

## Caracterización Sólido (PULS)

Procedimiento adaptado de National Renewable Energy Laboratory (NREL). Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. 2012. <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>.

### Tabla de Figuras

Figura 1. Teoría de Vaso Comunicante. Created with BioRender.com.....	2
Figura 2. Funcionamiento del SOXHLET con la teoría de Vaso Comunicante. ....	3
Figura 3. Esta parte tiene que estar fría. Created with BioRender.com .....	4
Figura 4. Dónde coger el SOXHLET para evitar que se rompa. Created with BioRender.com.....	5
Figura 5. Este matraz no puede quedarse seco. Created with BioRender.com.....	5
Figura 6. Unidad de Refrigeración .....	6
Figura 7. Probeta. Created with BioRender.com .....	7
Figura 8. Matraz con bolas de vidrio. Created with BioRender.com .....	7
Figura 9. Introducción del cartucho con la muestra sujetado con las pinzas al matraz. ....	7
Figura 10. Cartucho con la muestra dentro del matraz. Created with BioRender.com .....	8
Figura 11. Unión entre el Soxhlet y el matraz con la muestra. ....	8
Figura 12. Tubos Pyrex especiales para echar la muestra. Created with BioRender.com.....	10
Figura 13. Recordatorio de no meter el tubo en la báscula porque se sale de la medición.....	11
Figura 14. Crisol para los sólidos y “Tartera” para los líquidos.....	12
Figura 15. Seguir el orden de las agujas del reloj.....	12
Figura 16. “Tartera” unida a la bomba.....	13
Figura 17. Jeringa. Created with BioRender.com.....	13
Figura 18. Gradilla con los tubos. Created with BioRender.com .....	14
Figura 19. Resumen de los distintos destinos de la materia extraída en la “Tartera” .....	14

### Tablas

Tabla 1. Tiempo (horas, h) y volumen (milímetros, ml) usado en la extracción SOXHLET. ....	4
--	---

### Procedimientos:

1. **Procedimiento para biomasa original (Raw Material)**
  - Biomasa cualquiera sin pretratar
2. **Procedimiento para biomasa con algún pretratamiento**

Existen 2 procedimientos porque al pretratar el material se ha extraído el líquido con agua. Sino está pretratada necesita el paso de la extracción por SOXHLET para eliminar los extractos del sólido.

Importante:

- Las muestras deben de estar secas antes de empezar cualquiera de los procedimientos.

Procedimiento 1. Para Raw Material/Procedimiento 2. Para Material Pretratado

### Secado

Secado de las muestras (si tienen mucha humedad como hojas de olivo, sarmiento, biomásas de invernaderos, etc.).

Se realiza a temperatura ambiente, colocando la biomasa extendida (en la caseta por ejemplo), o a 40º en la estufa. Depende del volumen de biomasa que se desee secar.

Procedimiento 1. Para Raw Material/Procedimiento 2. Para Material Pretratado

### Molienda

Moler a 1 cm en el molino Retsch SM 100 (caseta C6).

Moler a 1 mm en el molino Retsch ZM 200 (5ª Planta B3).

Hay que tener mucho cuidado de no moler las muestras húmedas porque se queda atascado el molino.

Procedimiento 1. Para Raw Material

### SOXHLET

#### Uso

La extracción SOXHLET se usa para realizar extracciones de compuestos sólidos usando algún disolvente. Para la caracterización, primero se usa agua y después etanol (para esta última necesita más volumen al evaporarse antes que el agua). Se consigue calentando la muestra y el disolvente arrastra los extractos de la muestra. Cuando éste tiene un volumen determinado vuelve al matraz con las sustancias disueltas de la muestra.

Se basa en la teoría del vaso comunicante, igual que cuándo se saca gasolina con una manguera:

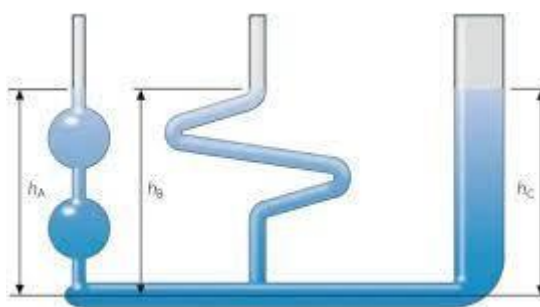


Figura 1. Teoría de Vaso Comunicante. Created with BioRender.com

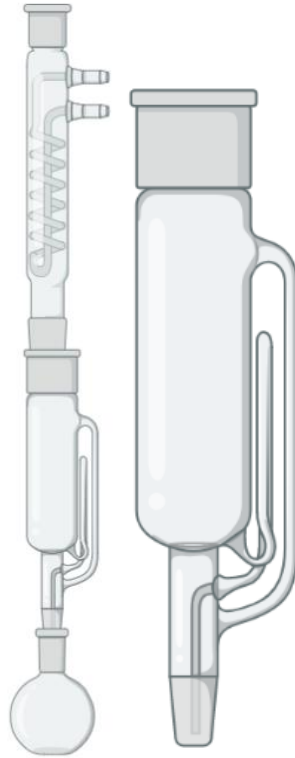


Figura 2. Funcionamiento del SOXHLET con la teoría de Vaso Comunicante. Created with BioRender.com

## Materiales Necesarios

Bolas de vidrio

Matraz

Soxhlet

## Equipos Necesarios

Campana de Gases

Refrigerador

## Condiciones

Hay que tener en cuenta que todo el material que se vaya a usar tiene que estar seco previamente, metiéndolo en la estufa (105 °C) para asegurarse de ello. Antes de usarlo, se saca de la estufa y se lleva al desecador un tiempo antes, 20 o 30 minutos, hasta que se enfría.

Cada extracción dura 24 h, aunque solo hay que vigilar hasta que se produzcan 1 o 2 ciclos (se llene de líquido arriba y precipite al matraz abajo) durante aproximadamente 1 hora (vigilarlo todo lo que sea posible para evitar accidentes).

Finalmente sabremos el peso de lo que se ha extraído porque pensaremos los matraces antes y después de la extracción.

La extracción SOXHLET consta primero de una extracción acuosa y luego de una con etanol. Usando el tiempo y volumen de siguiente tabla:

Extracción Acuosa	SOXHLET	Extracción Etanol
24	Tiempo/Horas (h)	24

160	Volumen/mililitros (mL)	180
-----	-------------------------	-----

*Tabla 1. Tiempo (horas, h) y volumen (milímetros, ml) usado en la extracción SOXHLET, acuosa y del etanol. En la extracción del etanol se usa más volumen porque se evapora más que el agua.*

Cosas a tener en cuenta:

- Tocar cada cierto tiempo el tubo del refrigerante que va hacia el matraz, ya que éste del B3 suele fallar o no calentar lo suficiente.



*Figura 3. Esta parte tiene que estar fría. Created with BioRender.com*

- Para manejar el Soxhlet se debe de coger por arriba porque es la parte que menos quema y la que menos probabilidades tiene de romperse. La parte del “asa” es muy delicada y se rompe muy fácilmente.



Figura 4. Dónde coger el SOXHLET para evitar que se rompa. Created with BioRender.com

- Hay que vigilar que el matraz siempre tenga líquido, sino se rompe.



Figura 5. Este matraz no puede quedarse seco. Created with BioRender.com

- ¿Qué es un ciclo del Soxhlet? Se produce cuando se vacía entero y vuelve a empezar a condensar. Cuando esto ocurre hay que bajar la temperatura y vigilar que las gotas no caigan ni muy rápidas ni muy lentas. Por ejemplo, rápido sería 1 gota por segundo.
- Truco para sacar el Soxhlet

Aflojar algo el tubo del refrigerador y subirlo aguantándolo de nuevo. Luego, sacar como se mete.

- Final de la extracción con Etanol.

El etanol es un compuesto caro y puede recuperarse al final de la extracción. Para ello, se quita el cartucho y se calienta igual, pero esta vez hay que estar atentos para que cuándo acabe el ciclo y caiga lo haga en la garrafa de etanol. Es importante usar unos guantes térmicos.

## Procedimiento

Paso 1. Pesar Cartucho Inicial.

Pesamos el cartucho vacío, el cartucho con la muestra y el cartucho con la muestra y el algodón en la balanza analítica. El algodón solo se usa para taparlo y evitar que se salga la muestra.

Hacemos un triplicado de cada muestra, pesamos 3 cartuchos (vacío, biomasa y biomasa + algodón) 3 veces.

## Paso 2. Refrigeración.

Hay que encender la unidad de refrigeración dejando pulsado el botón Enter, saliendo unos números que muestran la temperatura a la que está refrigerando.



*Figura 6. Unidad de Refrigeración*

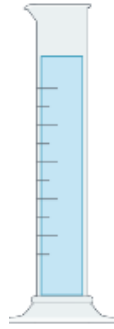
## Paso 3. Montaje del SOXHLET.

Primero, medimos 160 mL del disolvente (para el agua) en una probeta. Luego, lo echamos en un matraz (Secado en la estufa y enfriado en el desecador) junto a las bolas de vidrio (para que se produzca una ebullición homogénea, normalmente se usan 2 bolas). A continuación, ponemos el cartucho con la muestra sólida y taponada con un algodón dentro del matraz con ayuda de unas pinzas.

En segundo lugar, unimos la boca del refrigerante con el cuerpo del Soxhlet, y éste con el matraz, para ello las bocas del Soxhlet y del Matraz deben estar impregnadas de silicona, para una correcta unión, sino lo estuviera añadiéndola.

Por último, poner la temperatura a máxima potencia.

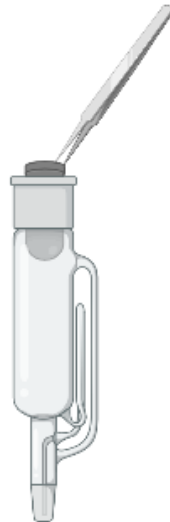
Los calentadores de los Soxhlet del B3 no calientan mucho, así que solo se usan para hexano o etanol, que se evapora mejor.



*Figura 7. Probeta. Created with BioRender.com*



*Figura 8. Matraz con bolas de vidrio. Created with BioRender.com*



*Figura 9. Introducción del cartucho con la muestra sujetado con las pinzas al matraz. Created with BioRender.com*



*Figura 10. Cartucho con la muestra dentro del matraz. Created with BioRender.com*



*Figura 11. Unión entre el Soxhlet y el matraz con la muestra. Las líneas rojas representan dónde debe ir la silicona. Created with BioRender.com*

Cuando transcurren las 24 horas de la extracción acuosa:

Medir el volumen total y coger 10 ml de cada muestra acuosa y llevarla al HPLC del B3 para analizarlas. Además, pasar por resina, filtrar, y analizar en el HPLC B3 (20  $\mu$ L).

Luego, de esos 10 mL, coger 5 mL y añadirle 144  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para hacer post-hidrólisis. Una vez realizado esto, llevar al Autoclave 120  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, y pasar por resina y carbonato. Por último, filtrar y analizar finalmente en el HPLC B3 (20  $\mu$ L).

Cuando transcurren las 24 horas de la extracción con Etanol:

Medir el volumen total y secar los matraces en la estufa a 105  $^{\circ}\text{C}$ , una vez secos, pesarlos.

A continuación, secar los cartuchos con los sólidos a 40  $^{\circ}\text{C}$  y una vez secos pesarlos. Estos sólidos se van a utilizar en la siguiente etapa. Sin embargo, comprobar primero que los resultados de los



extractos son repetitivos para mezclar los 3 sólidos de los cartuchos. Si el error es muy alto, hay que descartar el cartucho que tenga mayor desviación.

Paso 5. Desmontar el Soxhlet.

Al desmontar el SOXHLET usamos los matraces, los cartuchos y los líquidos:

- Los Matraces

Los matraces con el líquido se llevan a la estufa para que se sequen. Luego, para conocer la cantidad de extracto que hay se pesan en la balanza analítica.

- Los Cartuchos

Los cartuchos se secan en la estufa:

- Entre 40 y 50 grados centígrados (°C)
- Líquidos

Cogemos 10 mL y se llevan al frigorífico para filtrarlos más tarde.

Paso 6. Mirar los resultados HPLC.

Para saber qué cartuchos de los que forman el triplicado podemos mezclar, vemos los resultados del HPLC y la diferencia de peso entre los matraces, vacíos y secos en la estufa, tras la extracción SOXHLET. Se mezclan los que sean similares y, sino lo fueran mezclar los 2 más iguales.

**Procedimiento 1. Para Raw Material/Procedimiento 2. Para Material Pretratado**

## PULS

Este es el paso más largo y laborioso, a partir de aquí se lleva a cabo los mismos pasos en ambos procedimientos.

## Uso

Hidrólisis ácida de las muestras para poder caracterizarlas.

## Materiales Necesarios

Tartera (dispositivo de multifiltración, 12 posiciones)

Tubos plástico 10 mL

Filtros de celulosa

Crisoles

Filtros de jeringa, 0,45  $\mu\text{m}$

Jeringas (2 mL)

Viales

Eppendorfs

## Equipos Necesarios

Autoclave

Baño termostático

Espectrofotómetro UV

Bomba de Vacío

### Procedimiento

Lo primero es sacar la hoja de los datos del PULS ya que son muchos datos y pueden perderse si se apuntan separados.

- 1) Pesar el sólido a caracterizar (materia original o pretratada)

En crisoles, pesar 1 gramo aproximadamente para analizar humedad y cenizas (por triplicado).

- 2) Preparar la muestra

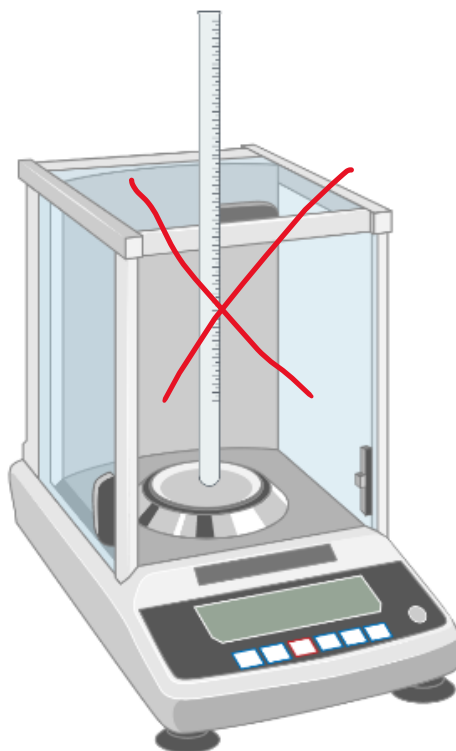
Pesamos 0,3 gramos (g) de muestra en el pesa materia, hay que tener cuidado porque suele estar electrificada y se queda pegada a todo. A continuación, lo ponemos en un tubo de vidrio echándolo con cuidado, son especiales y aguantan temperatura y presión para después en el autoclave. Este paso puede hacerse el día de antes para acelerar el procedimiento. También se pesa 0,3 g de cada patrón de los azúcares.

Preparar columnillas (con resina y carbonato), eppendorfs, viales y jeringas con filtro.



*Figura 12. Tubos Pyrex especiales para echar la muestra. Created with BioRender.com*

Tener en cuenta que el tubo no se puede meter dentro de la báscula porque salen 200 g y se salen de medición.



*Figura 13. Recordatorio de no meter el tubo en la báscula porque se sale de la medición. Created with BioRender.com*

Luego le añadimos 3 mL de Ácido Sulfúrico al 72% y llevamos toda la gradilla (con todos los tubos con la muestra y el ácido) al baño de agua a 30°C durante 60 minutos (min). Cada tubo tiene una varilla de vidrio para poder agitarla cada 7 o 10 min.

Después de los 60 min, se saca del baño y se le añade 84 mL de agua destilada, cerrando los tubos. A continuación, y por seguridad para ver si habrá pérdidas en el siguiente paso, se pesan los tubos para poder compararlos con lo que pesen al salir del siguiente paso, el autoclave. Este dato solo sirve para eso y debe de ser igual o diferenciarse como mucho 0,1 aproximadamente, sino habrá que ajustar los datos posteriores.

### 3) Autoclave

Los tubos se pesan antes y después de llevar al autoclave para ver que no hay pérdidas. Se pesan de la siguiente manera:

Figura. Como pesar los tubos en la báscula.

Los tubos se llevan al autoclave a 120 °C durante 60 min, para romper los oligómeros y tener los azúcares disponibles. Asegurarse que el tapón y el tubo tengan el mismo número.

Cuando salen del autoclave hay que dejarlos enfriar, después se pesan para poder compararlos con los pesos del paso anterior y así saber si hubo pérdidas. Si hubiera pérdidas se hacen cálculos para saber el volumen, normalmente 1 ml = 1 g. Si la diferencia de pesos es de 0,1 o 0,2 es normal. Coger con pinzas la goma si se queda dentro de la botella.

### 4) Filtrar las muestras con la “Tartrera”

Preparamos la “Tartrera” para ello llevaremos a cabo varios pasos:

#### I. Pesamos el Crisol vacío

- II. Pesamos el Crisol + Filtro
- III. Ponemos el filtro en la “Tartera”
- IV. Ponemos unos tubos de plástico vacíos dentro de la “Tartera” con sus números correspondientes
- V. Colocamos cada filtro en cada pocillo, en relación a sus números, y siempre que oculten la rejilla de plástico de debajo.
- VI. Metemos los tubos debajo de cada pocillo.

Una vez tenemos preparada la “Tartera” llenamos un pocillo aproximadamente de cada muestra, salvo de los patrones que no se filtran, y cuándo ésta acabe de filtrarse sacamos con mucho cuidado las 2 tapaderas de la “Tartera”, con mucho cuidado de no mover los filtros (truco: sujetar fuerte las dos partes blancas para que no se muevan). A continuación, sacamos los tubos y sacamos 10 ml de cada tubo, que serán analizados posteriormente en el HPLC y lignina.

Cuando has realizado este paso vuelves a poner con mucho cuidado las 2 tapaderas de la “Tartera” dónde estaban y sigues filtrando lo que queda de muestras en los tubos. Los tubos de dentro de la “Tartera” ya no tienen que estar, el líquido que se filtre se puede tirar. Intentar pasar todo el contenido de líquido y sólido de los tubos a la tartera, para ello usar algo de agua destilada para recuperar el sólido que queda en las paredes del tubo.

Al final, cuando acabas de filtrar tienes el líquido recogido de los tubos cuándo se filtró el primer pocillo, 10 ml, y los sólidos que se han quedado en el filtro. Con estos haremos varias cosas:



Figura 14. Crisol para los sólidos(<http://www.instrumentosdelaboratorio.net/2012/08/crisol.html>) y “Tartera” para los líquidos.

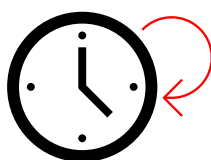


Figura 15. Seguir el orden de las agujas del reloj.

Muy importante cuándo acabe la filtración y haya que quitar los filtros, dejarlos caer y no tocarlo con las manos, sino con las pinzas y espátula pequeña.

Para que filtre mejor se le añade a la “Tartera” una bomba de vacío.



Figura 16. "Tartera" unida a la bomba.

- Líquido de los Tubos
  - Extraes 1,2 ml para el HPLC del B3
    - El líquido tiene que pasar por columnilla antes de pincharlo en el HPLC del B3 porque es más preciso, pero es muy sensible al ácido. Además, una vez pase tiene que filtrarse con la jeringa con filtro



Figura 17. Jeringa. Created with BioRender.com

- Extraes 1 ml para el HPLC del C6
  - Con la Jeringa con filtro
- Lo que sobra se usará en el espectrofotómetro
  - Para saber la Lignina Ácido Soluble (LAS)
  - Normalmente se realizará otro día
  - El procedimiento es el siguiente:
    - Hay que ir probando qué dilución (Ácido Sulfúrico 3-4% 3-4 y Agua) es la adecuada para cada muestra, para los triplicados suele ser la misma. Las diluciones se realizan con la muestra y Ácido Sulfúrico 3-4%.
    - El Espectrofotómetro tiene que dar una longitud de onda entre 0,2 y 0,7 para que sirva.
    - No olvidar apuntar que dilución lleva cada muestra.

Los tubos los pones en una gradilla.

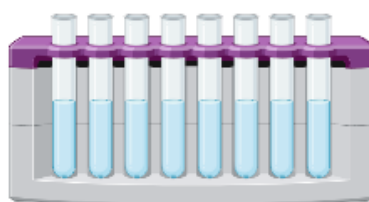


Figura 18. Gradilla con los tubos. Created with BioRender.com

Esquema de esta parte:

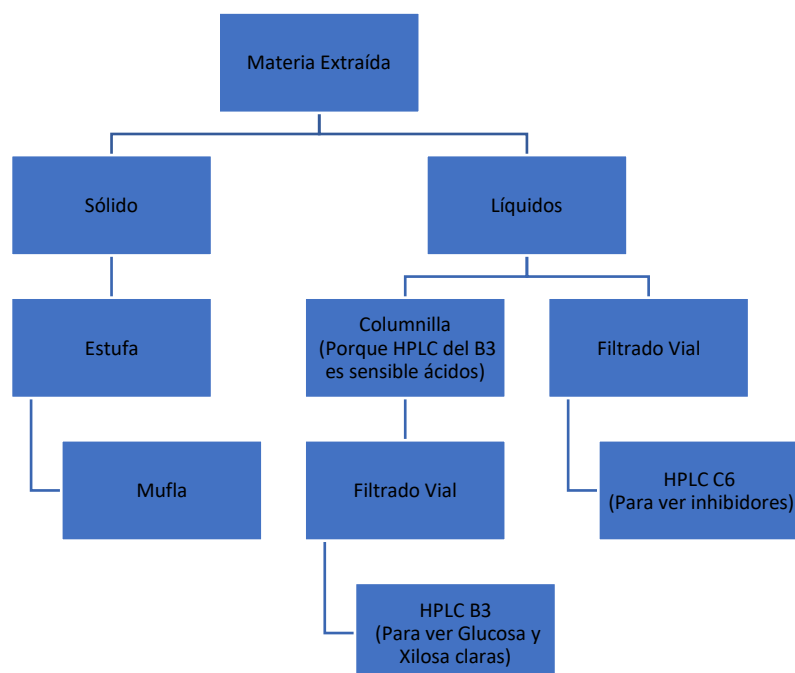


Figura 19. Resumen de los distintos destinos de la materia extraída en la "Tartera".

- Sólidos

Se filtra todo el sólido. Hay que recordar que para que caiga todo el sólido hay que limpiar bien con agua. A continuación, se pone el filtro con el sólido a cada crisol y se lleva a la estufa a 105 °C durante 24h.

Muy importante, hay que apuntar el número del crisol con rotulador arriba y con lápiz abajo, sino se borra con el calor en los siguientes pasos.

Después, se pesan los crisoles, antes de pesarlos se meten en el desecador durante unos 30 o 45 min. Este peso se apunta en la columna: Crisol + Filtro + Lignina + Cenizas.

Una vez llevado a cabo el paso anterior se llevan los Crisoles a la mufla, a 575 °C con un tiempo de 3 h para mantenimiento y uno de subida de 1 h. Por último, al día siguiente se llevan a la estufa, a 105 °C durante 1h, luego al desecador, mismo tiempo que anteriormente, y se pesan. Este dato se apunta en la columna Crisol + Ceniza.

Luego, calculamos la humedad de las cenizas de las muestras, pesando el crisol vacío y el crisol con la muestra. Esta muestra es aproximadamente 1 g y es de la inicial, aparte de todo el proceso, de la misma materia que cogiste 0,3 g al principio. A continuación, los crisoles se llevan a la estufa a 105 °C durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo y habiéndose enfriado se llevan al desecador el tiempo de siempre y se pesan, se apunta en la columna de Crisol + 1 g Muestra Seca. Por último, se llevan a la mufla, en las mismas condiciones de siempre y llevándose al desecador igual, y se pesan, anotando el peso en la columna de Crisol + Cenizas. Sin embargo, esta última parte se realiza en huecos porque no entra en el proceso.

#### 4) Analizar los Resultados

Se analizan los resultados en un libro Excel preparado para meterle los resultados y obtener todo lo necesario.

Hay que tener en cuenta:

- Siempre hay que seguir todos los pasos cuando hay algún sólido que caracterizar, así que es aconsejable acumular el máximo de muestras posibles para un mejor aprovechamiento del tiempo.
- Cuidado con los filtros.

Los filtros pueden volarse fácilmente o moverse, así que hay que poner la tapadera de la tartera rápido. A continuación, cerramos con la llave fuerte para asegurarnos más que no se mueven.

- Cuando hay que recuperar los tubos después de la primera filtración coger y levantar las 2 partes de la “Tartera” juntas, así evitamos que se muevan los filtros.
- Patrones.

Tenemos 4 patrones formados por el duplicado de Xilosa y Glucosa, no es necesario hacer un triplicado, para que los mida el HPLC del B3, así que deberán pasar por columnillas.

- Fregar la gradilla con los tubos del Puls.

Para ello, poner la gradilla boca abajo y secar. Si no da tiempo a limpiarla mejor darle solo con agua y secar rápido en la estufa.

#### Paso Extra. Hidrólisis Enzimática

Si haces este paso tienes más información porque si el sólido se hidroliza bien la fermentación tendrá más eficacia. Aunque es útil para cuando funciona la fermentación, si ésta funciona pasa a ser un paso obligatorio.

Ya existe un procedimiento hecho aparte.