

Transformación termoquímica de biomasa residual y su actividad bactericida

Leonardo Chávez Guerrero^{A*}, María Elena Cantú Cárdenas^A,
Javier A. Garza Cervantes^A, Margarita Ortiz Martínez^A,
Denisse Margarita Elizondo Escamilla^A, Ovidio Salazar Salazar^B,
Diana Caballero Hernández^A

^A Universidad Autónoma de Nuevo León

^B Universidad Autónoma de Tamaulipas

leonardo.chavezgr@uanl.edu.mx

RESUMEN

El hidróxido de calcio [Ca(OH)₂] se reconoce como un bactericida eficaz y además se aplica ampliamente en materiales de construcción y en la industria de alimentos. El Ca(OH)₂ es principalmente producido por la hidratación del óxido de calcio (CaO), es cual es obtenido mediante la descomposición térmica del carbonato de calcio (CaCO₃) proveniente de fuentes como la piedra caliza. En este trabajo, se sintetizó hidróxido de calcio mediante la transformación termoquímica de residuos de biomasa de la industria tequilera (bagazo). Las muestras se caracterizaron por difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido, que muestran que la biomasa procesada a 600 °C se compone principalmente de CaCO₃ y que el Ca(OH)₂ se produce después de la calcinación a 900°C seguida de hidratación. Se evaluó la actividad bactericida del Ca(OH)₂ obtenido de bagazo mediante los ensayos de difusión en agar y viabilidad por turbidez, en contra de las bacterias Escherichia coli y Enterococcus faecalis. Esta es la primera vez que Ca(OH)₂ obtenido a partir de bagazo de agave se ha propuesto y evaluado como bactericida, con resultados positivos, introduciendo una fuente alternativa y sustentable para este compuesto.

PALABRAS CLAVE

Sustentabilidad, bagazo de tequila, ceniza, hidróxido de calcio, carbonato de calcio, bactericida.

ABSTRACT

Calcium hydroxide [Ca(OH)₂] is recognized as an efficient bactericide and is widely applied in construction materials and the food industry. Ca(OH)₂ is mainly produced by hydration of calcium oxide (CaO), where CaO is obtained via thermal decomposition of calcium carbonate (CaCO₃), from sources such as limestone. In this work, calcium hydroxide was synthesized by the thermochemical transformation of waste biomass from the tequila industry (bagasse). The samples were characterized by X-ray diffraction and scanning electron microscopy, showing that the processed biomass at 600°C is composed mainly of CaCO₃ and Ca(OH)₂ is produced after calcination at 900 °C followed by hydration. Bactericidal properties were investigated using the agar diffusion

assay and viability test against Escherichia coli and Enterococcus faecalis. This is the first time that Ca(OH)₂ obtained from agave bagasse has been proposed and tested as a bactericidal, introducing an alternative source of this compound.

KEYWORDS

Sustainability, tequila bagasse, ash, calcium hydroxide, calcium carbonate, bactericidal.

INTRODUCCIÓN

La cosecha de biomasa de las tierras semiáridas es una fuente muy prometedora de bienes,¹ ya que el uso de las mismas, aumenta las tierras cultivables disponibles para la producción de alimentos.² Las plantas xerófitas de la familia Agavaceae como *Agave americana* o *Agave tequilana*, que crecen en tierras semiáridas, son utilizadas como fuente de alimentos, fibras, energía y bebidas espirituosas como el tequila y el mezcal.^{3,4,5} Las 300 especies de agave conocidas son todas nativas del continente americano y se sabe que hace 7,500 años, los humanos las utilizaban para fabricar calzado, tejiendo fibras de la penca empleando espinas como agujas.⁶

La industria tequilera produce diversos desechos; sólidos (bagazo), líquidos (vinazas) y gaseosos, como el CO₂.⁷ A principios de la década de 1990 se registró un aumento en la popularidad del tequila en todo el mundo, haciéndola una industria atractiva a nivel mundial. La producción de bebidas alcohólicas procedentes de agave típicamente sigue 5 pasos: cocción, molienda, fermentación, destilación y añejamiento. Recientemente, se han desarrollado diversas aplicaciones que toman ventaja del bagazo de agave; como combustible,⁸⁻⁹ en fabricación de papel,¹⁰ en alimentación de animales y como composta para la agricultura ecológica.⁴ Convenientemente, como fuente de compuestos de calcio, el bagazo de tequila, una biomasa renovable,¹¹ tiene el potencial de mitigar el calentamiento global como lo han demostrado otros tipos de biomasa, como la jatrofa, aceite de palma y cáscara de coco.¹²

Una práctica común en el manejo de los residuos generados por la industria del tequila es secar al sol el bagazo, seguido de su incineración para reducir volumen, esto permite la recuperación de energía, pero produce grandes cantidades de ceniza. En la actualidad, hay un interés creciente

en la recuperación de hidróxido de calcio, óxido de calcio y carbonato de calcio a partir de recursos renovables, como la ceniza de bagazo. Hoy en día, el hidróxido de calcio se obtiene principalmente por la calcinación de piedra caliza a 900 °C, que es posteriormente hidratada. Este método es costoso, debido al consumo de energía, debido al uso de combustibles fósiles, necesaria para alcanzar la temperatura de calcinación, lo que también produce altas cantidades de CO₂, una de las principales causas del calentamiento global.¹³

El Ca(OH)₂ tiene una amplia gama de aplicaciones; se ha utilizado desde la antigüedad como un componente del cemento⁹ y más recientemente como antifúngico,¹⁴ como relleno bactericida de los conductos radiculares en los tratamientos de endodoncia,¹⁵ degradación fotocatalítica frente al azul de metileno,¹⁶ como almacén de calor de las plantas solares concentradas,¹³ moduladores del pH en los suelos y en la industria del papel para recristalizar CaCO₃.¹⁷

El objetivo principal de este trabajo ha sido evaluar el uso potencial del bagazo calcinado de la industria del tequila como agente bactericida, utilizando *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) como modelo de estudio. También tiene como objetivo introducir una fuente alternativa y renovable de Ca(OH)₂ que tiene el potencial de reducir el impacto ecológico de la industria del tequila y la piedra caliza en todo el mundo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de Ca(OH)₂ a partir del bagazo de agave

El bagazo recibido se introdujo en un horno Thermolyne dentro de un contenedor (crisol de alúmina) y se calcinó a 600 °C durante 2 horas hasta obtener ceniza; esta muestra fue denominada C600. A continuación, la ceniza (C600) se cribó utilizando un tamiz estándar de cobre y se calcinó a 900 °C durante 5 horas. Entonces, la ceniza se vació en agua desionizada durante 30 minutos, finalmente, el material se dejó secando a 100 °C durante 5 horas; esta muestra fue nombrada C900. Para comparar la actividad antimicrobiana se utilizó Ca(OH)₂ grado analítico adquirido en Sigma-Aldrich, el cual se identifica de aquí en adelante como COM.

Microscopía Electrónica de Barrido y Difracción de Rayos X

La morfología y composición de las muestras se determinaron utilizando un microscopio electrónico de barrido (MEB) de alta resolución Philips FEI XL30 Sfeq, con un sistema de microanálisis y dispersión de energía por rayos X, y una energía de aceleración de 10 kV. Todos los compuestos se analizaron por difracción de polvo de rayos X (DRX) en un difractómetro Bruker D8 Advance. Los difractogramas se obtuvieron de $2\theta = 20-60^\circ$ utilizando una radiación Cu K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$).

Evaluación de la actividad bactericida

Para probar la eficacia de los compuestos para inhibir el crecimiento microbiano, se utilizó el ensayo de difusión en agar utilizando para ello dos bacterias, *E. coli*, ATCC 25922 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) y *E. faecalis*, ATCC 29212. Los cultivos de prueba se prepararon mediante subcultivo en caldo de tripticasa de soya (Merck), la pureza del cultivo se controló por observación al microscopio. Para el ensayo de difusión en agar, se inocularon doscientos microlitros (μL) del cultivo directo o de una dilución 1:10 en una placa de agar, el cultivo fue esparcido cuidadosamente en la superficie de agar Muller-Hinton (Bioxon) usando un triángulo de vidrio estéril. Se prepararon aproximadamente 10 μL de pasta a partir de cada muestra, y se colocaron en posiciones equidistantes en la superficie del agar. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y posteriormente se examinaron para determinar la presencia de halos de inhibición alrededor de los compuestos. Todas las pruebas se realizaron por triplicado para cada microorganismo.

Prueba de viabilidad por turbidez

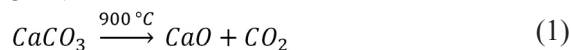
Se prepararon tubos con 2 ml de Caldo LB (Bioxon), los cuales se inocularon con $20\mu\text{L}$ de la dilución 1:10 del cultivo microbiano y posteriormente se adicionaron 0.05 g de cada uno de los compuestos a evaluar o el compuesto de referencia. La incubación se realizó en agitación a 150 rpm a 37°C y se les determinó la absorbancia a una densidad óptica de 596 nm a los 3 y 6 días. Para hacer las mediciones de absorbancia se realizó una

dilución 1:10 en condiciones de asepsia en solución isotónica. Las pruebas se realizaron por triplicado, se llevó un control de cultivo sin tratar y como blanco se utilizó medio de cultivo sin inocular. Adicionalmente se realizó un conteo de células vivas mediante la técnica de dilución y siembra en placa empleando como medio agar LB (Bioxon).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

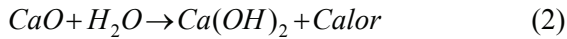
En la figura 1, los resultados de rayos X muestran los principales compuestos encontrados en los tres materiales estudiados. Para C600, el perfil muestra un pico que coincide con carbonato de calcio (PDF 00-004-0636), un hallazgo no del todo inesperado, ya que las plantas extraen minerales del suelo, entre ellos calcio. En el caso de C900, el perfil se corresponde con hidróxido de calcio, el producto de la descarboxilación del CaCO_3 . Al analizar los difractogramas de las muestras estudiadas, teóricamente, sería de esperar que el perfil para la muestra COM coincidiera con el perfil disponible en las bases de datos para $\text{Ca}(\text{OH})_2$, sin embargo, de acuerdo con los resultados, la muestra COM se compone de una combinación de hidróxido de calcio y carbonato de calcio, por ejemplo, el pico observado a 28.5° puede explicarse por la exposición repetida del polvo grado reactivo al CO_2 en el medio ambiente, una vez se ha abierto el recipiente, lo que produciría una carbonatación parcial de la muestra.

En la ecuación 1 se muestra la reacción que sufre la ceniza de bagazo durante el proceso de calcinado. Durante este proceso el 56% (p/p) permanece como óxido de calcio, mientras que el 44% restante corresponde al dióxido de carbono. Luego por cada 1,000 kg de ceniza generada se producirán 560 kg de CaO , pero las emisiones netas de CO_2 no se verán afectadas, dado la fuente renovable utilizada (bagazo).



En la ecuación 2 se indica la reacción exotérmica intermedia necesaria para obtener hidróxido de calcio, donde la cal se mezcla con agua para obtener $\text{Ca}(\text{OH})_2$ más calor. De acuerdo con esto, 560 kg de CaO producirán 740 kg de hidróxido de calcio. La ecuación 3 muestra la reacción de carbonatación

de hidróxido de calcio, que se produce de forma espontánea al aire o un medio ambiente con presencia de CO_2 . La ecuación 3 explica el comportamiento de la muestra COM, que es expuesto a CO_2 , y que fue corroborado por los resultados de rayos X en la figura 1.



En la figura 2 se muestra la morfología de las muestras después de las transiciones químicas. En la figura 2(a) la muestra COM presenta formas de partícula irregulares, esto se puede atribuir a la utilización de piedra caliza molida durante el proceso de síntesis de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. En la figura 2(b) todavía es posible discernir la estructura del agave, con pequeñas partículas semicirculares.⁸ Finalmente, en la figura 2(c) se puede observar el proceso de cristalización del CaO , obteniéndose morfologías regulares (hexagonales) de hidróxido de calcio.

La presencia de CaCO_3 en el bagazo podría explicarse por la capacidad de las plantas para romper y disolver la roca circundante mediante la excreción de compuestos ácidos presentes en exudados de las raíces,¹⁸ este mecanismo es utilizado por las plantas para obtener minerales de suelos pobres que posteriormente pueden recuperarse para diversas aplicaciones. Del material que resta de la planta

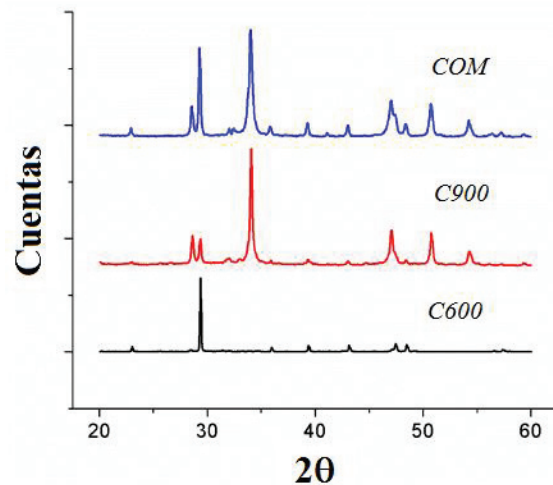


Fig. 1. Patrones de difracción (DRX) de las muestras estudiadas.

(ceniza), una vez que el bagazo ha sido usado como biocombustible, es posible proporcionar compuestos con aplicación potencial en el área médica y diversas industrias.

La tabla I indica la composición de las muestras (en porcentaje atómico - At%) obtenida por microanálisis, durante la adquisición de imágenes en el MEB. Los resultados coinciden con la información obtenida por rayos X y corroborados por las ecuaciones 1 y 3. Las diferencias en la composición entre C900 y COM son evidentes. La composición inusual mostrada por la muestra

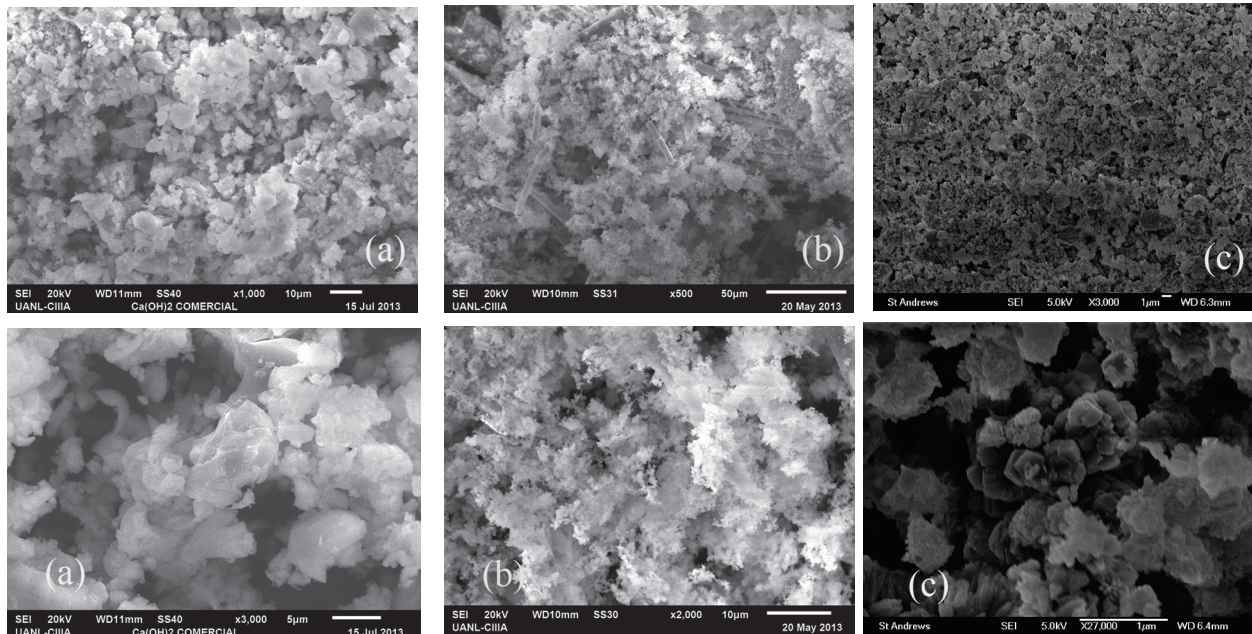


Fig. 2. Imágenes de MEB mostrando la morfología de COM en (a), C600 en (b) y C900 en (c).

Tabla I. Resultados del microanálisis que muestran la composición elemental de las muestras estudiadas.

	C600	C900	COM
Elemento	At%	At%	At%
C	26.50	10.13	24.00
O	52.39	60.49	45.06
Ca	21.11	29.38	30.94

COM, en comparación con C900, se puede explicar considerando la presencia de Ca(OH)_2 y CaCO_3 durante el análisis. La información detallada sobre la caracterización de la ceniza de agave se puede obtener en González-López *et al* 2015.

Evaluación de la actividad bactericida

Usando el ensayo de difusión en agar, se observó un halo de inhibición alrededor del Ca(OH)_2 tanto en cultivos de *E. coli* como de *E. faecalis*, tanto en las placas inoculadas con cultivo sin diluir y con cultivos diluidos 1:10 también, mientras que este efecto no fue observado con el carbonato de calcio (figura 3). Sin embargo, los mecanismos por los que el Ca(OH)_2 inhibe el crecimiento bacteriano no se conocen o comprenden bien, se han propuesto al menos tres mecanismos, pero la controversia continua.¹⁹ En la figura 3(a), se presenta un acercamiento de los halos de inhibición de los diferentes tratamientos. En el caso de *E. faecalis*, el tamaño de radio del halo es aproximadamente el mismo que el observado para COM y C900, respectivamente. Con C600 no se observó un efecto sobre el crecimiento bacteriano, lo que excluye la posibilidad de actividad bactericida inherente de la ceniza sin procesar. En el caso de *E. coli*, el tamaño del halo de inhibición es muy similar para C900 y COM, lo que sugiere que la ceniza obtenida C900 posee una potencia muy parecida a COM, a pesar de las diferencias en su composición sobre esa bacteria. Sin embargo, el tamaño de halo no es el principal factor a tener en cuenta para la mayoría de las aplicaciones, ya que los mecanismos de actividad bactericida putativos de Ca(OH)_2 son mediados por contacto.¹⁹

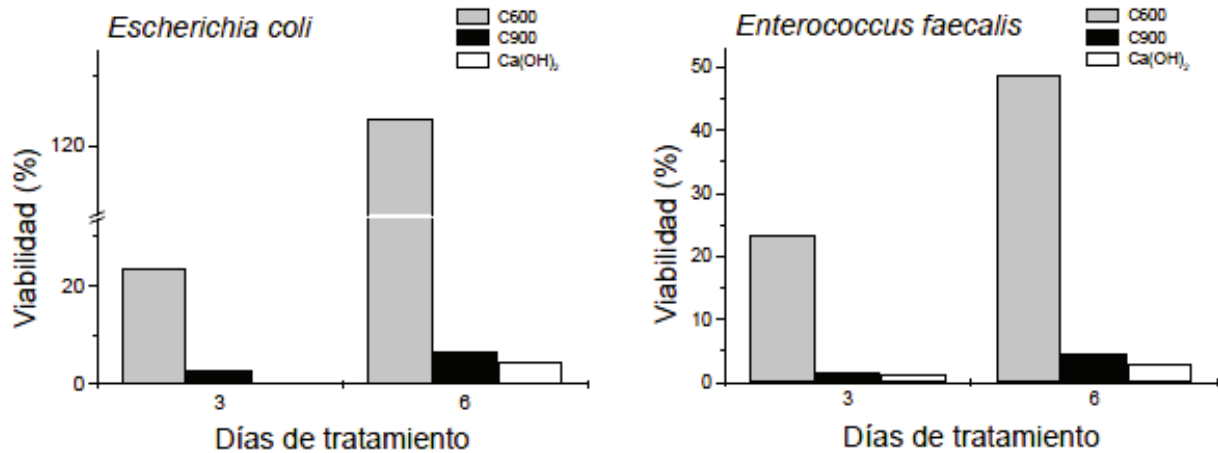
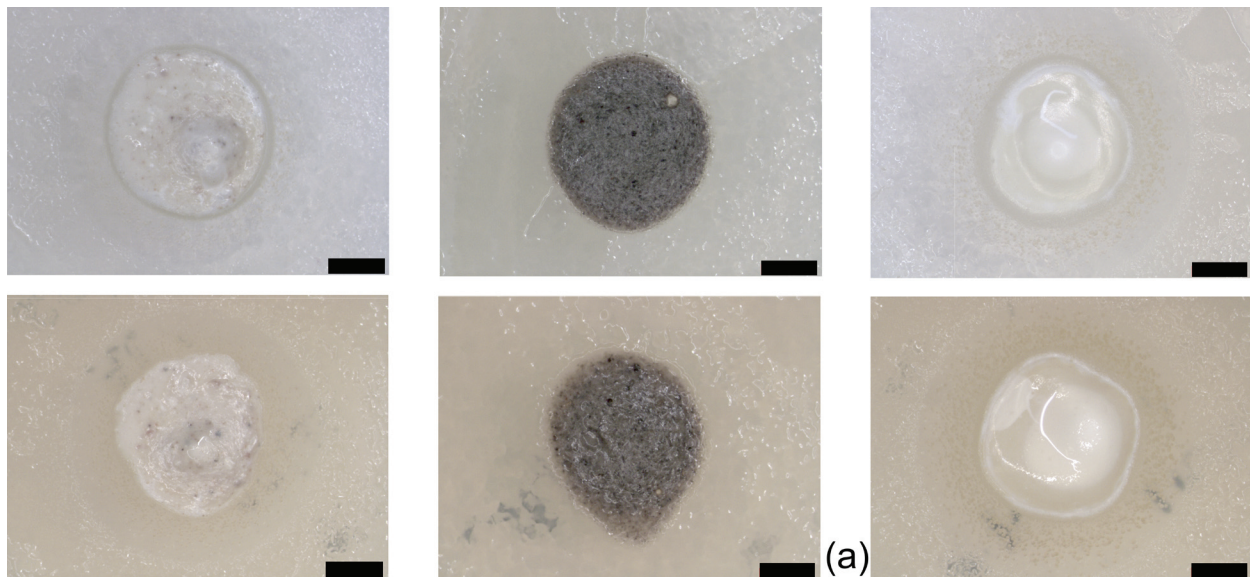
En la figura 3 (b) se puede observar el crecimiento microbiano en los cultivos experimentales, representado como la viabilidad de los cultivos a diferentes tiempos, la viabilidad se determinó

midiendo la absorbancia de los cultivos a 596 nm por el método de turbidez en tubo; se puede observar que los resultados fueron similares para C900 y Ca(OH)_2 comercial y claramente distintos con respecto a C600. Se determinó la viabilidad a los días 3 y 6 y se empleó un cultivo control sin tratamiento, el cual representa el crecimiento “total” a cada uno de los tiempos analizados (100% de células viables) y sirvió como referencia para el cálculo de viabilidad de las muestras estudiadas. La principal diferencia en los resultados de actividad bactericida entre las muestras analizadas, podría deberse a que el material comercial fue intensivamente procesado, mientras que C900, contiene todavía trazas de elementos o impurezas tales como K, P, Mg^{11} normalmente contenidas en la planta.¹⁸

Para el año 2012, el promedio de producción de tequila fue de 253 millones de litros. La producción de un litro de tequila requiere 7 kg de agave, lo que equivale a una demanda de aproximadamente 1,771 millones de toneladas de agave tan solo ese año. El subproducto generado durante el proceso representa el 40% del peso húmedo del agave utilizado en la fabricación de tequila, es decir, se generaron 708,400 toneladas de bagazo durante el 2012. A partir de este material, aproximadamente el 16% del peso húmedo de bagazo se puede recuperar como ceniza cuando se calcina a 900 °C,¹¹ mientras que el manejo inadecuado de estos residuos podría ser perjudicial para el ambiente y la salud humana. Por todo esto, es de gran importancia encontrar alternativas sustentables para el manejo de subproductos potencialmente contaminantes, utilizando procedimientos y aplicaciones como el que se propone en el presente trabajo.

CONCLUSIONES

Según los resultados, se puede concluir que es posible obtener Ca(OH)_2 a partir de la combustión de residuos de agave utilizando un método sencillo, además, este hidróxido de calcio posee actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *E. faecalis*, dos microorganismos patógenos de importancia para la salud dental y donde el Ca(OH)_2 ha sido tradicionalmente usado como bactericida. El uso de cenizas procesadas a base de bagazo de agave posee varias ventajas para su uso sustentable: 1)



(b)

Fig. 3. (a) Halo de inhibición visto con microscopía óptica a 8x. Barra de escala de 2 mm. En (b) se muestra el crecimiento microbiano en los cultivos bajo los diferentes tratamientos.

hay un flujo continuo de subproductos industriales. 2) dado que el agave es una xerofita no requiere de riego continuo y 3) al crecer en tierras semiáridas donde otros cultivos no pueden desarrollarse permite el uso de superficies no usualmente percibidas como útiles. Lo más importante, la biomasa de agave está disponible en abundancia en México, por lo tanto, el uso de bagazo procesado para aplicaciones médicas podría proporcionar un destino útil para la disposición de residuos peligrosos con un valor añadido para el cuidado del ambiente.

Futuros trabajos se centrarán en determinar la extensión de las propiedades bactericidas del Ca(OH)_2 obtenido a partir del bagazo de agave. Estas

propiedades se compararán con las del Ca(OH)_2 comercial, durante períodos más largos de tiempo, y empleando una variedad de bacterias patógenas.

REFERENCIAS

1. Reynolds, J.F. *et al.*, 2007. Global desertification: building a science for dryland development. Science (New York, N.Y.), 316, pp.847–851.
2. Ragauskas, A.J. *et al.*, 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. Science (New York, N.Y.), 311, pp.484–489.
3. Dalton, R., 2005. the Agave. Nature, 438(December), pp.1070–1071.

4. Iñiguez-Covarrubias, G., Lange, S.E. & Rowell, R.M., 2001. Utilization of byproducts from the tequila industry: Part 1: Agave bagasse as a raw material for animal feeding and fiberboard production. *Bioresource Technology*, 77, pp.25–32.
5. López-Alvarez, A. *et al.*, 2012. Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113, pp.614–618.
6. Kuttruff, J.T., 1998. 7500 Years of Prehistoric Footwear from Arnold Research Cave, Missouri. *Science*, 281, pp.72–75.
7. Robles-González, V. *et al.*, 2012. Treatment of mezcal vinasses: A review. *Journal of Biotechnology*, 157, pp.524–546.
8. Chávez-Guerrero, L., Hinojosa, M., 2010. Bagasse from the mezcal industry as an alternative renewable energy produced in arid lands. *Fuel*, 89, pp.4049–4052.
9. González-López, J.R. *et al.*, 2015. Small addition effect of agave biomass ashes in cement mortars. *Fuel Processing Technology*, 133, pp.35–42. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037838201400561X>.
10. Idarraga, G. *et al.*, 1999. Pulp and paper from blue agave waste from tequila production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, pp.4450–4455.
11. Chávez-Guerrero, L., Flores, J., Kharissov, B.I., 2010. Recycling of ash from mezcal industry: A renewable source of lime. *Chemosphere*, 81, pp.633–638.
12. Dhillon, R.S., von Wuehlisch, G., 2013. Mitigation of global warming through renewable biomass. *Biomass and Bioenergy*, 48, pp.75–89.
13. Pardo, P. *et al.*, 2014. A review on high temperature thermochemical heat energy storage. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, pp.591–610.
14. Gómez-Ortíz, N. *et al.*, 2013. Antifungal coatings based on Ca(OH)₂ mixed with ZnO/TiO₂ nanomaterials for protection of limestone monuments. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5, pp.1556–1565.
15. Figueiredo de Almeida Gomes, B.P. *et al.*, 2006. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 102, pp.544–550.
16. Zhang, S., 2014. A new nano-sized calcium hydroxide photocatalytic material for the photodegradation of organic dyes. *RSC Advances*, 4(100 mL), p.15835. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4RA00081A>.
17. Pöykiö, R. & Nurmesniemi, H., 2008. Calcium carbonate waste from an integrated pulp and paper mill as a potential liming agent. *Environmental Chemistry Letters*, 6, pp.47–51.
18. Bashan, Y. *et al.*, 2006. Primary colonization and breakdown of igneous rocks by endemic, succulent elephant trees (*Pachycormus discolor*) of the deserts in Baja California, Mexico. *Naturwissenschaften*, 93, pp.344–347.
19. Siqueira, J.F., Lopes, H.P., 1999. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: A critical review. *International Endodontic Journal*, 32, pp.361–369.