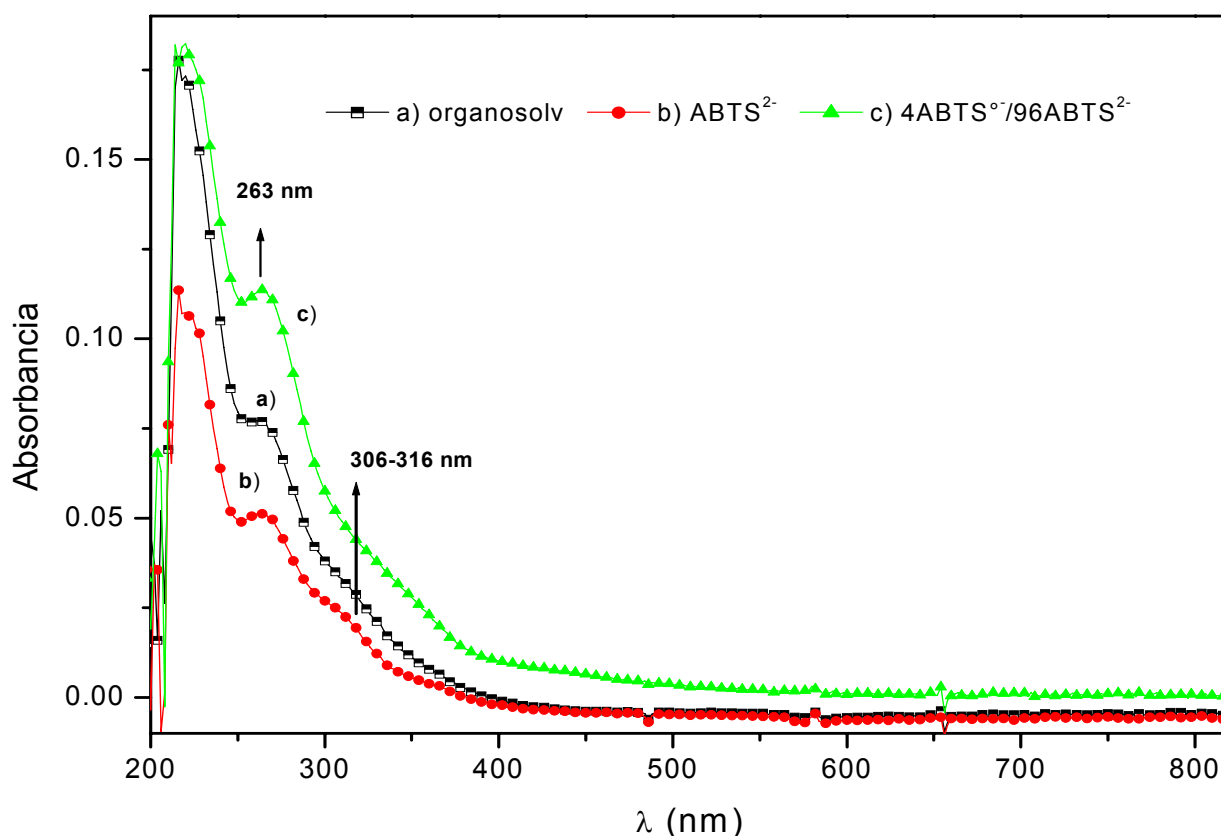


Figura 5.9.1.2 Ampliación de los espectros de absorción correspondientes a las fases orgánicas recuperadas después del proceso organosolv.

No obstante, se desconoce si el $ABTS^{2-}$ o $ABTS^{\cdot-}$ se encuentra en las fibras y la cantidad en la que estuvo presente, al inicio del proceso. Por esta razón, se realizó la determinación de la cantidad de $ABTS^{2-}$ y/o $ABTS^{\cdot-}$ que pudo adsorberse en pulpa de papel, después del pretratamiento.

5.9.2 Determinación de la adsorción de $ABTS^{2-}$ y $ABTS^{\cdot-}$ en pulpa de papel

En la sección 5.9, se determinó que el mayor efecto en la disminución del número kappa se obtuvo, cuando se pretrató a la pulpa de papel solamente, con $ABTS^{2-}$ y no cuando se empleó una mezcla $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$. Esto sugirió que la presencia de $ABTS^{2-}$ favorecía la reacción de deslignificación y por consiguiente, la disminución del número kappa, aunque el mecanismo por el que se llevó cabo, es desconocido. Por otra parte, en la sección 5.6, se determinó que el valor del número kappa de un tratamiento estaba sobrestimado, debido a la presencia de $ABTS^{2-}$ en la pulpa de papel, el cual modificó la determinación de materia oxidable. Esto, proporcionó una evidencia de que el $ABTS^{2-}$ pudo permanecer adsorbido. No obstante, es necesario determinar la cantidad precisa que permanece en las fibras de celulosa de la pulpa. Para estimar la cantidad de $ABTS^{2-}$ o $ABTS^{\cdot-}$ que se adsorbió en la pulpa de papel después de efectuar el pretratamiento con la mezcla, se realizó un experimento para determinar el cambio en la concentración de una disolución que contenía una mezcla de ambos.

En el experimento, se determinó la disminución de la concentración de una disolución que contenía una mezcla 1 mM de $ABTS^{2-}/ABTS^{\cdot-}$ en 1 M de ácido acético, para simular las condiciones empleadas en la sección 5.9. El experimento se realizó por triplicado, utilizando 0.15 gramos de pulpa de papel, que permaneció en contacto con la mezcla durante 19 horas, dentro de un sistema hermético para evitar la evaporación. La concentración de $ABTS^{2-}$ y $ABTS^{\cdot-}$ en la mezcla y la concentración total, se determinaron

como se indica en la sección 5.3. La figura 5.9.2.1 muestra los espectros de absorción obtenidos antes y después de 19 horas.

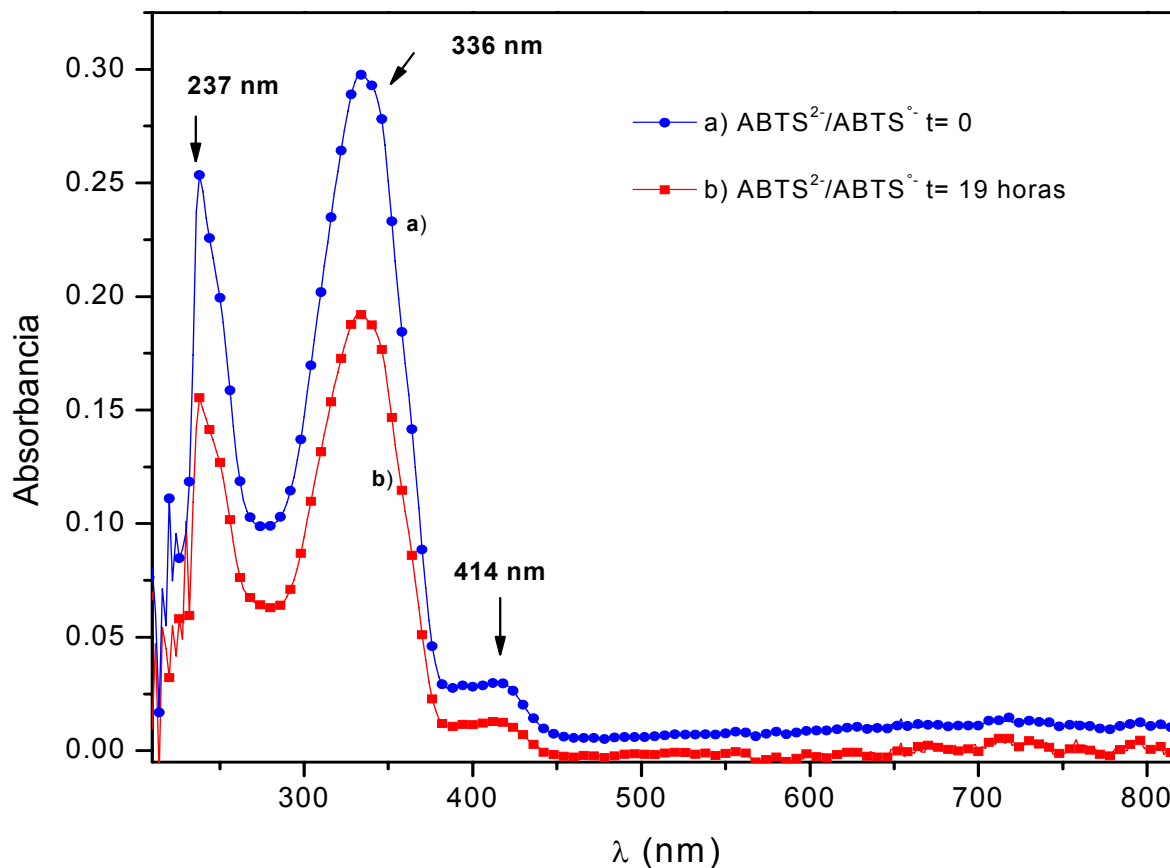


Figura 5.9.2.1. Espectro de absorción de una mezcla de $ABTS^{2-}/ABTS^{\bullet-}$ antes y después de 19 horas de contacto con pulpa de papel.

Los espectros de la figura 5.9.2.1, presentan las longitudes de máxima absorción características de las especies $ABTS^{2-}$ y $ABTS^{\bullet-}$. Después de 19 horas, se observó una disminución en la intensidad de la absorción de todo el espectro. La tabla 5.9.2.1, muestra los valores de absorbancia obtenidos a $\lambda=336$ nm y $\lambda=414$ nm, para determinar la concentración de $ABTS^{2-}$ y $ABTS^{\bullet-}$ respectivamente. A pesar de que $\lambda=728$ nm es la longitud de onda más confiable para la estimación de la concentración de $ABTS^{\bullet-}$, se utilizó

Resultados y discusiones

la longitud de onda $\lambda = 414$ nm, debido a que la baja concentración de la especie $\text{ABTS}^{\cdot-}$ demanda el uso de una longitud de onda de mayor sensibilidad, además de poseer un coeficiente de extinción molar mayor, ya que $\epsilon_{414 \text{ nm}} = 36,000 \text{ L/cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ es mayor $\epsilon_{728 \text{ nm}} = 15,230 \text{ L/cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

Tabla 5.9.2.1. Valores de absorbancia y concentración de ABTS^{2-} , $\text{ABTS}^{\cdot-}$ y la concentración total, obtenidas a partir de los espectros de absorción mostrados en la figura 5.9.2.1.

Tiempo (h)	$A^{\lambda=336 \text{ nm}}$	$[\text{ABTS}^{2-}]$ M	$A^{\lambda=414}$	$[\text{ABTS}^{\cdot-}]$ M	$[\text{ABTS}]_{\text{total}}$ M
t = 0	0.298	7.48×10^{-4}	0.032	0.89×10^{-4}	8.37×10^{-4}
t = 19	0.191	4.81×10^{-4}	0.013	0.37×10^{-4}	5.18×10^{-4}

Después de 19 horas, la absorbancia a $\lambda = 336$ nm disminuyó 36 %, mientras que la absorbancia a $\lambda = 414$ nm disminuyó 59 %. La diferencia de la concentración de ABTS^{2-} es de 2.67×10^{-4} M, mientras que la de $\text{ABTS}^{\cdot-}$ es de 5.2×10^{-5} M. La diferencia de la concentración total de la mezcla de $\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^{\cdot-}$, fue de 3.19×10^{-6} M y corresponde a la disminución del 38 % de la concentración de la disolución. La disminución del 40 % de la concentración total de la disolución, se atribuyó a la adsorción en la pulpa de papel, y no a la reacción de $\text{ABTS}^{\cdot-}$ con lignina, que daría como producto ABTS^{2-} y en consecuencia un incremento en la absorción a $\lambda = 336$ nm. La diferencia de la concentración de ABTS^{2-} y de $\text{ABTS}^{\cdot-}$, indica que la adsorción fue mayor para ABTS^{2-} , mientras que los porcentajes, muestran selectividad por la adsorción del radical. El ABTS^{2-} y el $\text{ABTS}^{\cdot-}$, son especies con carga eléctrica formal que pueden establecer interacciones electrostáticas fácilmente, incluso con la celulosa. La celulosa, establece puentes de hidrógeno con cadenas adyacentes, y de la misma forma, se une a los demás componentes de la pared celular, como la hemicelulosa y la pectina [7]. El ABTS^{2-} y $\text{ABTS}^{\cdot-}$ probablemente establecen el

Resultados y discusiones

mismo tipo de interacciones con la celulosa, lo que hace posible su adsorción. Si la disminución del número kappa observado en la sección 5.9, estuvo asociado con fenómenos de adsorción, resultó fundamental, estimar y proponer la cantidad de ABTS^{2-} o ABTS^- que se requiere para llevar a cabo los procesos de deslignificación de pulpa de papel, pues aunque no hay una evidencia contundente que explique la disminución del número kappa, cuando se empleó el pretratamiento con ABTS^{2-} , sí se estableció una relación estrecha entre la cantidad de ABTS^{2-} presente en la reacción y la disminución del número kappa.

La cantidad de ABTS^{2-} , que se adsorbió en pulpa de papel, corresponde a 3.19×10^{-5} moles por cada 0.15 gramos de pulpa, es decir, 6.38×10^{-4} moles de ABTS^{2-} por cada 3 gramos de pulpa de papel. Esta cantidad, fue mucho menor que la propuesta por otros autores [11], que utilizaron 150 mmoles de ABTS^{2-} por cada 3 gramos de pulpa de papel, para obtener una disminución de 2.5 unidades del número kappa, empleando un sistema Lacasa-Mediador (SLM). El ABTS^{2-} , es un compuesto que se encuentra disponible comercialmente, pero su elevado costo, limita su aplicación, especialmente a nivel industrial. Por tanto, resulta interesante, realizar un ejercicio de análisis en el que se determine el precio de la celulosa blanqueada, por medio del proceso acoplado propuesto en este trabajo.

5.10 EVALUACIÓN ECONÓMICA DEL ACOPLAMIENTO DE LOS PROCESOS ABTS²⁻— ABTS⁻/ ORGANOSOLV

A pesar de que el mecanismo de acción del ABTS²⁻ o ABTS⁻ durante la reacción de deslignificación de pulpa de papel no es claro, de acuerdo a la sección 5.9, es posible realizar un ejercicio en el que se estime el precio que alcanzaría la pulpa de papel que se obtuvo por medio del proceso acoplado que se propuso en este trabajo, para verificar si dicho proceso, representa una opción viable.

Utilizando como una base, la cantidad de ABTS²⁻ que se adsorbió en pulpa de papel, se relacionó con la disminución del número kappa, para evaluar el costo asociado. Durante el proceso organosolv, se realizó una inversión energética por concepto del calentamiento y mantenimiento de la temperatura dentro del reactor. La temperatura fue registrada por medio de dos termopares que enviaron la señal a un detector recíproco. Este detector, tradujo la diferencia de temperaturas entre el reactor y la temperatura programada (150 °C) y la codificó, como un suministro de energía eléctrica (Volts). Para determinar el suministro total de energía durante el proceso, se calculó la potencia requerida durante la fase de calentamiento y mantenimiento por medio de la integral de la curva potencia en función del tiempo [63]. La figura 5.10.1, muestra la gráfica que representa el suministro de potencia, durante la fase de calentamiento y mantenimiento dentro del reactor y la integración de la curva correspondiente.

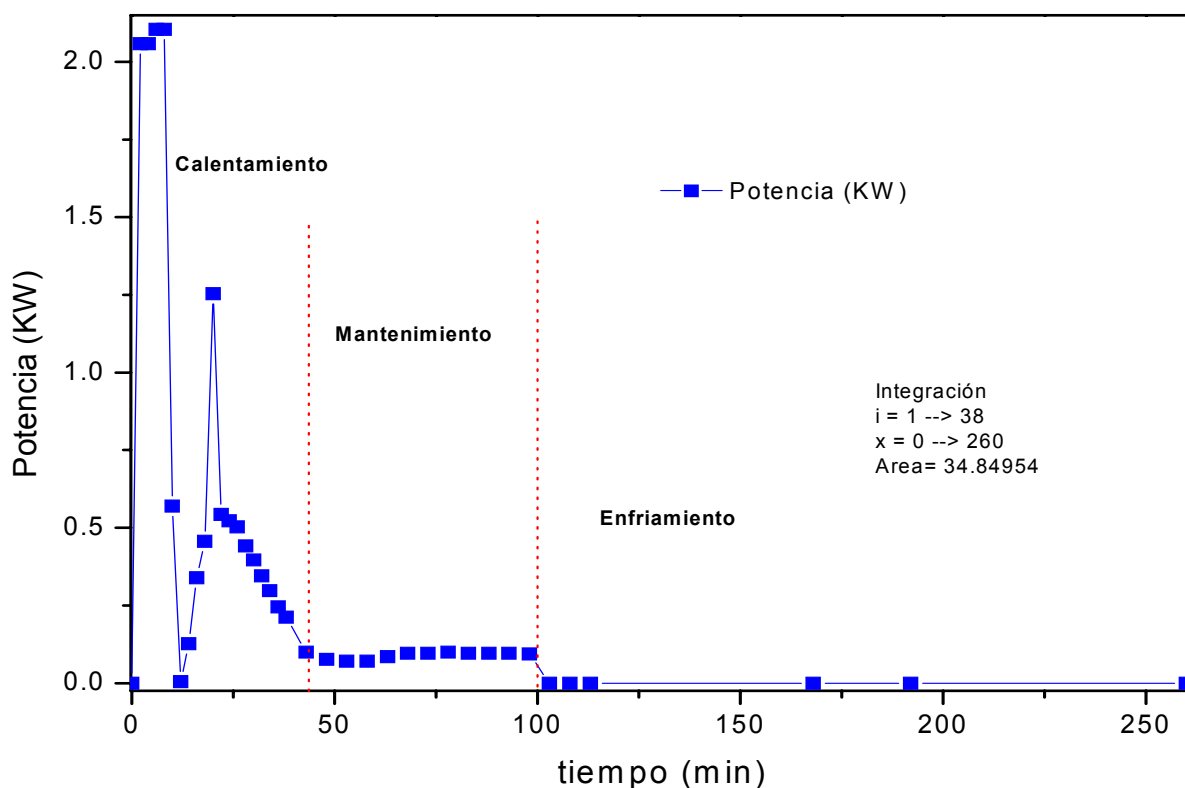


Figura 5.10.1 Suministro de potencia, durante la fase de calentamiento y mantenimiento dentro del reactor y la integración de la curva correspondiente.

Durante la fase de calentamiento, se obtuvieron variaciones muy marcadas en el suministro de la potencia. Estos cambios, se debieron propiamente al mecanismo del detector, que registró grandes diferencias entre la temperatura programada, y la del termopar que se encontraba dentro del reactor. No hubo suministro de voltaje durante la fase de enfriamiento del reactor. El área debajo de la curva potencia *V*s tiempo, indica un consumo total de 34.84 KW y el tiempo de reacción fue de 100 minutos, ya que no se consideró el periodo de enfriamiento. El costo en pesos mexicanos por KWH es de \$0.31 de acuerdo a la tarifa

Resultados y discusiones

vigente de Luz y Fuerza del Centro² (LyFC). El resultado, es un consumo de 58 KWH, con un costo de \$187. Sin embargo, las modernas plantas productoras de pulpa de papel, tienen capacidad para producir 1000,000.00 ton/ año. Para alcanzar estos volúmenes de producción, resulta impráctico y sumamente caro, emplear energía eléctrica, por lo que se utiliza vapor, que es generado en la misma planta, por medio de calderas, utilizando los desechos de madera y papel como combustible. Por esta razón, el costo asociado a la generación de vapor, es mínimo [23]. En el apéndice, se muestran los desechos de madera utilizados como combustible y la capacidad calorífica que poseen.

La información presentada, permite establecer un modelo de planta productora de celulosa blanqueada con capacidad de 1000,000.00 ton/ año, y establecer los costos de operación con base en los costos asociados a la materia prima. La tabla 5.10.1 muestra un inventario de la materia prima e insumos empleados para la obtención de celulosa blanqueada por el proceso acoplado ABTS²⁻-ABTS⁺/organosolv.

Tabla 5.10.1. Inventario de materia prima e insumos y sus costos asociados a la obtención de celulosa por medio del proceso acoplado ABTS²⁻-ABTS⁺/organosolv [64]

Materia prima	Costo unitario (\$/Kg)	Ton/Ton producto	MP (\$/ año)
Butanol	25.96	19.4	5 X 10 ¹¹
ABTS ²⁻	208,000	0.35	7.28 X 10¹⁰
Agua	1.52	2.4	3.64 X 10 ⁹
NaOH	18.10	0.09	1.62 X 10 ⁹
Pulpa de papel	1.20	1	1.2 X 10 ⁹
Vapor	-----	6	-----
Costo de operación anual		\$5.79 X 10¹¹ ‰ MN.	

Costo en M.N (México, 2006)

² La tarifa utilizada considera el costo real por suministro y no considera los descuentos por otras transferencias ni el subsidio del gobierno federal.

Resultados y discusiones

El butanol que se emplea durante el proceso, normalmente se recupera por destilación y puede ser reutilizado, por lo que sus costos se reducen drásticamente. Con la consideración de que el vapor, no representa una inversión, se desprecia el flujo de efectivo por concepto de costos asociados al suministro de energía. Para que el modelo de evaluación propuesto, sea válido, se requiere que la planta productora de celulosa, lleve a cabo el proceso integrado, que contempla el talado de árboles, descortezado, pulpeo y blanqueo, de lo contrario, se elevan los costos por concepto de compra de materia prima (pulpa) y suministro de energía.

El factor limitante de este proceso, es el costo asociado al ABTS²⁻, pues la suma que alcanza por tonelada de pulpa procesada, eleva el precio de la celulosa, que no compite con los precios de venta de Brasil y que son de alrededor de US\$ 120/ ton de celulosa blanqueada, es decir \$1,270 pesos mexicanos. La alternativa, que podría hacer viable la aplicación de este proceso acoplado a una escala mayor, sería emplear un mediador que garantice los mismos resultados en la disminución del número kappa, a un menor costo.

La implementación de un proceso acoplado ABTS²⁻-ABTS^{•-}/organosolv, para la producción de celulosa blanqueada a nivel industrial con precios competitivos de venta, requiere de una evaluación económica más formal y estudios de optimización del proceso. Un estudio más detallado y completo respecto a las cantidades de ABTS²⁻ necesario para la deslignificación de pulpa de papel, aportaría información valiosa para determinar la cantidad mínima requerida durante el proceso, puesto que los resultados mostrados en la sección 5.9 indica que el sistema es más eficiente cuando se emplea menor cantidad de ABTS²⁻. Además de la

Resultados y discusiones

optimización del ABTS²⁻ necesario, puede considerarse el reciclaje del mismo. No obstante, los resultados obtenidos por este trabajo dejan un antecedente para futuras investigaciones, pues representa un buen campo de oportunidad.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES.

Fue posible desarrollar de manera efectiva, un procedimiento que combina la deslignificación de pulpa de papel en un proceso de preoxidación, utilizando el mediador redox ABTS^{2-} (ácido 2,2'-3-etil benzotiazolin-6-sulfónico) y el proceso organosolv.

El proceso combinado, es capaz de disminuir aproximadamente 50 unidades del número kappa de pulpa de papel de *Eucalyptus globulus*. Este proceso, se propone como una alternativa para posibles aplicaciones al blanqueo de pulpa de papel.

La cantidad máxima de ABTS^{2-} empleada en el proceso de preoxidación, es de 0.12 mmoles de ABTS^{2-} por cada 3 gramos de pulpa, es decir, 0.01 mmoles de ABTS^{2-} /g pulpa, que representa sólo el 0.08 % del gasto de ABTS^{2-} propuesto por otros autores.

El ABTS^{2-} , tiene la capacidad de adsorberse en cristales de sílica gel y en pulpa de papel. En el primer caso, tiene un efecto perjudicial, disminuyendo la concentración disponible de ABTS^{2-} y $\text{ABTS}^{\cdot-}$ en la disolución, mientras que en el segundo, favorece el proceso de deslignificación.

Durante la etapa de preoxidación del proceso combinado, se lleva a cabo la adsorción de 0.01 mmoles de ABTS^{2-} /g de pulpa de papel. El ABTS^{2-} adsorbido, juega un papel muy importante en la disminución del número kappa. Se desconoce aún el mecanismo de acción

Conclusiones

del ABTS²⁻ adsorbido en pulpa, que favorece la disminución significativa del número kappa.

La oxidación de ABTS²⁻ utilizando H₂O₂ en medio ácido, demostró una eficiencia cercana al 98 %, empleando HCl 0.1 M, mientras que las eficiencias obtenidas con ácido clorhídrico 0.05 M, ácido acético 1 M y ácido sulfúrico 0.05 M, alcanzaron valores de 35 %, 72 % y 96 % respectivamente. Por otra parte, la eficiencia oxidativa que se alcanzó utilizando enzima inmovilizada es cercana al 35 %.

Lo anterior, demuestra que sustituir la enzima lacasa por un método de oxidación de ABTS²⁻ más rápido y efectivo, como es el uso de peróxido de hidrógeno con ácido acético 1 M, brinda resultados satisfactorios en eficiencia de oxidación, así como la posibilidad de una posterior y sencilla preparación *in situ* de una disolución reguladora de pH, a semejanza de las condiciones empleadas durante la oxidación de ABTS²⁻ en presencia de la enzima.

PERSPECTIVAS

Se plantea la posible de reutilización del ABTS²⁻ empleado, favoreciendo la disminución de los costos asociados al proceso y perfilando una alternativa importante en el blanqueo de papel con costos comparables a los empleados en la iniciativa privada.

APÉNDICES

APENDICE I

Soluciones. 0.02M de KMnO_4 Volumen requerido en mL de $\text{ABTS}^{\circ-}$ 100
 0.1 M de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ masa en g 27.435

[KMnO_4] 0.02 100 mL

[$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$] 0.1

[$\text{ABTS}^{\circ-}$] 0.5

Muestra de pulpa 3 gramos

mL KMnO_4 añadidos	mL KMnO_4 consumidos	mL KMnO_4 residuales	mmol KMnO_4 totales	mmol MnO_4 consumido por la fibra	mmol KMnO_4 residuales	meq MnO_4 residuales	meq I_2 generados por KMnO_4 residual	meq $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ para titular I_2	mL $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ para titular I_2	mmol $\text{ABTS}^{\circ-}$ que consumiría la fibra	kappa asociado
100	100	0	2	2	0	0	0	0	0	0	100
100	90	10	2	1.8	0.2	1	1	2	10	1	90
100	80	20	2	1.6	0.4	2	2	4	20	2	80
100	70	30	2	1.4	0.6	3	3	6	30	3	70
100	60	40	2	1.2	0.8	4	4	8	40	4	60
100	50	50	2	1	1	5	5	10	50	5	50
100	40	60	2	0.8	1.2	6	6	12	60	6	40
100	30	70	2	0.6	1.4	7	7	14	70	7	30
100	20	80	2	0.4	1.6	8	8	16	80	8	20
100	10	90	2	0.2	1.8	9	9	18	90	9	10
100	0	100	2	0	2	10	10	20	100	10	0

APENDICE II

Determinación de lignina. Algoritmo de cálculo [22].

$$\mathbf{K = (P)*(f) / W}$$

Donde

$$\mathbf{P = (b-a) N / 0.1}$$

K = Número kappa

f = Factor de corrección para un consumo del 50 % del permanganato, dependiente del valor de p.

W = Gramos de pulpa libre de humedad

P = Centímetros cúbicos de permanganato 0.1 N consumidos por la prueba

b= Centímetros cúbicos de tiosulfato consumidos por la prueba.

a = Centímetros cúbicos de tiosulfato consumidos por el blanco

N= Normalidad del tiosulfato.

APENDICE III.

Propiedades de algunos solventes utilizados en los procesos organosolv [25].

Propiedad	Metanol	Etanol	Butanol
Punto de ebullición °C, 1 atm.	65.15	78.5	117.2
Punto de fusión. °C, 1 atm.	- 93.9	- 117.3	- 89.5
Capacidad calorífica J/mol K	51.71	81.19	
Entropía J/ mol K	253.84	303.1	
Densidad específica (d ₄ ²⁰)	0.78 (d ₄ ²⁵)	0.78	0.810
Flash (° C)	12	13	36-38

APENDICE IV

Combustibles de desechos sólidos quemados en calderas industriales [25]

Desecho	HHV, KJ/ Kg
Bagazo	8,374-11,630
Residuo furfural	11,630-13,956
Corteza de árbol	9,304-11,630
Desecho de madera en general	10,467- 18,608
Desperdicios de papel	13,695- 18,608

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Chum, H., Johnson, D., Black, S. Organosolv Pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplars. 2. Catalyst effects and the combined severity parameter. *Industrial Engineering of Chemical Research*. 1990, 29: 156-162.
- [2] Gilarranz, M., Oliet, F., Rodríguez, F., Tijero. Methanol- based Pulping of Eucalyptus globulus. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. June, 1999. 77: 515-521.
- [3] Gilarranz, M., Rodríguez, F., Santos, A., Oliet, M., García- Ochoa, F., Tijero. Kinetics of eucalyptus globulus delignification in a methanol-water medium. *Industrial Engineering of Chemical Research*. 1999. 38:3324-3332.
- [4] Leonowicz, A., Matuszewska, A., Biodegradation of lignin by white rot fungi. Review. *Fungal genetics and biology*, 1999, 27: 175-185.
- [5] Akhtar, M., Blanchette, R., Kirk, K. Fungal deslignification and biomechanical pulping and wood. *Advances in Biochemical Engineering*. 1997, 57: 160-195.
- [6] Pérez, J., Muñoz- Dorado, J., Rubia, T., Martínez, J. Biodegradación and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiology*. 2002, 5: 53-63.
- [7] Gad, G., *Fungi in bioremediation*, Cambridge University Press, U.K, 2001.
- [8] Moreira, M., Feijoo, G., Canaval, J., Lema, J.M. Semipilot- scale bleaching of kraft pulp with manganese peroxide. *Wood Science and Technology*. 2003, 37: 117-123.

Bibliografia

- [9] Mougin, C., Jolival, C., Briozzo, P., Madzak, C. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. *Environmental Chemical Letters*. 2003, 1: 145-148.
- [10] Xu, F., Kulys, J., Duke, K. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Applied and environmental microbiology*. May, 2000. 66 (5): 2052-2056.
- [11] Bourbonnais, R., Paice, M., Reid, D. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied Microbiology Biotechnology*. 1995, 61: 1876-1880.
- [12] Bourbonnais, R., Paice, M., Freiermuth, B., Bodie, E. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and environmental microbiology*. 1997, 63: 4627-4632.
- [13] Bajpai, P. Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnology progress*. 1999, 15: 147-157.
- [14] Balakshin, M., Chen, C., Gratzl, J. Kinetic studies on oxidation of veratryl alcohol by laccase-mediator system. Part 1. Effects of mediator concentration. *Holzforschung*. 2000, 54: 165-170.
- [15] Balakshin, M., Chen, C., Gratzl, J. Kinetic studies on oxidation of veratryl alcohol by laccase-mediator system. Part 2. The kinetics of dioxygen uptake. *Holzforschung*. 2000, 54: 171-175.

Bibliografía

- [16] Bourbonnais, R., Leech, D., Paice, M. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochemica et biophysica acta*. 1998, 1379: 381-390.
- [17] Solís, M., Ugalde, V., Gonzalez, I., Viniegra, G. An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediador 2,2'-azino-bis-(3-ethylbnzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *Journal of electroanalytical chemistry*. 2005, 579: 59-66.
- [18] www.papelnet.cl
- [19] www.eluniversalonline.com.
- [20] Memorias del curso de formación de formadores. Tecnología de la fabricación de pasta y papel. Centro de formación de la cooperación española en Antigua, Guatemala, Marzo, 2006. CD-Room.
- [21] Botello, J., Gilarranz, M. Preliminary study on products distribution in alcohol pulping of *Eucalyptus globulus*. *Journal of chemical technology and bioechnology*. 1999, 74: 141-148.
- [22] Ramírez, C., Nomenclatura química de la lignina. Curso intensivo sobre química y tecnología de la lignina. Instituto de madera, celulosa y papel. Universidad de Guadalajara.
- [23] Casey, J., Pulpa y papel. Química y tecnología química, vol. 1. Ed. Limusa, 1990. México.
- [24] Nascimento, E., Morais, S., Ozonólise das ligninas organossolve e kraft eucalipto. Parte II: Cinética nos meios ácido e básico. *Química nova*. 1998, 25: 578-583.

- [25] Perry's. Manual del ingeniero químico. 6a ed. Mc Graw Hill. Tomo 1.
- [26] Gilarranz, M., Oliet, F., Tijero, J. Etanol- Water pulpig: Cooking variables optimization. The Canadian journal of chemical engineering. 1998, 76: 253-260.
- [27] González, M., González, E., Machado, S., Acevedo, L. Reducción del consumo de agua y vertimiento de residuos e implementación del pulpeo Organosolv en una fábrica de papel. Congreso Iberoamericano de investigación en celulosa y papel (CIADICYP), 2002. Red Iberoamericana de Docencia e Investigación en Celulosa y Papel (RIADICyP).
- [28] Lora, J., Wu, C.F., Pye, E. K., Balatinez, J. Characteristics and potential applications of lignin produced by an Organosolv pulping process. Lignin. Properties and materials. Symposium series. American Chemical Society. ACS, Washington, USA, 1989. pp: 312-323.
- [29] Oliet, M., García, J., Rodríguez, F., Gilarranz, M.A. Solvent effects in autoctalized alcohol-water pulping. Comparative study between ethanol and methanol as delignifying agents. Chemical Engineering Journal. 2002, 87: 157-162.
- [30] Rudatin, S., Sen, Y., Woerner, D. Asociation of Kraft lignin in aqueous solution. Lignin. Properties and materials. Symposium series. American Chemical Society. ACS, Washington, USA, 1989. pp: 144-154.
- [31] Oanh, N., Bengtsson, B. Persistent organochlorines in the effluents from a chlorine-bleached kraft integrated pulp and paper mill in southeast Asia. Archives of environmental contamination and toxicology. 1999, 37: 303-309.
- [32] García, O., Camarero, S., Colom, J., Martínez, A. Optimización of a laccase- mediator stage for TFC bleaching of flax pulp. Holzforschung. 2003, 57: 513-519.

Bibliografía

- [33] Camarero, S., García, O., Vidal, T. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase- mediator system. *Enzyme and Microbial technology*. 2004, 35. 113-120.
- [34] Ferraz, A., Mendonça, R., Silva, F. Organosolv delignification of white- and brown-rotten *Eucalyptus grandis* hardwood. *Journal of Chemical Technology*, 2000. 75: 18-24.
- [35] www.esf.edu/pse/scott/research/research.html.
- [36] Reid, I. Fate of residual lignin during delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor*. *Applied and environmental microbiology*. 1998, 64: 2117-2125.
- [37] Raghukumar, C., Muraleedharan, U. Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp. *Journal Ind. of microbial technology*. 2004 ,31: 433-441.
- [38] Nakamura, K., Go, N. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. Review. *Cellular and molecular life sciences*. 2005, 62: 2050-2066.
- [39] D' Acunzo, F., Galli, Carlo. First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccase- induced oxidation of lignin models. *Europe Journal Biochemistry*. 2003, 270: 3634-3540.
- [40] Li, K., Helm, R., Eriksson, K. Mechanistic studies of the oxidation of a non-phenolic lignin model compound by the laccase/ 1- hydroxybenzotriazole. *Biotechnol. Applied. Biochemistry*. 1998, 27: 239-243.
- [41] Bourbonnais, R., Paice, M., Voltametric measurement of lignin in pulp and paper samples. An electron transfer catalytic approach with mediators. *Journal of electrochemical society*, 2004, 151 (7): E246- E249.

[42] www.sigma-aldrich.com.

[43] Majcherczyk, A., Johannes, C., Hüttermann. Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication. *Applied Microbiology Biotechnology*. 1999, 51: 267-276.

[44] Scott, S., Chen, W., Bakac, A. Spectroscopic parameters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron rates of the 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and Ions. *Journal of Physical Chemistry*. 1993, 97: 6710-6714.

[45] Childs, R.E., Bardsley, W.G. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochemistry Journal*. 1975, 145: 93-103.

[46] Johannes, C., Majcherczyk, A., Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and environmental microbiology*. 2000, 66: 524-528.

[47] Johannes, C., Majcherczyk, A. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*. 2000, 78: 193-199.

[48] Kawai, Shingo., Iwatsuki, M., Nakagawa, M. An alternative by β -ether cleavage pathway for a non-phenolic β -O-4 lignin model dimer catalyzed by laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial technology*. 2004. Article in press.

[49] Rochefort, D., Leech, D., Bourbonnais, R. Electron transfer mediator system for bleaching of paper pulp. *Critical review. Green chemistry*. 2004. 6: 14-24.

Bibliografía

- [50] Parajó, J., Alonso, J., Santos, V. Kinetics of catalized Organosolv procesing of pine wood. *Industrial engineering chemical research*.1995, 34: 4333-4342.
- [51] Holtzapple, M. The effect of Organosolv pretreatment on the enzymatic hydrolysis of poplar. *Biotechnology and bioengineering*. 1984, 26: 670-676.
- [52] Ferraz, A., Rodríguez, J., Freer, J. Baeza, J. Formic acid/acetona-organosolv pulping of white-rotted *Pinus radiata* softwood. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*. 2000, 75: 1190-1196.
- [53] Gosser, D. *Cyclic voltametry. Simulation and analysis of reaction mechanisms*. Wiley-VCH.
- [54] Shriner, R., Fuson, R., Curtin, D. *Identificación sistemática de compuestos orgánicos*. Ed. Limusa, México.
- [55] Skoog, D., West, D., Holler, F. *Química analítica*. Ed 6ª. Mc Graw Hill.Colombia, 1995.
- [56] Li, K., Xu, F., Eriksson, K. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of nonphenolic lignin model compound. *Applied and environmental microbiology*. 1999, 65(6):2654-2660.
- [57] Morpurgo, L., Desideri, A. pH dependence of redox properties of the type 2 Cu-depleted tree laccase. *Febb letters*, 1980, 113 (2): 153-156.
- [58] Castro, M.A., *Oxidación enzimática de substratos utilizando diversos mediadores*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. 2005.

Bibliografía

- [59] Ruiz, A., Malavé, A. Improved activity and stability of an immobilized recombinant laccase in organic solvents. *Biotechnology letters*. 2000, 22: 229-233.
- [60] Schoevaart, R., Wolbers, M., Golubovic, M. Preparation, and structures of cross-linked enzyme aggregates(CLEAs). *Biotechnology and bioengineering*. 2004, 87: 754-762.
- [61] D' Annibale, A., Stazi, S., Oxire-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenols removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of biotechnology*. 2000, 77: 265-273.
- [62] Thomas, J. H., Drake, J.M., Paddock, J. R., Conklin, S., Johnson, J., Seliskar, C., Halsall, H. B., Heinemar, W. Characterization of ABTS at a polymer-modified electrode. *Electroanalysis*, 2004. 16 (7): 547-555.
- [63] Stewart, J. Cálculo. Conceptos y contextos. Ediciones Thomson International. México, 1998.
- [64] Jiménez, A. Diseño de procesos en ingeniería química. Ed. Reverté. Barcelona, 2003.
- [65] Fors, K., Kokkonen, R., Sagffors, P. E. Heterogeneity of lignin. Lignin. Properties and materials. Symposium series. American Chemical Society. ACS, Washington, USA, 1989.
- [66] Fink, H. P., Weigel, P., Ganster, J., Rihm, R., Puls, J., Sixta, H., Parajó, C. Evaluation of new organosolv dissolving pulps. Part II: Structure and NMMO processability of the pulps. *Cellulose*. 2004, 11: 85-98.

Iztapalapa, D.F., 30 de Junio de 2006.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

“Deslignificación de pulpa de papel mediante un sistema de reciclaje del mediador ABTS²⁻ y un proceso organosolv acoplados”

que presentó la alumna:

Lizzete Ruth Torres Barajas

Comité tutorial:

Director de tesis: Dr. Gustavo Viniegra González
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldívar
Universidad Nacional Autónoma de México-Facultad de Química.

Asesor: Dr. Humberto Vázquez Torres
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Comité de evaluación:

Dr. Ignacio González Martínez
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. Humberto Vázquez Torres
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldívar
Universidad Nacional Autónoma de México-Facultad de Química.

Dra. María Myrna Solís Oba
Instituto Politécnico Nacional-CIBA.

