

Información Importante

La Universidad Santo Tomás, informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan **finalidad académica**, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, la Universidad Santo Tomás informa que “los derechos morales sobre documento son propiedad de los autores, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.”

**Bibliotecas Bucaramanga
Universidad Santo Tomás**

**CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA (*THEOBROMA
CACAO L*) PARA SU USO EN LA OBTENCIÓN DE ETANOL POR VÍA
FERMENTATIVA**

YENIFER JASNEIDY TORRES LEAL

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISIÓN DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2016**

**CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA (THEOBROMA
CACAO L) PARA SU USO EN LA OBTENCIÓN DE ETANOL POR VÍA
FERMENTATIVA**

YENIFER JASNEIDY TORRES LEAL

Trabajo de grado para optar el título de Química Ambiental

**Directora
OLGA LUCIA BAYONA AYALA
Químico *MS.c.***

**Codirectora
ANGÉLICA MARÍA CANDELA SOTO
Química *MS.c, PhD.***

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISIÓN DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2016**

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Bucaramanga, 10 de noviembre de 16

DEDICATORIA

“Cosas que ningún ojo ha visto, ningún oído ha escuchado y ninguna mente ha concebido es lo que Dios tiene preparado para tí”

A Dios por su infinito amor por mí, por enseñarme a siempre estar de su mano en este largo camino, la vida.

A mi madre, Noralba Leal, porque gracias a ella y por ella es todo el esfuerzo que he realizado durante mi carrera, ella es la autora principal de mi vida, porque sin su amor y su dedicación nada de mí sería lo que es.

A mis papás Floro e Alfonso, por cuidarme y por estar al tanto en todo momento de mí, uno en el cielo y otro en la tierra pero los dos en mi corazón.

A mi hermanos, Alexis, Sebas y Leidy porque son quienes me dan la inspiración para ser mejor por ellos, por su amor y cariño.

A mis segundos padres, mis abuelos, María y Aquilino. Son mis amores eternos, quienes con cada consejo, con cada sonrisa, derriten mi corazón más hacia ellos.

A Brenda Forero y Jefferson Guevara, mis amigos del alma, que han estado presente en cada paso, en cada risa y en cada lágrima. Con su amor y cariño me han enseñado a fortalecer mi corazón.

A Gersy por estar desde el inicio hasta el final con su amor y alegría, por ser mi mejor amigo incondicional quien sabe cómo mejorar cada situación.

A Diana, Laura, Vanessa y Cristian, mis amigos, gracias por su amistad, por su cariño y por cada enseñanza que me han brindado.

Yenifer J. Torres

AGRADECIMIENTOS

La autora del presente trabajo desea realizar los siguientes agradecimientos:

A mi directora y codirectora, Olga Lucia Bayona y Angélica Candela, quienes me acompañaron durante el inicio de este proyecto hasta el final, brindando su entrega completa y más que un asesoramiento, una amistad.

Al Grupo de Investigación en Nuevos Materiales y Energías Alternativas, GINMEA, por permitir la utilización de sus recursos y así mismo acompañarme durante la realización de este proyecto.

A la Universidad Santo Tomás seccional Bucaramanga por brindarme conocimientos durante toda mi carrera y por permitirme trabajar en sus laboratorios que permitieron el desarrollo de este proyecto, brindando las instalaciones adecuadas y un total acompañamiento del cuerpo docente.

A los auxiliares, Edwin y Andrés Murcia por su completa dedicación en el laboratorio, por su paciencia y alegría.

A la Universidad Industrial de Santander por permitir la realización de varios análisis en sus laboratorios.

A la finca la Esmeralda por su colaboración y aporte en la recolección de la materia prima utilizada.

A mis amigas y compañeras de laboratorio, Carolina y Stefany, quienes estuvieron durante todo el proceso brindando su amistad y compañerismo.

CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN	14
CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA (THEOBROMA CACAO L) PARA SU USO EN LA OBTENCIÓN DE ETANOL POR VÍA FERMENTATIVA	15
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
2. JUSTIFICACIÓN.....	16
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 OBJETIVO GENERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4. MARCO DE REFERENCIA.....	18
4.1 ETANOL DE PRIMERA GENERACIÓN.....	18
4.2 ETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN	18
4.3 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA	19
4.3.1 Celulosa.....	19
4.3.2 Hemicelulosa.	20
4.3.3 Lignina.	21
4.4 CULTIVO DE CACAO	22
4.5 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS	23
4.5.2 Técnicas Instrumentales.	24
4.6 ANTECEDENTES	24
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	30
5.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	31
5.1.1 Reducción del tamaño.	31
5.1.2 Secado.....	32
5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA CÁSCARA DE CACAO	32
5.2.1 Disminución del tamaño.....	32
5.2.2 Clasificación por tamaño.....	32
5.2.3 Humedad.	33
5.2.4 Densidad Real.	34
5.2.5 Densidad Aparente.	35

5.2.6 Carbono Fijo.	35
5.2.7 Cenizas.	35
5.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA CÁSCARA DE CACAO	36
5.3.1 Contenido de extractivos.	36
5.3.2 Lignina insoluble.	37
5.3.3 Determinación de lignina soluble	37
5.4 ANÁLISIS QUÍMICO	38
5.4.1 Cuantificación de Azúcares Reductores	38
5.4.2 Análisis de materiales lignocelulósicos difracción de rayos x (DRX).	40
5.4.3 Análisis de espectroscopia infrarroja por transformación de Fourier (FTIR).	40
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
6.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.	41
6.2 CARACTERIZACIÓN DE LA CÁSCARA DE CACAO	41
6.2.1 Clasificación por tamaño.	41
6.2.2 Humedad.	42
6.2.3 Densidad Real.	42
6.2.4 Densidad Aparente.	43
6.2.5 Carbono Fijo	43
6.2.6 Cenizas.	44
6.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA CÁSCARA DE CACAO	44
6.3.1 Contenido de Extractivos.	44
6.3.2 Lignina Total	45
6.4 ANÁLISIS QUÍMICO	45
6.4.1 Cuantificación de Azúcares Reductores	45
6.4.2 Difracción de Rayos X (DRX)	47
6.4.3 Espectroscopia infrarroja por transformación de Fourier (FTIR)	48
6.5 POTENCIAL EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL	49
7. CONCLUSIONES	49
8. RECOMENDACIONES	51
9. BIBLIOGRAFÍA	52

LISTA DE CUADROS

Pág.

Cuadro 1. Valores medidos de la caracterización física y química de ocho materiales lignocelulósicos. ²⁸	26
Cuadro 2. Valores medidos de la caracterización física y química de pinus patula y eucalyptus camaldulensis. ²⁹	27
Cuadro 3. Composición química de tres partes de residuos lignocelulósicos (paja, copas y bagazo) ³⁰	28
Cuadro 4. Resultados tamizado de la muestra	41
Cuadro 5. Densidad real de la cáscara de cacao.....	43
Cuadro 6. Densidad aparente de la cáscara de cacao	43
Cuadro 7. Carbono fijo presente en la cáscara de cacao	43
Cuadro 8. Cenizas del material.....	44
Cuadro 9. Porcentaje de extractivos	44
Cuadro 10. Porcentaje de lignina obtenido de la cáscara de cacao.....	45
Cuadro 11. Tiempos de retención de los monosacáridos	46
Cuadro 12. Porcentaje de celulosa y hemicelulosa obtenido de la cáscara de cacao	46
Cuadro 13. Índice de cristalinidad de la cáscara de cacao	47
Cuadro 14. Potencial energético de la biomasa.....	49

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Principales biopolímeros de la biomasa ⁹	19
Figura 2. Estructura molecular de la celulosa ¹³	20
Figura 3. Principales componentes estructurales de la hemicelulosa.	21
Figura 4. Principales precursores de lignina.	21
Figura 5. Diagrama de procedimiento	30
Figura 6. Recolección de la muestra finca la esmeralda, san vicente del chucurí sin reducción de tamaño.	31
Figura 7. Disminución manual de tamaño.	31
Figura 8. horno de calor recirculante para retirar humedad de la muestra.	32
Figura 9. Reducción de tamaño de la muestra.	32
Figura 10. Clasificación del material.	33
Figura 11. Determinación de la humedad, metodología nrel	33
Figura 12. Determinación de la densidad real	34
Figura 13. Determinación de la densidad aparente.	35
Figura 14. Determinación del contenido en cenizas	35
Figura 15. Determinación del contenido de extractivos	36
Figura 16. Determinación del contenido de la lignina insoluble	37
Figura 17. Determinación de lignina soluble	38
Figura 18. Determinación del contenido de azúcares reductores	39
Figura 19. Potencial en la producción de etanol	49

LISTA DE GRÁFICAS

Pág.

Gráfica 1. Distribución departamental de la producción de cacao en Colombia ⁸	22
Gráfica 2. Curva granulométrica.....	41
Gráfica 3. Curva de secado de la cáscara de cacao	42
Gráfica 4. Curvas obtenidas en la cuantificación de los monosacáridos	45
Gráfica 5. Difractograma de la cáscara de cacao.....	47
Gráfica 6. Espectro FTIR de la cáscara de cacao	48

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

COP21: Paris Climate Conference

DRX: Difracción de Rayos X

FTIR: Espectroscopia Infrarroja por Transformación de Fourier

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Presión

MEB: Microscopía Electrónica de Barrido

NREL: *National Renewable Energy Laboratory*

CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA (*THEOBROMA CACAO L*) PARA SU USO EN LA OBTENCIÓN DE ETANOL POR VÍA FERMENTATIVA

Yenifer Jasneidy Torres Leal

RESUMEN

La Conferencia del Clima de Paris, COP21 realizada en el año 2015, estableció como objetivo principal reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, planificando economías más eficientes y menos dependiente de los combustibles fósiles, para lograr limitar el aumento de la temperatura global en 2°C. En el desarrollo de diferentes investigaciones, el bioetanol y el biodiesel se presentan como una buena opción ya que cumplen los requisitos al reducir la producción de gases contaminantes lo que los perfila como biocombustibles prometedores para la sociedad.

Actualmente Estados Unidos y Brasil son los mayores productores de bioetanol y biodiesel en el mundo. Una fuente de energía alternativa renovable es la biomasa lignocelulósica, la cual está constituida por todos aquellos residuos forestales, agrícolas, maderas, entre otros, que se caracterizan por ser abundantes y algunos de estos presentar problemas ambientales en su disposición final. Santander presenta un buen potencial biomásico especialmente en la cosecha de cacao, ya que este departamento es donde se presenta la mayor producción de Cacao, aproximadamente 53.929 hectáreas cultivadas.

El trabajo experimental de esta investigación consistió en recolectar la cáscara de cacao proveniente de los desechos de las plantaciones y caracterizarla fisicoquímicamente para establecer su potencial al ser usado este como materia prima en la producción de bioetanol (conocido este etano como de segunda generación) ya que esta no presenta un valor comercial pero si presenta problemas ambientales asociados a su disposición. Se utilizaron diferentes técnicas de laboratorio como la técnica de HPLC para cuantificar los azúcares reductores (glucosa, Xilosa) y calcular el contenido de celulosa y hemicelulosa, se utilizó espectroscopia de UV-VIS para la cuantificación de la lignina soluble y se determinó por gravimetría el contenido de lignina insoluble; se utilizó la técnica de DRX para determinar el índice de cristalinidad de la celulosa contenida en la cascara de cacao y finalmente se calculó teóricamente el rendimiento en producción de etanol a partir de la cáscara de cacao.

Palabras claves: bioetanol segunda generación, biomasa lignocelulósica, cacao.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el mundo ha logrado establecer acuerdos globales que buscan realizar acciones en la disminución de los efectos del cambio climático, la reducción de emisiones hacia la atmósfera, la protección de los bosques, y demás. En el último acuerdo global, más de 190 países se reunieron en Francia en el año 2015 con el fin de mitigar el aumento del calentamiento global causado por los gases de efecto invernadero, asociados principalmente a la quema de combustibles fósiles derivados del petróleo utilizados en el transporte, la industria y la producción de energía.¹

Actualmente los biocombustibles como el bioetanol y biodiesel son los más producidos a escala mundial, estos son obtenidos de cultivos que también son utilizados como fuente de alimento para las poblaciones, entre estos se destacan el maíz, la caña de azúcar, la remolacha, y el trigo, los cuales entran a competir entre la producción de energía o alimento, generando como consecuencia un desequilibrio socioeconómico no satisfactorio en la producción de los alimentos. De todos los biocombustibles, el etanol es el que se produce hoy en día a una escala razonable, aproximadamente de 14 a 26 Megatoneladas en el mundo. El etanol es fácilmente adaptable a los motores de combustión interna, así como también la mezcla con gasolina ya es posible, utilizándose comúnmente 10% etanol y 90% gasolina. Estos porcentajes de mezcla pueden variar dependiendo del tipo de motor.²

Como consecuencia de esta situación, en la última década se han realizado diferentes estudios para la obtención de biocombustibles a partir de residuos denominados biomasa lignocelulósica que se genera en los campos, para así de esta manera no atender contra la seguridad alimentaria ni el ambiente.³ Ésta es una opción promisoriosa ya que no supone riesgos sino al contrario ayuda a minimizar la disposición final de gran cantidad de residuos generados de la actividad en el campo y que con el paso del tiempo podrían generar contaminación en los suelos.

Uno de los residuos que podría ser aprovechado en Colombia es la cáscara de cacao, ya que Santander es uno de los mayores productores de la industria cacaotera, en la cual solo es aprovechada la semilla que representa el 10% del peso del fruto, siendo la cáscara el 90% restante y cuya disposición final se da en los mismos cultivos incentivando la proliferación de plagas, aparición de olores y de focos infecciosos.⁴

CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA (THEOBROMA CACAO L) PARA SU USO EN LA OBTENCIÓN DE ETANOL POR VÍA FERMENTATIVA

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, más del 80% de consumo mundial de energía en el mundo se deriva de los combustibles fósiles, como el petróleo, el gas natural y el carbón.⁵ La *National Academy of Science* en el año 2009 declaró que el consumo mundial de energía se encuentra en constante aumento, especialmente en regiones desarrolladas como China y Estados Unidos. Así mismo informó que ha aumentado en un 16% la dependencia a los combustibles fósiles y manifestó que la disponibilidad de los recursos fósiles es incierta debido a sus limitaciones como también a los problemas socioeconómicos y políticos.⁶

En el interés mundial por disminuir la dependencia a los combustibles fósiles mediante el uso de fuentes renovables, aparece la biomasa, como materia prima para la obtención de combustibles ambientalmente amigables, siendo esta el componente principal de la biosfera como una materia prima única renovable, es aquí donde surge el etanol de segunda generación o el etanol lignocelulósico, que es obtenido mediante la hidrólisis de polisacáridos que se encuentran presentes en la pared celular de la biomasa. Estos polisacáridos son renovados de forma continua por la naturaleza a través de la biotransformación de la energía solar y el CO₂ mediante la fotosíntesis.⁷

En Colombia uno de los principales productores de biomasa lignocelulósica es Santander, departamento con mayor producción de cacao donde solo es aprovechado el fruto generando un 90% de residuos de cáscara de cacao. Generalmente estos residuos generados en el sector agrícola no presentan un tratamiento adecuado provocando así olores fétidos, problemas ambientales y enfermedades a los cultivos y contaminación en los suelos.⁴

Ante esta problemática se planteó el siguiente trabajo de investigación en el cual se realizó una caracterización de la cáscara de cacao, para determinar si es posible aprovecharla con el fin de obtener etanol de segunda generación calculando la cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina, para así brindar una solución en cuanto a la disposición final de la cáscara de cacao, y contribuir a la disminución de la dependencia de los combustibles fósiles.

2. JUSTIFICACIÓN

La principal materia prima utilizada en la industria chocolatera es el cacao, además de ello es usada en la confitería, productos farmacéuticos y en la elaboración de cosméticos. En Colombia son reportadas 143.645 hectáreas sembradas de cacao, siendo Santander el mayor productor con 53.929 hectáreas; cuyos principales productos son en los municipios de: Bucaramanga (42,73%), San Vicente de Chucurí (29,03%), Landázuri (15,29%), El Carmen (5,92%), Rionegro (4,53%) y Lebrija (1,46%).

Por este motivo, se propone como alternativa para aprovechar la biomasa generada en el sector agrícola del cacao para la producción de etanol de segunda generación, dándole un valor agregado y mitigando los efectos negativos en el medio ambiente.⁸ El etanol de segunda generación es el biocombustible obtenido a partir de fuentes renovables como hierbas, maderas blandas y maderas duras, que se encuentran compuestas químicamente en proporciones variables por dos biopolímeros: celulosa, hemicelulosa y una macromolécula de lignina, además de una pequeña parte de extractivos y cenizas.⁹ Este bioetanol tiene ciertas ventajas ambientales ya que tiene una quema más limpia que el petróleo, genera mínimos impactos ambientales, es sostenible, biodegradable y produce residuos secundarios en menor proporción.¹⁰

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar fisicoquímicamente los residuos lignocelulósicos provenientes de la cosecha de cacao (cáscara del cacao, *Theobroma cacao L*), con el fin de determinar su uso como precursor en la obtención de etanol de segunda generación por vía fermentativa, mediante técnicas de laboratorio como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), difracción de rayos X (DRX), infrarrojo (IR) y la espectroscopia del ultravioleta visibles (UV-VIS).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar la composición física de la cáscara de cacao (densidad aparente y real, humedad), su contenido de carbono fijo y cenizas para lograr calcular el contenido energético de la biomasa lignocelulósica.

3.2.2 Estudiar la influencia del tamaño de partícula en la morfología de la celulosa, hemicelulosa y lignina.

3.2.3 Calcular el porcentaje de lignina soluble e insoluble en la cáscara de cacao mediante hidrólisis ácida fuerte y detección por espectroscopia de UV-Vis.

3.2.4 Cuantificar mediante HPLC los azúcares reductores: glucosa, xilosa, arabinosa y celobiosa para calcular el porcentaje de celulosa y hemicelulosa presentes en la cáscara de cacao.

3.2.5 Calcular teóricamente el rendimiento en producción de etanol a partir de la cáscara de cacao y comparar su potencial con el de otras biomásas reportadas en la literatura para la producción de etanol de segunda generación.

4. MARCO DE REFERENCIA

En la revolución industrial se llevó a cabo el desarrollo del motor de combustión usado para el transporte y la generación de energía desde las centrales térmicas de carbón, ocasionando consigo la dependencia de los recursos fósiles no renovables. Día a día la modernización, el desarrollo económico de cada país y la sobrepoblación que ampara al mundo ha llevado que se genere gran consumo energético y por ende un desmedido uso de los recursos fósiles.¹⁰

La problemática del cambio climático, el agotamiento de los combustibles fósiles y la contaminación que éstos generan, así mismo como la alza y baja del petróleo han llevado a que las diferentes naciones busquen la forma de mitigar los efectos ocasionados, como por ejemplo buscar la producción de nuevas fuentes de energía renovables que sean amigables con el medio ambiente. Es allí donde aparecen los biocombustibles, que son obtenidos de la biomasa vegetal; éstos contienen características similares a la de los combustibles fósiles, lo que permite su utilización en motores sin tener que efectuar modificaciones significativas. El biocombustible mayormente usado es el bioetanol, que se divide en primera o segunda generación dependiendo de la materia prima usada para su producción.

4.1 ETANOL DE PRIMERA GENERACIÓN

En la producción de etanol de primera generación son utilizados los granos de cereales o los cultivos de azúcar como material principal de partida. Actualmente Brasil y Estados Unidos son los principales países en la producción de etanol a partir de estos cultivos de biomasa. El microorganismo base en la producción de etanol de primera generación es la *Saccharomyces cerevisiae*, donde en un proceso de fermentación aproximadamente del 8 al 14% (v/v) de etanol es producido y la glucosa para el rendimiento del bioetanol es más del 90% del rendimiento teórico.⁵ El uso de materia prima en la obtención de etanol de primera generación ocasionó un alza en los precios de alimentos de la canasta familiar debido al uso de éstos mismos para la producción del etanol; es por ello que hoy en día se realizan investigaciones de materias primas que no sean usadas como alimento a la sociedad, para que de esa manera no se genere una competencia entre biocombustible-alimento.

4.2 ETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

En la obtención de etanol de segunda generación no se utilizan fuentes comestibles como ocurre en el etanol de primera generación. Con éste, se utilizan tanto las materias primas como las partes de ellas con el propósito de obtener una alta gama de material a utilizar.¹¹ Un ejemplo es el etanol obtenido a partir de la biomasa lignocelulósica (fuentes no comestibles). Las materias primas usadas para la

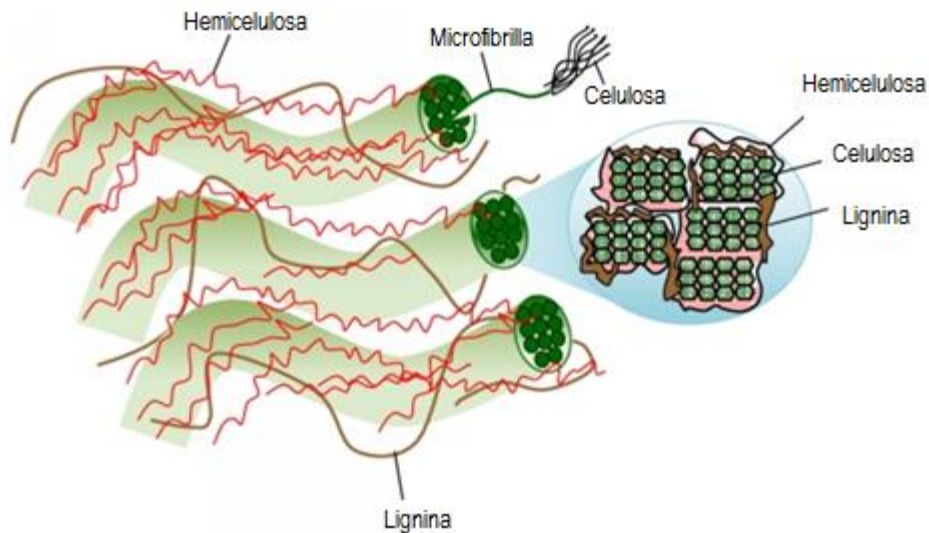
obtención del etanol de segunda generación son residuos agrícolas tales como la paja, el rastrojo, residuos de los cultivos, hierbas y madera. Éstas, pueden ser convertidas en biocombustible mediante rutas bioquímicas en las que se utilizan enzimas o microorganismos.

4.3 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

La biomasa es la expresión genérica para los materiales de hidrocarburo orgánicos, como lo son el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre, aunque generalmente el azufre y el nitrógeno se encuentran en cantidades significativas. La biomasa lignocelulósica es la parte no comestible de los principales cultivos alimentarios, siendo hoy en día el principal atractivo para la generación de energía alternativa ya que representa bajo costo y abundante suministro.¹²

Los compuestos más importantes de la biomasa son: la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. Estos biopolímeros se encargan de dar resistencia al ataque físico, químico y biológico del material de biomasa. Los materiales lignocelulósicos son clasificados de acuerdo a la función de proporción de celulosa y lignina. Por ejemplo, la madera dura se encuentra compuesta de celulosa unida a bajas concentraciones de lignina; la madera blanda es lo opuesto. En la figura 1 se observan los principales componentes de la biomasa.⁹

Figura 1. Principales biopolímeros de la biomasa⁹

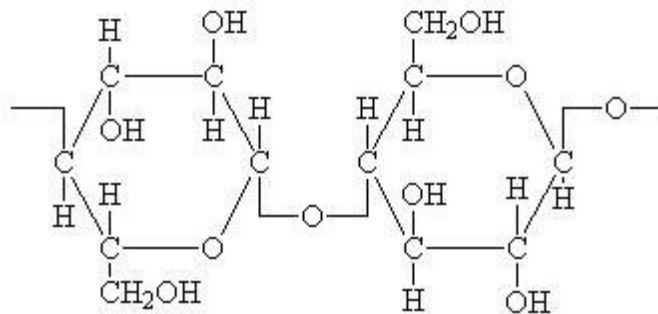


4.3.1 Celulosa.

La celulosa es la biomolécula más abundante en el planeta, es el principal polímero estructural que se encuentra en la pared celular vegetal; normalmente existe como fibras largas en forma de hilo formando una red dinámica con la hemicelulosa que se encuentra incrustada.⁵ Se compone de enlaces covalentes β (1 \rightarrow 4) vinculada a

cadenas de glucano organizadas por microfibrillas paracristalinas con un diámetro de aproximadamente 2,5 nm que varía dependiendo de su origen y de su posición dentro de la pared celular. La celulosa es insoluble en agua y presenta regiones con un alto ordenamiento y otras de ordenamiento bajo. En la Figura 2 se presenta la estructura molecular de la celulosa.¹³

Figura 2. Estructura molecular de la celulosa¹³



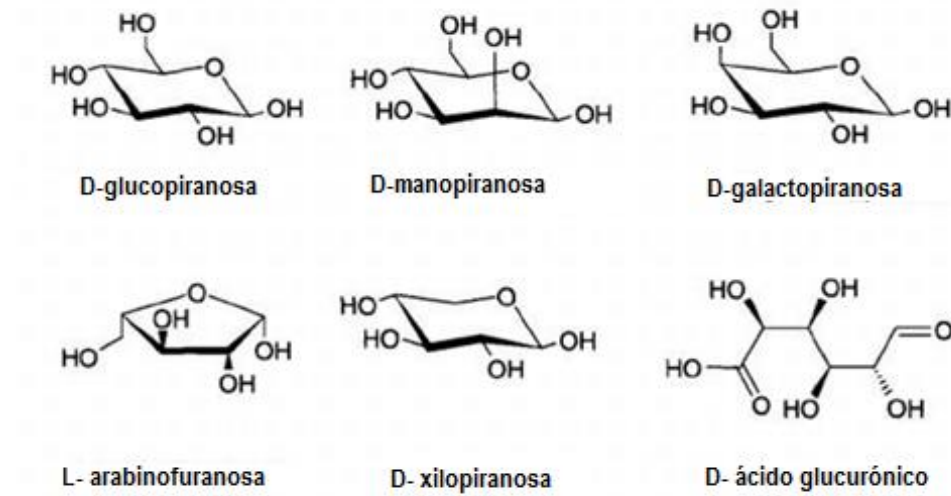
La celulosa es estructuralmente heterogénea y tiende a formar enlaces intra e intermoleculares por medio de sus puentes de hidrógeno, concediendo regiones cristalinas amorfas altamente ordenadas. Las regiones de alta cristalinidad son difíciles de penetrar por disolventes y reactivos; las regiones amorfas (de bajo ordenamiento) son más accesibles a todas las reacciones químicas y éstas se encargan de favorecer el alargamiento, hinchamiento y flexibilidad de la fibra. La celulosa se encarga de actuar como constituyente de la pared celular de las plantas; en las materias primas como el algodón se encuentra en un 94% aproximadamente y en la madera, se encuentra en un poco más del 50%.^{14,15} La celulosa se encuentra enlazada a partir de la glucosa que se produce en la célula vegetal por medio de la fotosíntesis.

4.3.2 Hemicelulosa.

Las hemicelulosas son heteropolisacáridos compuestos también de otros monómeros de azúcar de la glucosa que pueden ser fácilmente obtenidos por medio de hidrólisis ácida. Se encuentran constituidas de una variedad de monómeros de hidratos de carbono, que incluyen a la furanosa correspondiente a cinco miembros, como también estructuras de anillo de piranosa de seis miembros. Algunas hemicelulosas se encuentran asociadas a la porción de celulosa y otras lo están a la lignina. Las hemicelulosas se encargan de dar soporte a las microfibrillas de la celulosa en la pared celular, son más accesibles, degradables y más fáciles de disolver que la celulosa.

Los monómeros estructurales se presentan en la Figura 3. Los más comunes son las pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa y galactosa) y ácidos urónicos.¹⁶

Figura 3. Principales componentes estructurales de la hemicelulosa.

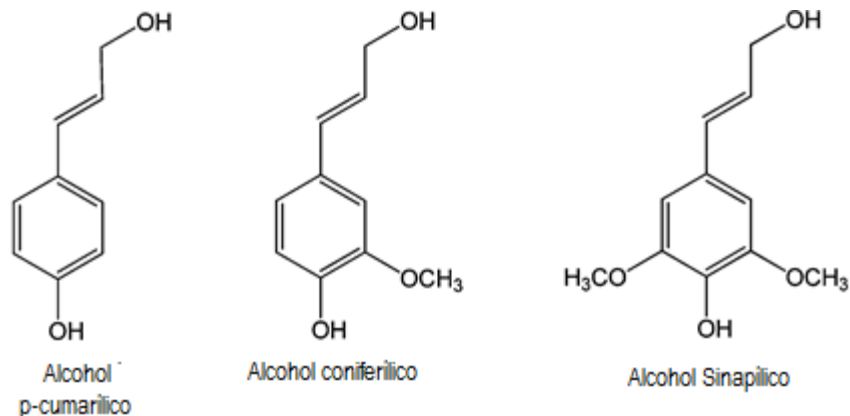


4.3.3 Lignina.

El nombre general dado al grupo de polímeros de alcoholes aromáticos es la lignina. Es un polímero fenólico ramificado y amorfo que se encarga principalmente en dar una fuerza a la estructura de la pared proporcionando características favorables de madera a las células de las fibras de los tejidos leñosos.¹⁷

La lignina es un polímero hidrófobo que consiste principalmente en tres compuestos precursores de partida: p-coumaril, coniferilico y el alcohol sinapílico. Estos se basan en un anillo de benceno aromático con una cadena alifática de tres carbonos unidos. A partir de estos tres, los bloques de construcción fundamentales de la lignina se empiezan a derivar, tales como: p-hidroxifenil (H), guayacil (G), y siringil (S), unidades fenilpropanoides.¹⁸ En la Figura 4 se presentan los principales precursores de la lignina.

Figura 4. Principales precursores de lignina.¹⁷

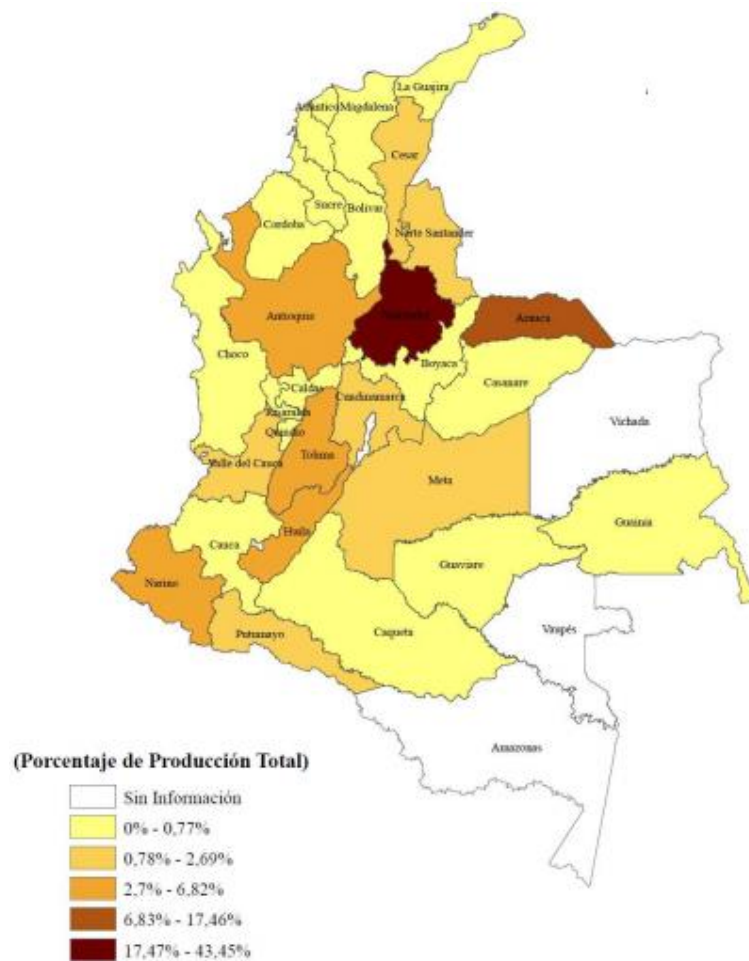


La composición de la lignina puede variar dependiendo de las características de cada material, así mismo como su método de extracción. Los materiales lignocelulósicos con bajo contenido de lignina están compuestos principalmente por unidades de alcohol coniferílico y pequeñas cantidades de alcohol sinapílico y trazas de alcohol p-cumarílico. Los materiales con alto porción de lignina tienen igual cantidades de unidades p-cumarílico y sinapílico.¹⁹

4.4 CULTIVO DE CACAO

El cultivo del cacao en Colombia se encuentra ampliamente distribuido por regiones concentrándose su producción en unas regiones más que otras. En la Gráfica 1 se presenta una distribución de la producción del cacao en los principales departamentos de Colombia.

Gráfica 1. Distribución departamental de la producción de la producción de cacao en Colombia⁸



Según la Gráfica 1, la mayor producción de cacao se da en el departamento de Santander con un 46,2%. En seguida se encuentran en importancia de producción Huila, Arauca, Antioquia, Tolima, Norte de Santander, Nariño, Cundinamarca y otros departamentos, que en su totalidad entre estos representan el 45,4% de la producción cacaotera.⁸ Eso permite concluir que en Santander se produce la mayor cantidad de cacao y por ende demuestra que es allí donde se genera el mayor potencial biomásico; también se observa que en Colombia, en su mayoría, se da la producción de cacao concentrándose su producción en unos departamentos más que en otros.

El cultivo del cacao se caracteriza por ser de bajo costo debido a la poca utilización de tecnologías o maquinaria, generalmente sus etapas de cultivo se realizan de forma manual pero sin embargo se presentan impactos ambientales. Comúnmente se reconocen cuatro tipos de residuos en la actividad agrícola: residuos de plaguicidas, residuos de fertilizantes, residuos de biomasas y residuos inertes.

En el cultivo del cacao, entre los residuos de biomasa se encuentra la cáscara de cacao. Ésta es de composición orgánica y renovable, constituida en su mayoría por agua, celulosa y lignina, generando grandes cantidades de residuos ocupando una alta dispersión espacial. La cáscara de cacao tiene un proceso de biodegradación lento, desequilibrando su ciclo natural generando problemas sanitarios, paisajísticos y además un despilfarro de recursos potenciales.²⁰ La cáscara de cacao es constituida como un foco de contaminación de hongos y desarrollo de insectos transmisores de enfermedad de peligro para el ser humano es por ello que es importante implementar un manejo adecuado.

Generalmente el cultivo del cacao es atacado por diferentes enfermedades pero dos más importantes son la mazorca negra y la moniliasis. La mazorca negra es causada por el hongo *Phytophthora spp.* quien se encarga no solo de atacar a la cáscara del cacao sino también de causar cáncer en el tronco, necrosis en las hojas, podredumbre en los botones florales, entre otros daños. La moniliasis es causada por el hongo *Moniliphthora roleri Cif & Par.* es generalmente conocida como la enfermedad de la ceniza o de Quevedo y se encuentra ampliamente distribuida en Suramérica; esta enfermedad se encarga de atacar solo a los frutos del cacao.²¹

Es por ello que actualmente para llevar un control del desarrollo de estas enfermedades es necesario realizar prácticas culturales como la eliminación de las cáscaras enfermas así como también la eliminación de las cáscaras a la sombra.

4.5 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS

4.5.1 NREL.

Existen numerosos métodos para caracterizar biomasa lignocelulósica; durante el desarrollo de este proyecto investigativo para lograr la caracterización de la cáscara

de cacao, se empleó los diversos procedimientos de análisis sugeridos por la *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) del Departamento de Energía de Estados Unidos. Los procedimientos incluyen todo el paso a paso a seguir desde la preparación de la muestra hasta los protocolos experimentales correspondientes para la sacarificación enzimática de biomasa lignocelulósica.²²

4.5.2 Técnicas Instrumentales.

4.5.2.1 Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

Es una técnica que permite analizar y separar la mezcla de cualquier clase de compuestos, independiente de su polaridad, estabilidad térmica o volatidad. En esta técnica es usada una presión elevada o la gravedad para forzar el paso de la fase móvil a través de una columna que contiene partículas de pequeño tamaño. Se fundamenta en una fase estacionaria no polar y una fase móvil. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil, los componentes de la solución se desplazan de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Esta interacción química es la que se encarga de determinar la separación de la muestra.²³

4.5.2.2 Difracción de Rayos X.

Los rayos X son ondas electromagnéticas que tienen gran energía, por tanto de alta frecuencia y con una corta longitud de onda sin masa ni carga que salen de la región de electrones de un átomo, como consecuencia de los registros subsecuente a la creación de las orbitas vacantes. Por medio de la difracción de rayos X es posible identificar las sustancias cristalinas y lograr determinar su estructura, la distribución de los átomos, la orientación y el tamaño de grano. En el campo de la cristalografía casi todos los descubrimientos han obtenidos o verificados por medio de los rayos X.²⁴

4.5.2.3 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier.

Es considerado como un método de investigación de primera opción para la identificación de materiales orgánicos, incluyendo la identificación de recubrimientos. Esto se debe a la absorción de la radiación infrarroja en el espectro IR en el cual se especifica a las características de la estructura química de las sustancias orgánicas. La FTIR puede proporcionar información fundamental sobre la estructura molecular de los componentes tanto orgánicos como inorgánicos. Esta técnica a utilizar que nos determinará los cambios estructurales en la biomasa lignocelulósica.²⁶

4.6 ANTECEDENTES

El uso de la biomasa lignocelulósica en la producción de etanol de segunda generación se ha desarrollado como una amplia investigación a nivel mundial. A continuación se presentan algunos de esos estudios.

En Brasil, en el año 2009, la Universidad Federal de Pernambuco realizó una validación de la metodología en la caracterización química del bagazo de caña de

azúcar en dos laboratorios, A y B, siguiendo las mismas condiciones. Se utilizó una muestra de bagazo de caña de azúcar previamente tratado a través de explosión a vapor. Este tratamiento se realiza sobre la organización estructural de la celulosa, aumentando considerablemente su área superficial y por consiguiente su susceptibilidad para la hidrólisis ácida o enzimática. El pre tratamiento del bagazo, con una humedad de aproximadamente el 50%, fue realizado en un reactor de 5000 L a una presión de 15,3 kgf/cm².

El bagazo fue molido y fue sometido a una hidrólisis con ácido sulfúrico al 72% v/v bajo agitación vigorosa en un baño termostático a 45°C durante 7 minutos. La solución obtenida durante esta hidrólisis se almacenó para realizar posteriores pruebas como carbohidratos, ácidos orgánicos, HMF y lignina soluble. También se determinó la lignina insoluble en la fracción sólida a través por el método de Klasson modificado por Rocha *et al.* El porcentaje de lignina fue calculado con relación a la masa de la muestra seca; la lignina soluble se determinó con la fracción líquida y la cantidad fue calculada por la medida de absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro.

Se realizó la determinación de carbohidratos y ácidos orgánicos por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia, furfural y hidroximetilfurfural en la fracción líquida. Las curvas de calibración de los carbohidratos, fueron inyectadas en el cromatógrafo de líquidos soluciones que contenían celobiosa, glucosa, xilosa y arabinosa. Las curvas de calibración de los ácidos orgánicos fueron realizadas a través de la inyección de soluciones con contenido de ácido acético y ácido fórmico. Las condiciones del laboratorio A y el laboratorio B cambiaron en cuanto al uso de la columna, las demás condiciones permanecieron iguales.

La validación del método de caracterización fue obtenida determinando cuatro parámetros: linealidad, repetibilidad, reproducibilidad y la precisión, que se determinaron utilizando Microsoft Office Excel y Microcal Origin 6.0. En cuanto a la linealidad el estudio reveló que ambos laboratorios tenían la adecuada con un coeficiente de correlación mayor que 0,995. En la repetibilidad, los resultados obtenidos en ambos laboratorios señalan que fue óptima obteniendo un coeficiente de variación por debajo del 20%. La reproducibilidad se refiere a la exactitud interlaboratorial, entre la celulosa, hemicelulosa y lignina cambiaron los valores entre los laboratorios pero en proporciones pequeñas. La precisión expresa la concordancia entre el valor encontrado y el valor verdadero o como referencia. Encontraron que el contenido de celulosa (48,65%) y lignina (34,29%) son algo más altos que los encontrados para el bagazo no pretratado (42,8 y 22,1%, respectivamente), mientras que el contenido de hemicelulosa es menor (8,28%) a la del bagazo natural (25,8%), debido a que el material se somete a un tratamiento previo con vapor de agua, lo que elimina gran parte de la hemicelulosa.²⁷

En Arabia Saudita en el año 2010, se realizó una caracterización física y química de ocho materiales lignocelulósicos de los cuales seis eran de recursos naturales: palmera datilera (*Phoenix dactylifera L.*), botoncillo (*Conocarpus erectus L.*), leucaena (*Leucaena leucocephala (Lam) de wit*), jobjoba (*Simmondsia chinensis*

(Link) C.K. Schneid), neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y la moringa (*Moringa peregrina* Forssk). De éstos se estudió la longitud de la fibra, la gravedad específica y la composición química: extractos totales, lignina, hemicelulosa y contenido de cenizas. Las propiedades examinadas de los materiales variaron significativamente. Para cada uno de análisis realizados se usaron diferentes métodos; en la medición de la longitud de onda usaron el método de Franklin y Megahed (1998) donde realizaban una maceración, usaban peróxido de hidrógeno y ácido acético glacial. El contenido total de sustancias extractivas se determinaron de acuerdo a la metodología de *American Society for Testing and Materials*; la lignina fue determinada de acuerdo a la *American Society for Testing and Materials* usando H₂SO₄ al 72%; la hemicelulosa fue determinada siguiendo lo escrito por Wise (1946) y finalmente las cenizas fueron encendidas a 600 °C hasta que todo el carbono fue eliminado.

Cuadro 1. Valores medidos de la caracterización física y química de ocho materiales lignocelulósicos.²⁸

Material Lignocelulósico	Longitud de fibra	Peso específico	Extractivos totales	Lignina	Hemi-celulosa	Cenizas
Fibras de la superficie	0.84	0.369	16.44	31.30	40.31	11.82
Hojuela	1.31	0.480	37.06	36.44	16.32	10.8
Raquis	1.19	0.398	26.81	14.28	48.34	12.27
Conocorpus erectus	0.93	0.645	12.93	28.83	57.68	0.91
Leucaena leucocephala	1.13	0.597	9.74	18.86	70.82	1.22
Simmondsia chinensis	0.50	0.638	15.08	28.18	53.11	2.31
Azadirachta indica	1.04	0.618	10.23	27.94	59.91	1.47
Moringa perigrina	0.68	0.430	8.52	28.26	59.64	2.73

Según el Cuadro 1 se observa que el *Phoenix dactylifera* tenía las fibras más largas (1.31mm), seguido del raquis de *Phoenix dactylifera* (1,19 mm), *Leucaena leucocephala* (1.13mm) y *Azadirachta indica* (1.04mm). Por otro lado, *Simmondsia chinensis* fue el más corto (0,5 mm). En el peso específico se notó que varió significativamente por efecto de los recursos naturales. Los valores superiores fueron de los árboles maderables examinados excepto el de la *Moringa peregrina* (0.43) que ocupaban un nivel relativamente moderado. Los materiales lignocelulósicos de la palmera datilera representaron los valores de menor peso.

Los extractivos totales variaron de uno a otro; la palmera datilera fue la más alta (37,06%), seguido de raquis (26,81%), fibras de la superficie (16,44%) y madera *chinensis Simmondsia* (15,01%). Los árboles maderables poseían contenidos de extractivos totales más bajos, el valor más bajo fue para la Moringa. Con respecto a la lignina, la *Phoenix dactylifera leaflet* y las fibras de la superficie de la palmera datilera tenían mayor contenido de lignina (36,44% y 31,3% respectivamente); el valor más bajo de lignina lo tuvo el raquis con un valor de 14,28%. Los resultados revelaron que los valores de hemicelulosa eran significativamente diferentes en los materiales lignocelulósicos. *Leucaena leucocephala* era el material con mayor contenido de hemicelulosa, mientras que *Phoenix dactylifera leaflet* presentaba el menor contenido. Finalmente en el contenido de cenizas, los tres recursos de palmera datilera (fibras de la superficie, hojuelas y el raquis) eran quienes presentaban el mayor contenido de cenizas.²⁸

En Colombia en el año 2013, se realizó un estudio de dos especies de madera, *Pinus patula* y *Eucalyptus camaldulensis*, que fueron caracterizadas de acuerdo a los protocolos del Laboratorio Nacional de Energías Renovables de Estados Unidos; se determinó el contenido de cenizas, extraíbles, carbohidratos estructurales y lignina. Las astillas de las maderas fueron pretratadas mediante explosión con vapor, deslignificación alcalina, remojo con amoníaco, ozonólisis, hidrólisis con ácido diluido y extracción con solvente orgánico para acondicionar el material crudo en la etapa de hidrólisis enzimática. Inicialmente el material fue molido para lograr la reducción del tamaño y reducir la cristalinidad de la celulosa.

Cuadro 2. Valores medidos de la caracterización física y química de *Pinus patula* y *Eucalyptus camaldulensis*.²⁹

Materia Prima	Eucalyptus camaldulensis	Pinus patula
Celulosa	45,03	36,64
Hemicelulosa	17,9	24,97
Lignina	29,45	28,53
Cenizas	1,11	0,28
Extraíbles	1,93	1,5
Humedad	5,48	7,21

Los resultados obtenidos de esta investigación fueron comparados con estudios realizados en otros países, ya que en Colombia no se conocían antecedentes con estos materiales. En un estudio realizado en el continente Africano, en el año 2010, los contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina se encontraban entre 41-50%, 14-19% y 18-34%, respectivamente, para variedades de *E. camaldulensis*. En 1967, otro estudio realizado obtuvo 48,75%, 32,75% y 18,5% para los contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina, respectivamente, para la especie *P. patula*. La

comparación con estos dos estudios y otros estudios más realizados da refuerza la veracidad de los resultados obtenidos en la investigación.²⁹

En Brasil en el año 2015, se realizó un estudio comparativo entre los distintos residuos lignocelulósicos generados por la industria de la caña de azúcar y una mezcla entre esos mismos, de cuatro marcas comerciales; dentro de los residuos se incluían el bagazo, la paja y los residuos de la parte superior de la planta. Según los resultados, la composición química de las partes de los residuos lignocelulósicos difiere considerablemente según como se observa en la Cuadro 3.

Cuadro 3. Composición química de tres partes de residuos lignocelulósicos (paja, copas y bagazo)³⁰

Variedad	Residuo	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Cenizas
K	Paja	41.09	35.07	11.13	2.25
	Copas	34.68	35.92	8.00	3.63
	Bagazo	36.60	28.45	13.81	0.80
M	Paja	42.12	35.93	12.04	2.81
	Copas	35.02	37.27	8.95	3.65
	Bagazo	38.47	28.86	13.45	0.79
Q	Paja	41.27	36.53	11.33	1.72
	Copas	34.05	38.79	9.08	3.82
	Bagazo	36.13	29.19	12.83	1.14
X	Paja	39.91	37.07	11.26	2.07
	Copas	37.08	38.76	7.59	3.30
	Bagazo	39.07	31.02	12.89	0.88

Según lo que se presenta en el Cuadro 3 en términos generales, la celulosa y la hemicelulosa fueron los principales componentes de la biomasa que representaron desde el 34,11% hasta el 42,1% y del 28,5% al 38,8% del material en base seco, respectivamente. La lignina representó desde el 5,6% al 13,8%, y el contenido de cenizas de la materia prima estaba en el intervalo de 0,8% al 3,8%. Para las cuatro variedades estudiadas, el contenido más alto de celulosa era encontrado en la paja, seguido por el bagazo y las copas; los niveles más altos de hemicelulosa eran encontrados en las copas, seguido de la paja y el bagazo. La lignina en todas las variedades, se presentaba mayormente en el bagazo, seguido de la paja y las copas; mientras que el contenido de cenizas fue más alto en las copas, seguido de la paja y el bagazo. Esta composición química es de suma importancia ya que la conversión de biomasa vegetal en combustible debe estar relacionada con las características de estos materiales lignocelulósicos.

Estas variedades en la composición química de la planta para el mismo tipo de biomasa, pueden variar debido a la influencia de diferentes factores, como la

variedad de la planta, el medio ambiente de crecimiento, las condiciones de procesamiento entre otros.³⁰

Actualmente no se han realizados estudios de la cáscara de cacao para la producción de etanol de segunda generación en Colombia pero si ha sido utilizada en diversos métodos de aprovechamiento.

Uno de los aprovechamientos lo realizó la Universidad Industrial de Santander en el 2015, utilizando la cáscara de cacao como un adsorbente para aguas contaminadas. Durante el desarrollo de esta investigación, se llevó a cabo un pre tratamiento a la cáscara de cacao donde se redujo de tamaño y se eliminó la humedad; en seguida se realizó una modificación de su superficie térmicamente por medio de un reactor batch para generar cambios en su estructura. El adsorbente obtenido fue sometido a diversos lavados con agua destilada para eliminar los posibles materiales lignocelulósicos presentes y finalmente se retira la humedad.²⁵

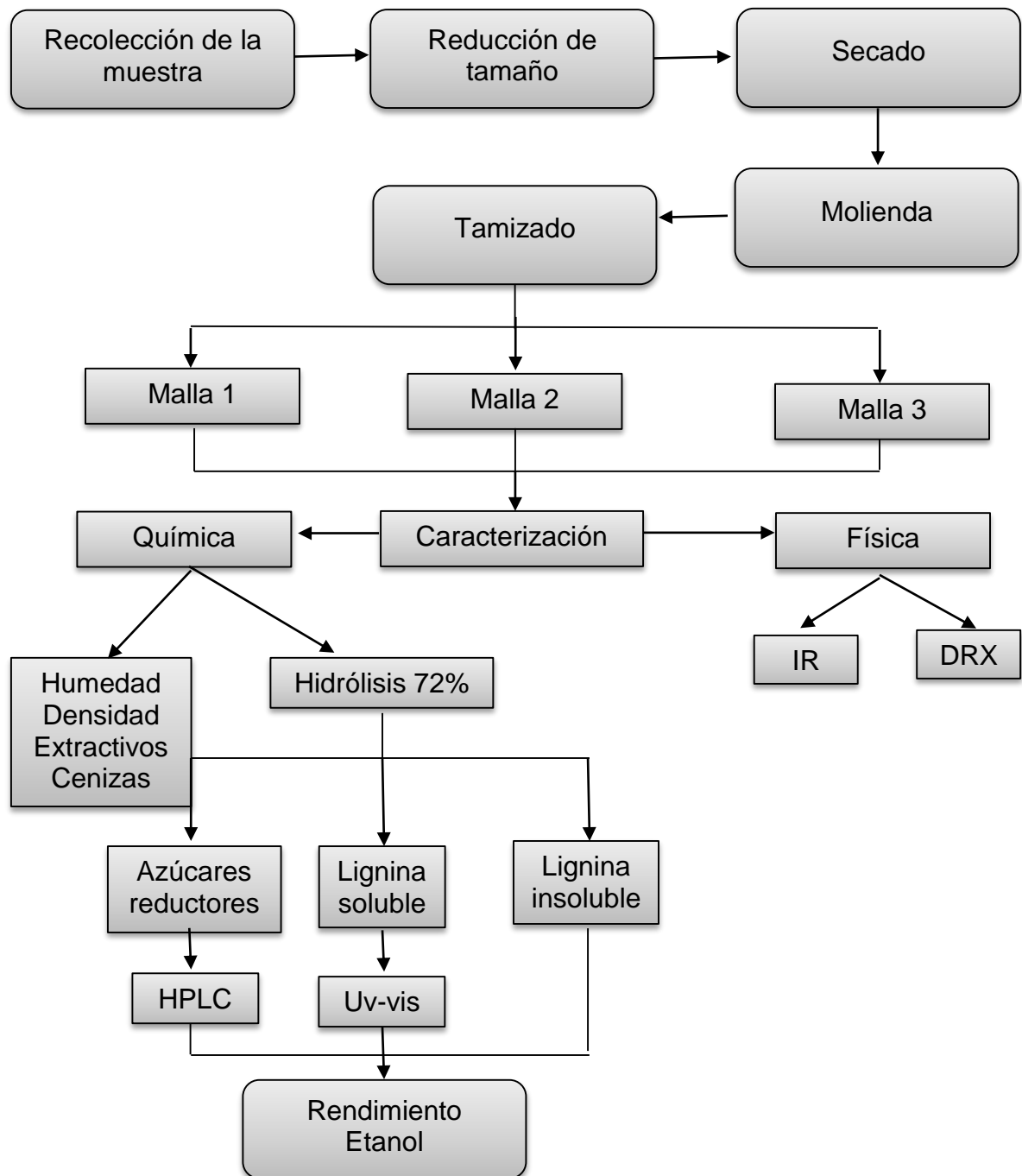
En el año 2008, fue utilizada la cáscara de cacao para la producción de pectinas; fueron extraídas pectinas de la cáscara de cacao a diferentes condiciones de temperatura y pH, en seguida fueron evaluadas sus características químicas. Se utilizó para la extracción EDTA al 0,5% a pHs de 3, 4 y 5 a temperaturas de 60, 75 y 90°C, bajo diseño factorial 3². Las variables de respuesta fueron: rendimiento de extracción el cual estuvo entre 2,64 a 4,69 g/100g, contenido de ácido anhidogalacturónico (AGA) el cual se obtuvo entre 49,8 y 64,06 g/100g; el metoxilo que se obtuvo entre 4,72 y 7,18 g/100g; el grado de esterificación se obtuvo entre 37,94% y 52,20%; y el peso equivalente de las pectinas extraídas que estuvo entre 385,47 a 464,61 g/equivalente de H⁺. Fue necesario medir la fuerza del gel péctico, que se presentó entre 285,64 y 806,03 g fuerza. Con la pectina extraída se elaboró una mermelada de fresa y se calculó su aceptabilidad empleando una escala hedónica de 7 puntos, que permitió medir un nivel de agrado promedio de “me gusta moderadamente”.³¹

La cáscara de cacao es utilizada como abono a diferentes animales, pero la teobromina presente en los granos de cacao se encuentra también en la cáscara siendo un alcaloide tóxico para los animales. Es por ello, que recientes estudios en África han demostrado como mediante un pre tratamiento pueden ser toleradas por los animales.

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología mostrada en la Figura 5 se utilizó durante la caracterización fisicoquímica de la cáscara de cacao.

Figura 5. Diagrama de procedimiento



5.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Inicialmente la cáscara de cacao se recolectó en la finca “La Esmeralda” situada en San Vicente del Chucurí. Se recolectaron las cacotas tan pronto se realizó la recolección de la siembra. Para realizar la caracterización de la cáscara de cacao fueron empleados las normas y procedimientos sugeridos por la *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) y la *American Society for Testing and Materials* (ASTM).

Figura 6. Recolección de la muestra finca La Esmeralda, San Vicente del Chucurí sin reducción de tamaño.



5.1.1 Reducción del tamaño.

Las cáscaras de cacao se picaron en pequeños rectángulos de más o menos 1 cm de ancho por 3 cm de largo con el propósito de obtener el tamaño apropiado para continuar con los protocolos.

Figura 7. Disminución manual de tamaño.



5.1.2 Secado.

Se realizó un secado con el propósito de retirar la humedad presente en la cáscara. Fue empleado un horno de calor radiante con recirculación de aire a una temperatura de 60 °C y se ingresó el material picado en mallas para obtener un secado homogéneo en todo el material. Cada 2 horas durante 32 a 36 horas se agitó para aumentar la eficiencia del secado.

Se realiza una curva de secado total del material a 110 °C.

Figura 8. Horno de calor recirculante para retirar humedad de la muestra.

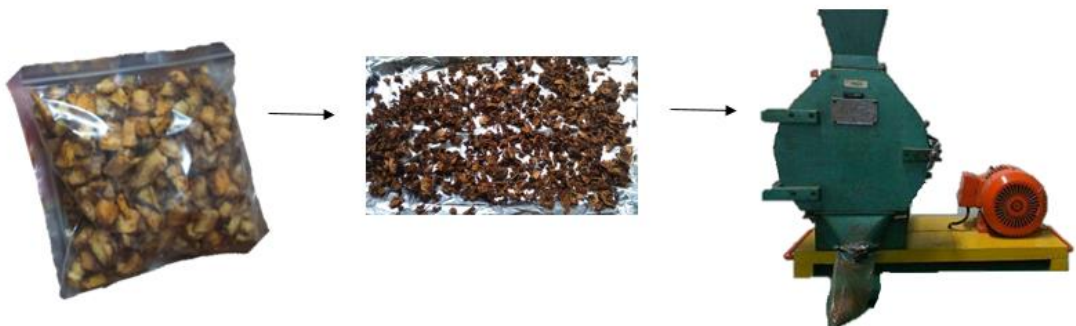


5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA CÁSCARA DE CACAO

5.2.1 Disminución del tamaño.

Se realiza la disminución del tamaño empleando un molino de cuchillas para desarrollar dos moliendas al material, en la primera se pasó el material por una malla de 2 mm, en la segunda molienda se pasó por una malla de 1 mm con el fin de obtener un material de tamaño más reducido.³²

Figura 9. Reducción de tamaño de la muestra.

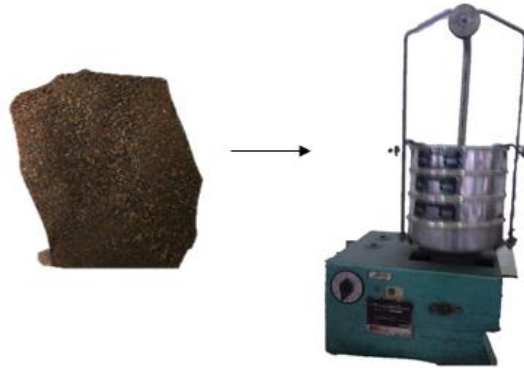


5.2.2 Clasificación por tamaño.

El material que sale del molino se llevó a un tamizador vibratorio y se dejó allí en constante movimiento durante 15 minutos para lograr obtener una mejor

clasificación. Se pasa por tamices con diferentes aberturas de malla, de números 20, 40, 60 y 80 para obtener diferentes tamaños. Se realizan los análisis con los diferentes tamaños de partículas para conocer su influencia en los resultados.

Figura 10. Clasificación del material.



Para realizar el cálculo del tamaño de la partícula se emplea la Ecuación 1, presentada a continuación.

$$\text{Fracción \%} = \left(\frac{M_{+1}}{(\sum_i^n M_i) + M_{-n}} \right) * 100 \quad (1)$$

Donde:

M_{+1} = masa de partículas retenidas por el tamiz, en g.

M_{-n} = masa de partículas que no fueron atrapados en el tamiz en, g.

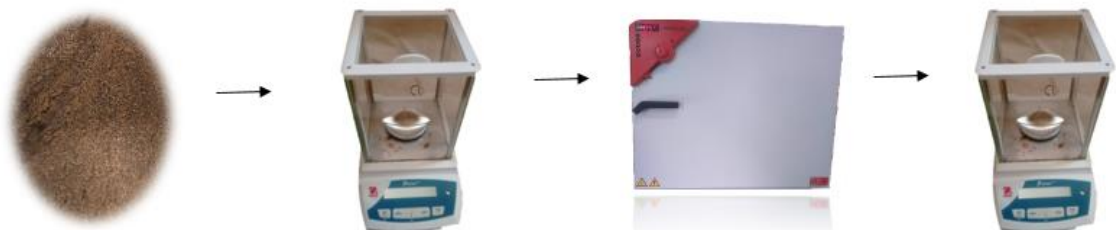
n = corresponde al diametro de la malla de los tamices en mm

Los resultados presentados a continuación se realizaron cada uno con cada muestra por triplicado.

5.2.3 Humedad.

Se deja una pequeña muestra para determinar el contenido de humedad de las muestras, ya que es importante presentar los resultados en términos de biomasa seca. El análisis de contenido de humedad se realiza a través del método NREL/TP-510-42621 usando la Ecuación (2).³³

Figura 11. Determinación de la humedad, metodología NREL



$$\% \text{ Humedad} = \frac{(M - M_1)}{M} \times 100 \quad (2)$$

Dónde:

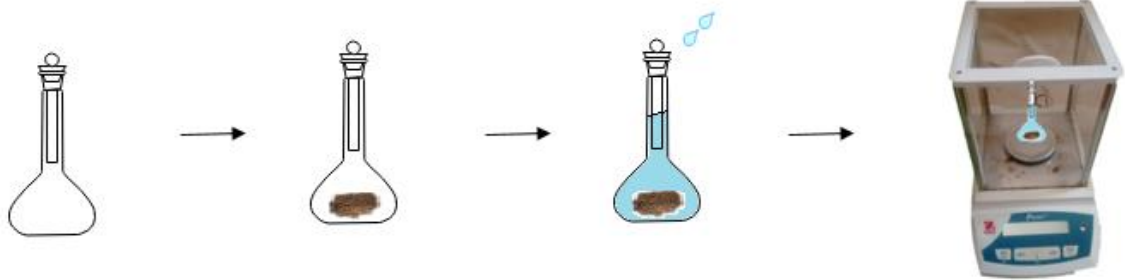
M_1 : peso seco de la muestra

M : peso fresco de la muestra

5.2.4 Densidad Real.

Para el cálculo de la densidad real se utilizó el método del picnómetro. Fueron pesados 0,5 gramos de cáscara de cacao, también se pesó el picnómetro vacío. Al picnómetro fue agregada la muestra y se pesó; en seguida se adicionó agua destilada cuidadosamente evitando la formación de burbujas hasta el enrase del picnómetro y fue pesado. Finalmente se pesó el picnómetro final. ³⁴

Figura 12. Determinación de la densidad real



Se calculó la densidad real de acuerdo a la Ecuación 3.

$$\rho_{real} = \left(\frac{m}{(P_{p+a}) - [(P_{p+m+a}) - (P_{p+m} - m)]} \right) * \rho_{agua} \quad (3)$$

Dónde:

m = muestra de la cáscara de cacao

P_p = peso del picnómetro

P_{p+m} = peso del picnómetro + muestra

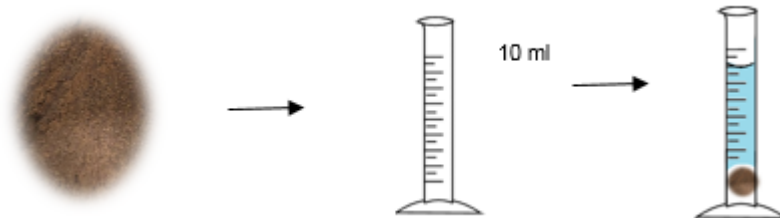
P_{p+aa} = peso del picnómetro + agua destilada

P_{p+m+a} = peso picnómetro + muestra + agua

5.2.5 Densidad Aparente.

En este análisis fue usado el método de la probeta. Se pesaron 3,5 gramos de la cáscara de cacao, se colocó en la probeta de 10 mL teniendo de no realizar compresión. Finalmente se midió el volumen ocupado en la probeta.³⁴

Figura 13. Determinación de la densidad aparente.



Se calculó la densidad aparente de acuerdo con la ecuación 4.

$$\text{Densidad Aparente} = \frac{\text{masa g}}{\text{volumen ocupado}} \quad (4)$$

5.2.6 Carbono Fijo.

El carbono fijo presente en la muestra se calculó según lo indicado en la norma ASTM 3172, teniendo en cuenta las cenizas y la humedad del material.³⁵

5.2.7 Cenizas.

Para el cálculo de las cenizas se tuvo en cuenta el protocolo de NREL/TP-510-42622 "Standard Method For the determination of the Ash in Biomassas". El contenido de cenizas se determinó mediante el uso de una mufla a través de un aumento de rampas de temperatura hasta 575 °C durante 8 horas con el fin de calcinar los compuestos orgánicos presentes en la biomasa.³⁶

Figura 14. Determinación del contenido en cenizas



El contenido de cenizas se reporta como porcentaje en peso seco, que se calcula de acuerdo a la Ecuación 3.

$$\% \text{ contenido de cenizas} = \left(\frac{m_2 - m}{m_1} \right) * 100 \quad (5)$$

Dónde:

m = peso del crisol (g)

m_1 = peso inicial de la muestra en base seca (g)

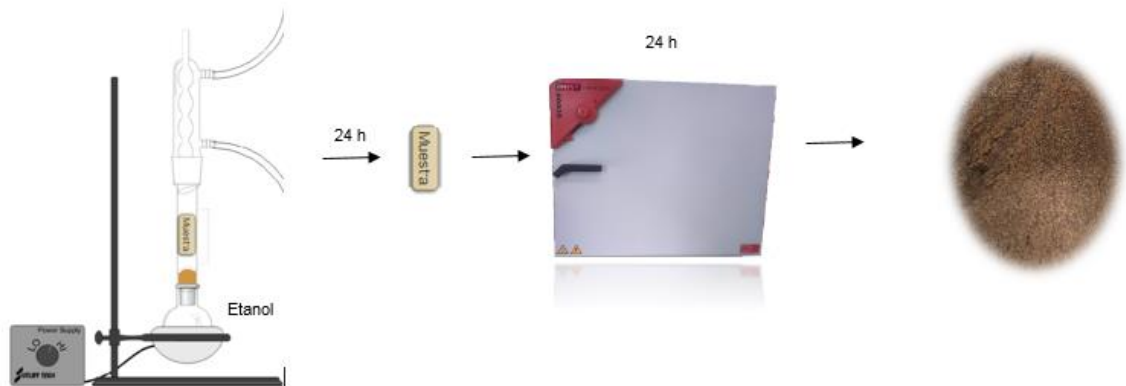
m_2 = peso de la muestra más peso de crisol después de remover de la mufla (g)

5.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA CÁSCARA DE CACAO

5.3.1 Contenido de extractivos.

La determinación del contenido de sustancias extraíbles se basó en la metodología descrita por NREL/TP-510-42619, "Determination of Extractives in Biomass". El contenido de extractivos fue determinado en un soxhlet usando 10 g de la biomasa lignocelulósica en un papel filtro y 150 mL de etanol usado como solvente. El procedimiento es realizado durante 24 horas con una velocidad de reflujo de aproximadamente cuatro veces por hora. La muestra se deja secar durante un periodo de 24 horas.³⁶

Figura 15. Determinación del contenido de extractivos



La cantidad de extraíbles se calcula mediante la Ecuación 4.

$$\% \text{ extractivos} = \left(\frac{M_i - M_f}{M_i} \right) * 100 \quad (6)$$

Donde:

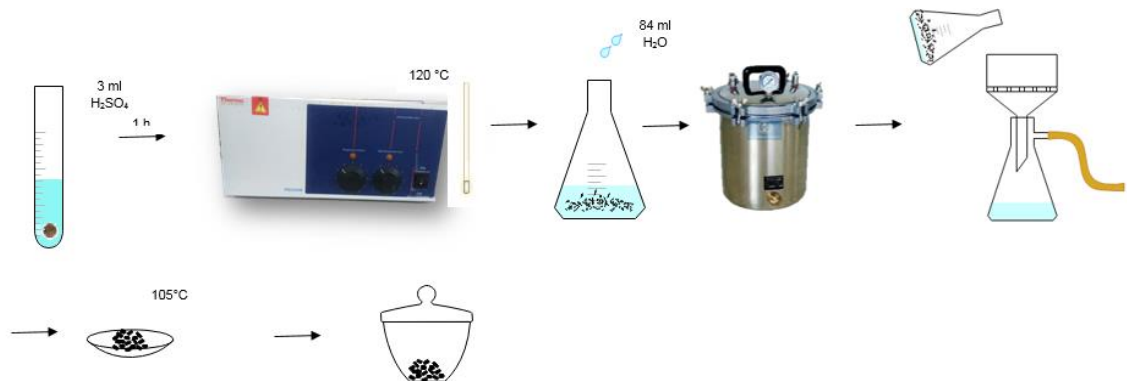
M_i = masa inicial de material seco (g)

M_f = masa final de los extractivos libres del material (g)

5.3.2 Lignina insoluble.

Para determinar el contenido de lignina insoluble se usó la metodología descrita por NRELL/TP-510-42618. Inicialmente se hace reaccionar 300 mg de la cáscara de cacao con 3 mL de ácido sulfúrico al 72% durante una hora en un baño termostático. Este hidrolizado es transferido a un Erlenmeyer agregando 84 mL de agua desionizada para bajar la concentración del ácido sulfúrico, en seguida el Erlenmeyer es llevado a un autoclave a 120 °C durante una hora. La solución se filtró a través de un embudo buchner separando el sólido para determinar el contenido de lignina insoluble en el ácido. El residuo es lavado con agua desionizada para retirar el ácido que aún está presente. El sólido se secó a 105 °C y en seguida se calculó el porcentaje de cenizas.³⁷

Figura 16. Determinación del contenido de la lignina insoluble



Para calcular el porcentaje de lignina insoluble en ácido se empleó la Ecuación 5:

$$\% \text{ lignina insoluble} = \left(\frac{g_{\text{filtro+muestra}} - g_{\text{filtro}}}{g_{\text{muestra}}} * 100 \right) - \% \text{ cenizas} \quad (7)$$

5.3.3 Determinación de lignina soluble

El contenido de lignina soluble en ácido es la fracción de lignina que se disolvió en la etapa anterior. Se determinó su contenido por medio de la metodología descrita

por NRELL/TP-510-42618. El líquido obtenido en la filtración de la lignina insoluble en ácido fue analizado por un espectrofotómetro de ultravioleta visible Angilent Technologies. Fue medida la absorbancia del hidrolizado a 280 nm utilizando una celda y diferentes patrones para obtener el factor de dilución.³⁷

Figura 17. Determinación de lignina soluble



Para calcular la concentración está se empleara la Ecuación 6.

$$C_{ASL} = \left(\frac{UV_{abs} * Volumen\ filtrado * Factor\ de\ dilución}{\epsilon * peso\ seco\ de\ la\ muestra} \right) * 100 \quad (8)$$

Donde:

C_{ASL} = concentración de lignina soluble en el hidrolizado ($\frac{g}{L}$)

UV_{280nm} = absorbancia del hidrolizado en 280 nm

ϵ = constante de absortividad

5.4 ANÁLISIS QUÍMICO

5.4.1 Cuantificación de Azúcares Reductores

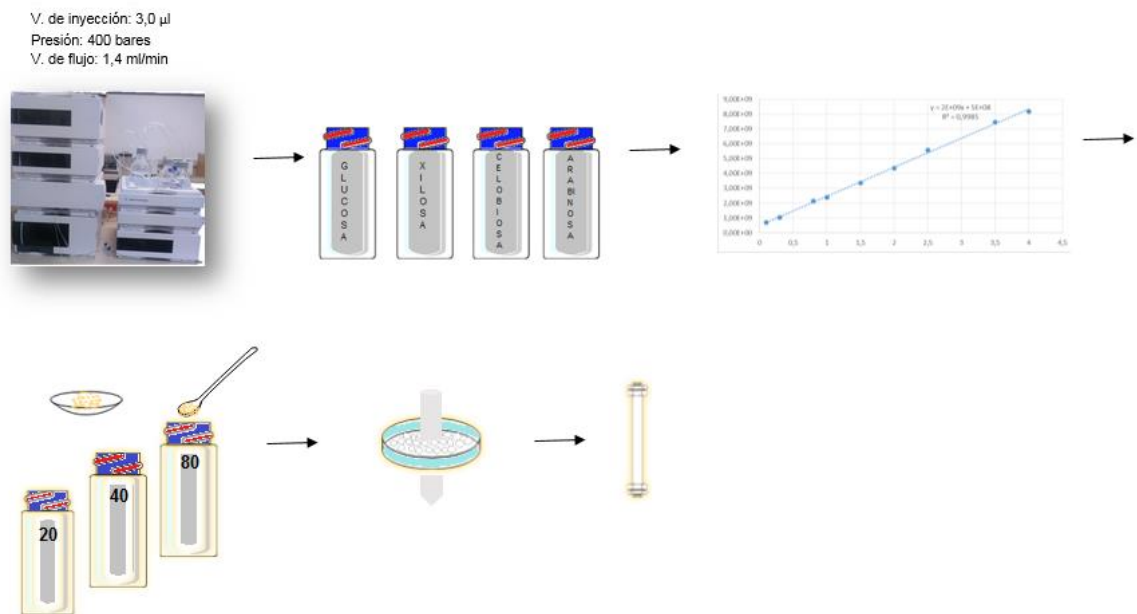
Los carbohidratos se determinaron por medio de la metodología descrita por NRELL/TP-510-42618, "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass". Los monosacáridos (glucosa, xilosa, celobiosa y arabinosa) presentes en el líquido que se obtuvo en la filtración de la lignina son cuantificados por medio de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC).³⁷

Inicialmente el cromatógrafo Agilent Technologies 1200 series tenía como condiciones un volumen de inyección de 3,0 μ l, una presión de 400 bares y una velocidad de flujo de 1,4 ml/min. Se inyectaron cuatro muestras madres de glucosa, xilosa, celobiosa y arabinosa; en seguida se inyectaron soluciones líquidas con estos azúcares para realizar la construcción de las curvas de calibración necesarias

para cuantificar los carbohidratos. Las curvas de calibración se realizaron usando soluciones de concentraciones conocidas y se correlacionaron con las áreas obtenidas después de la inyección del cromatógrafo. Los resultados obtenidos se usaron para calcular la concentración desconocida de los azúcares en relación con un área determinada y conocida.

Se tomaron alícuotas de aproximadamente 2 mL de cada hidrolizado obtenido de la hidrólisis del cacao 20, 40 y 80; y fue necesario neutralizarlas con carbonato de calcio para llevar su pH de 5 a 6. El carbonato fue adicionado lentamente evitando la formación de espuma. Cada hidrolizado neutralizado fue filtrado utilizando filtros de membrana de 0,22 µm de poro Millipore e inyectados en el equipo de HPLC utilizando una columna Zugar Paks con una fase móvil de acetonitrilo – agua desionizada (75:25).

Figura 18. Determinación del contenido de azúcares reductores



Las masas de glucosa y xilosa fueron convertidas a celulosa y hemicelulosa usando factores de conversión de 0,9 y 0,88 respectivamente. Para calcular el porcentaje de azúcares, se empleara la Ecuación 7.

$$\% \text{ azúcares} = \left(\frac{C_{HPLC} * CA * V_{filtrado}}{M_b} \right) * 100 \quad (9)$$

Donde:

C_{HPLC} = concentración de azúcar cuantificado por HPLC $\left(\frac{g}{L}\right)$

C_A
= factor de correlación para el cálculo de la concentración de polímero de azúcares, dada la concentración de monómeros de azúcares

$V_{filtrado}$ = volumen hidrolizado de filtrado.

M_b = peso del material seco (g)

5.4.2 Análisis de materiales lignocelulósicos difracción de rayos x (DRX).

Este análisis se realizó con el fin de evaluar los cambios en la estructura química de la cáscara de cacao según la metodología descrita por RABELO (2010). Se logró evaluar el cambio en la cristalinidad de la cáscara de cacao después de la etapa de pretratamiento. Su análisis se realizó en la Universidad Industrial de Santander (UIS).³⁸ La Ecuación 10 fue empleada para calcular el índice de cristalinidad de la celulosa.

$$I_c = \left(\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) * 100 \quad (10)$$

I_c = Índice de Cristalinidad

I_{002} = Intensidad máxima en el pico cristalino

I_{am} = Intensidad del pico en la fase amorfa

5.4.3 Análisis de espectroscopia infrarroja por transformación de Fourier (FTIR).

Este estudio se realizó para evaluar los cambios presentados en la estructura química de la cáscara de cacao, con relación a los grupos de lignina, hemicelulosa y celulosa. Su análisis se llevó a cabo en la sede de Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander (UIS).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

Fue necesario realizar una alteración microscópica y macroscópica en la biomasa, disminuyendo su tamaño de partícula permitiendo así reducir la cristalinidad de la celulosa, aumentar la porosidad de la biomasa y lograr una mayor accesibilidad de los reactivos durante la hidrólisis. Es importante tener en cuenta, que el tamaño y la forma de las partículas son las que definen el tipo de tratamiento que recibirá la biomasa.³⁹

6.2 CARACTERIZACIÓN DE LA CÁSCARA DE CACAO

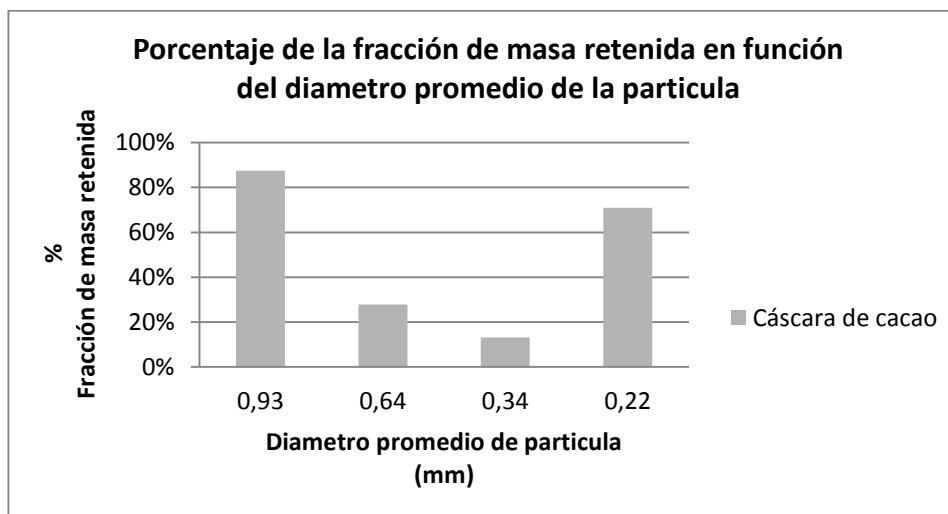
6.2.1 Clasificación por tamaño.

El material reducido fue pasado por mallas de 20, 40, 60 y 80 con el fin de realizar la separación granulométrica. En el cuadro 4 se presentan los resultados obtenidos después de tamizar la muestra por los diferentes diámetros del tamiz y en la gráfica 2 se observa la curva granulométrica resultado del tamizado de la muestra.

Cuadro 4. Resultados tamizado de la muestra

No. Tamiz	Diámetro (mm)	%Fracción masa retenida	Promedio diámetro de partícula (mm)
20	0,85	87,50	0,93
40	0,43	27,85	0,64
60	0,25	13,20	0,34
80	0,18	70,90	0,22

Gráfica 2. Curva Granulométrica



De acuerdo a la Gráfica 2 aproximadamente el 82% del material fue retenido por la el tamiz de 20 que presenta un diámetro de partícula de 0,93 mm; además de ello, el 70% del material fue retenido por el tamiz de 80 que tiene un diámetro de partícula de 0,22 mm. La otra parte del material se retuvo en diámetros de partícula intermedios a los mencionados anteriormente. Durante el desarrollo de la investigación se analizó el material con un diámetro de partícula de 0,93 mm (20), 0,64 mm (40) y 0,22 mm (80).

6.2.2 Humedad.

Se realizan dos pruebas de humedad, la primera se realiza durante un período de 8 horas a tres muestras iguales obtenidas después de la reducción de tamaño, y la segunda a tres muestras iguales durante un periodo de 24 horas seguidas. Esto se realiza con el fin de reducir el crecimiento de microorganismos que puedan degradar el material.

Gráfica 3. Curva de secado de la cáscara de cacao



En la gráfica 3 se observa la humedad de las tres muestras iguales en el periodo de 8 horas en donde se observa que la pérdida de humedad se estabiliza al cabo de 3 horas y pasadas las 8 horas se obtiene una pérdida de humedad total del 81,17%. Para las muestras iguales durante el periodo de 24 horas seguidas se obtuvo una pérdida de humedad total del 82,04%.

6.2.3 Densidad Real.

En el cuadro 6 se presenta la densidad real del cacao en los diferentes tamices.

Cuadro 5. Densidad Real de la cáscara de cacao

Cacao	Densidad Real (g/ml)
20	1,15
40	1,14
80	0,90

Según lo presentado en el cuadro 6, a medida que se incrementó el tamaño de partícula aumentó la densidad real. Los resultados obtenidos de la densidad real del cacao corresponden a los reportados a la literatura.³⁷

6.2.4 Densidad Aparente.

En el cuadro 7 se presenta la densidad aparente de la cáscara de cacao medida en los diferentes tamices.

Cuadro 6. Densidad Aparente de la cáscara de cacao

Cacao	Densidad Aparente (g/ml)
20	0,36
40	0,39
80	0,42

La densidad aparente del cacao estuvo en el rango de 0,36 a 0,42 siendo esto un valor bajo que permite pronosticar que para un pretratamiento a futuro es necesario utilizar reactores de mayor capacidad para los siguientes procesos de desarrollo.

6.2.5 Carbono Fijo

En la Cuadro 8 se presentan los resultados de carbono fijo en base seca, calculados teniendo en cuenta el porcentaje de materiales volátiles y el porcentaje de cenizas.

Cuadro 7. Carbono fijo presente en la cáscara de cacao

Tamiz	%Carbono Fijo
20	77,01
40	74,93
80	74,50

6.2.6 Cenizas.

En el cuadro 5 se presenta el porcentaje de cenizas del material de los diferentes tamices, que se determinó en una mufla a rampas de temperatura hasta 575 °C, esto con el fin de eliminar el material orgánico que se encuentre en las muestras.

Cuadro 8. Cenizas del material

Tamiz	% Cenizas
20	6,45
40	8,63
80	9,13

Según los resultados obtenidos en los porcentajes de cenizas se puede afirmar que son los óptimos para continuar con el procedimiento descrito por la norma NREL, ya que en la norma específica que un contenido de cenizas mayor al 10% no sería adecuado para el siguiente procedimiento ya que la muestra puede contener suelo u otros minerales que pueden interferir con las concentraciones de ácido y pueden llegar a catalizar reacciones secundarias.³⁷

6.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA CÁSCARA DE CACAO

6.3.1 Contenido de Extractivos.

Para lograr la determinación de la celulosa, hemicelulosa y lignina fue necesario extraer de la muestra los componentes no estructurales que se encuentran presentes en las diferentes fibras vegetales tales como ácidos grasos, terpenos, fenoles y resinas. Estos compuestos son solubles en agua, metanol, etanol o acetona por lo que son eliminados rápidamente por procesos de extracción. Durante el desarrollo de esta investigación se usó el etanol, un disolvente orgánico polar y volátil. Los resultados del porcentaje de extractivos presentes en la cáscara del cacao son reportados en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Porcentaje de Extractivos

Tamiz	% Extractivos
20	19,41
40	19,70
80	20,01

Según los resultados obtenidos en el Cuadro 9, se observa que el porcentaje de extractivos en el material más fino (malla 80) es el más alto entre los porcentajes de extractivos obtenidos; esto se puede ser debido a que el tamaño de partícula es menor y se puede extraer un poco más que en los demás tamaños de partícula.

6.3.2 Lignina Total

En el Cuadro 10 se presentan los porcentajes de lignina soluble e insoluble obtenidos.

Cuadro 10. Porcentaje de Lignina obtenido de la cáscara de cacao

Tamiz	ASL	Desv.	AIL	Desv.	Lignina Total
20	7,27	0,88	36,96	0,91	44,23
40	4,71	0,55	40,68	0,97	45,39
80	3,77	0,57	29,66	0,91	33,43

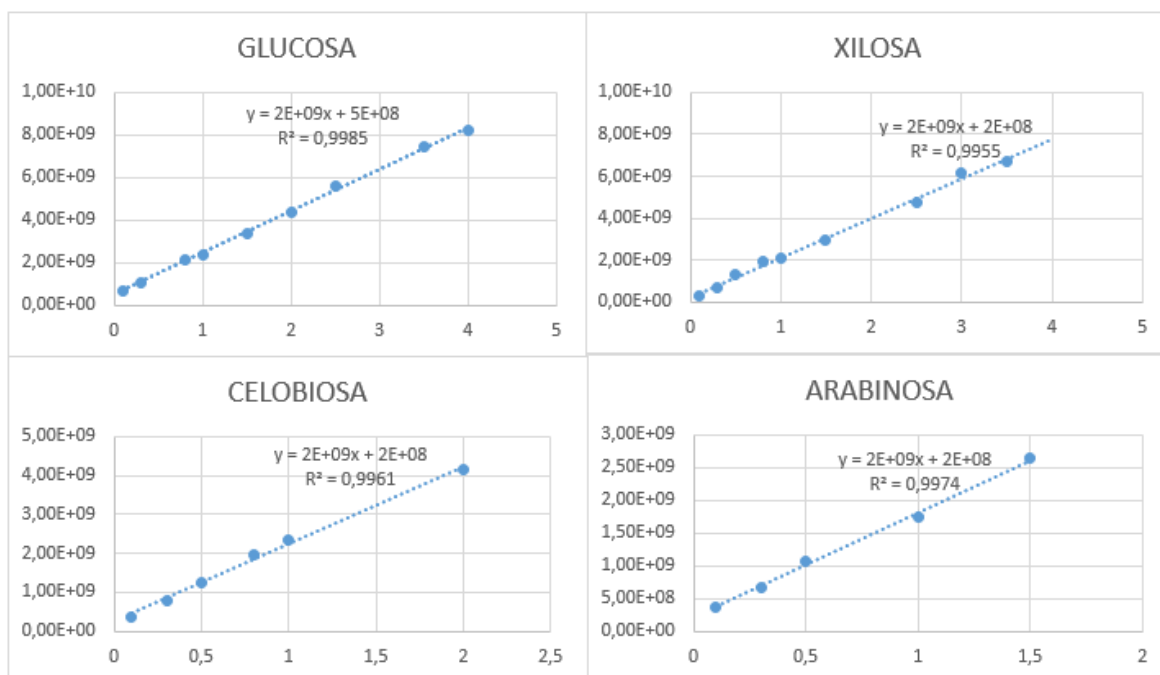
Tal y como se observa en el Cuadro 10, los porcentajes de lignina total son altos, esto posiblemente debido a la no extracción total de todos o la mayoría de los componentes presentes en la cáscara de cacao. Además de ello, la cáscara de cacao es un material maderero blando bastante rígido que ofrece al material mayor resistencia estructural y esto se observa por los altos contenidos de lignina, demostrando que es un material de difícil acceso a la celulosa.²⁹

6.4 ANÁLISIS QUÍMICO

6.4.1 Cuantificación de Azúcares Reductores

Las curvas obtenidas en la cuantificación de los monosacáridos (glucosa, xilosa, celobiosa y arabinosa) se presentan en la Gráfica 4. Para la realización de las curvas de calibración fue necesario tener en cuenta la concentración de los monosacáridos y se correlacionaron con las áreas obtenidas después de la inyección del cromatógrafo teniendo en cuenta el tiempo de retención de cada azúcar (Cuadro 11).

Gráfica 4. Curvas obtenidas en la cuantificación de los monosacáridos



Cuadro 11. Tiempos de retención de los monosacáridos

Monosacáridos	Tiempo de Retención
Xilosa	2,75
Arabinosa	2,98
Glucosa	3,45
Celobiosa	4,98

En el Cuadro 12 se presentan los porcentajes de celulosa y hemicelulosa obtenidos en la caracterización química de la cáscara de cacao.

Cuadro 12. Porcentaje de Celulosa y Hemicelulosa obtenido de la cáscara de cacao

Tamiz	%Celulosa	Desv.	%Hemi	Desv.
20	23,82	0,62	2,97	0,38
40	21,20	1,23	2,13	1,22
80	27,04	0,11	1,58	0,47

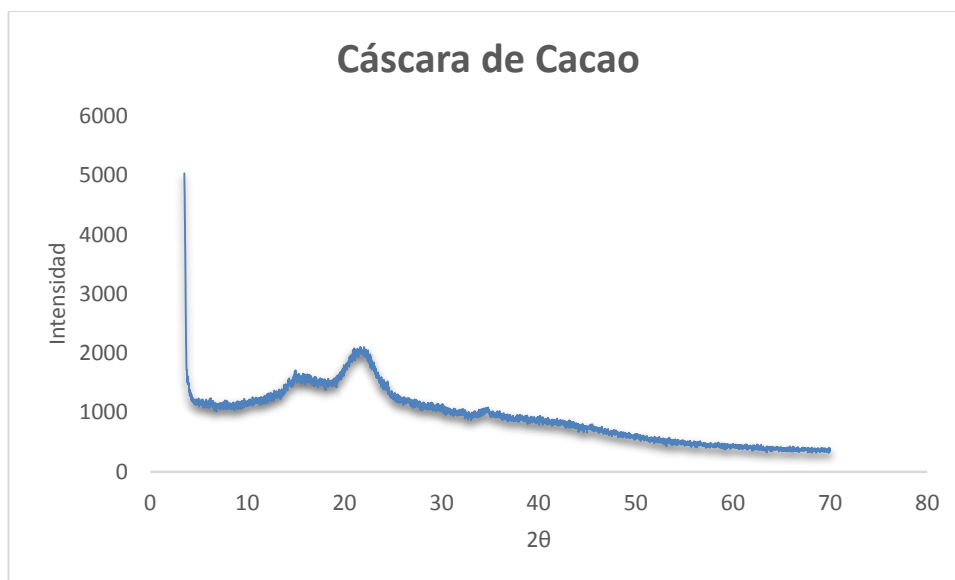
Los valores obtenidos de celulosa y hemicelulosa pueden presentar un bajo porcentaje, esto debido al uso del ácido sulfúrico que hace que la celulosa y la hemicelulosa se degraden en azúcares y éstos se degraden a su vez produciendo dos compuestos derivados del furano: el furfural que se forma a partir de las pentosas (xilosa) y el 5-hidroximetilfurfural que se forma a partir de las hexosas (glucosa).⁴⁰

En la literatura, como ya se mencionó anteriormente, no existe reporte de la caracterización fisicoquímica de la cáscara de cacao pero si de materiales provenientes de la industria de cacao como la cascarilla. En el año 2012, la Universidad de Pereira, realizó una caracterización de la cascarilla, donde reportaron valores de celulosa (20, 22, 19) y hemicelulosa (7.06, 7.75, 4.34) que al compararlos con los obtenidos en esta investigación se observa la similitud entre estos.⁴¹

6.4.2 Difracción de Rayos X (DRX)

La cristalinidad que presenta la celulosa es un factor importante en el proceso de la hidrólisis. En la Figura 19. se presentan los perfiles de difracción para la cáscara de cacao. El índice de cristalinidad es definido como el porcentaje de celulosa cristalina sobre el contenido total de celulosa.

Gráfica 5. Difractograma de la cáscara de cacao



En base a la Figura 19, se calculó el índice de cristalinidad de la cáscara del cacao que se presenta en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Índice de Cristalinidad de la cáscara de cacao

Muestra	Índice de cristalinidad
Cáscara de cacao	24,16

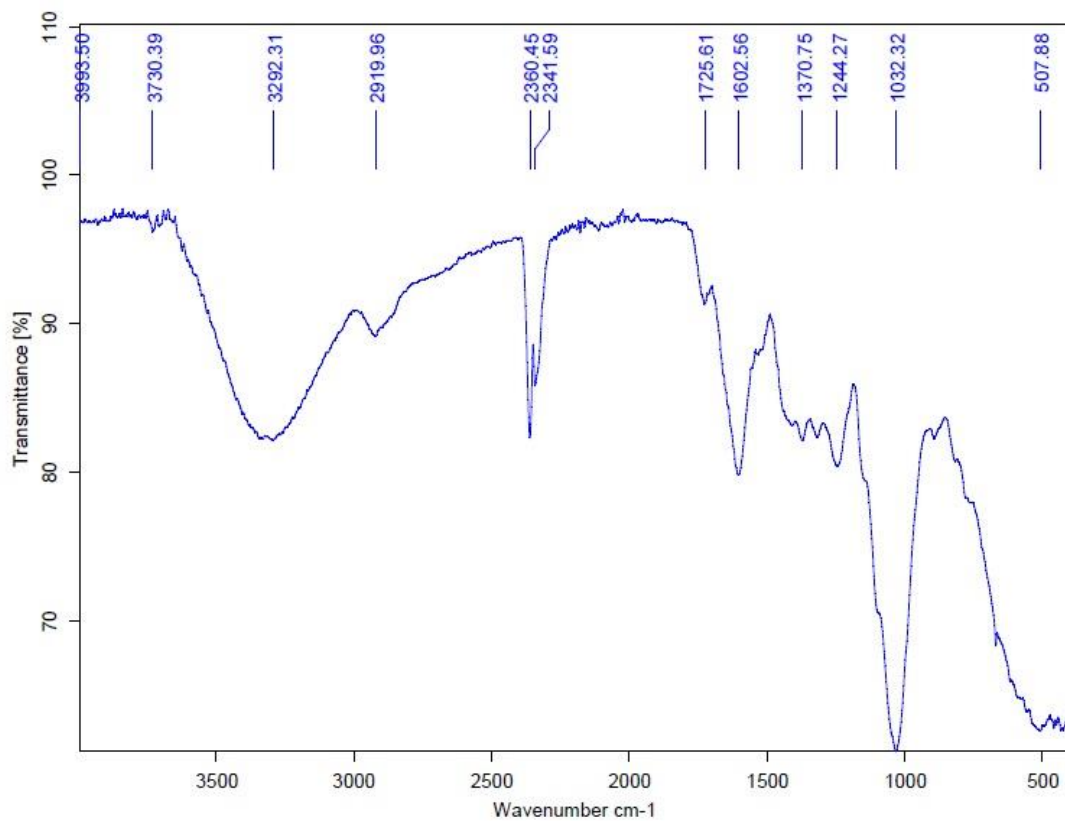
Este índice de cristalinidad mide la cantidad relativa de celulosa cristalina en el total de la muestra. A medida que la fracción amorfa presente en la biomasa es

solubilizada durante el tratamiento se observará un aumento en el índice de cristalinidad de la biomasa.⁴²

6.4.3 Espectroscopia infrarroja por transformación de Fourier (FTIR)

En el espectro presentado a continuación son analizados en las regiones que describen mayor transmitancia, la primera corresponde a la banda que se encuentra en 3292 cm^{-1} que pertenecen a la vibración de estiramiento de los grupos hidroxilo presentes en celulosa y la hemicelulosa. En 2919 cm^{-1} se encuentra la vibración entre el enlace metilo y metileno que están presentes en los carbohidratos y en algunas unidades de la lignina. La banda a 1725 cm^{-1} se hace referencia a los grupos acetilo presentes en la hemicelulosa. En la región ubicada entre 1602 y 1370 cm^{-1} se encuentra la vibración entre el enlace -C=C- del anillo aromático, que muestra la existencia de grupos fenólicos. Las bandas en 1032 cm^{-1} y 1244 cm^{-1} representan los grupos OH primarios y secundarios de los compuestos de la lignina. La región entre las bandas en 1730 , 1150 y 893 cm^{-1} pertenece a la vibración de los grupos carbonilo -C=O de los ácidos carboxílicos formados por la hidrólisis de los grupos acetilo de la hemicelulosa. La banda a los 899 cm^{-1} pertenece a los enlaces de tipo C-O-C y se atribuye a los enlaces β -glucosídicos que se encuentran en la celulosa.^{43,44}

Gráfica 6. Espectro FTIR de la cáscara de cacao



6.5 POTENCIAL EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

Es necesario realizar el cálculo potencial de la biomasa (cáscara de cacao) y para ello es necesario tener en cuenta el poder calorífico inferior de la cáscara de cacao que según reportes en la literatura es de 4,384 kcal/kg.³⁹

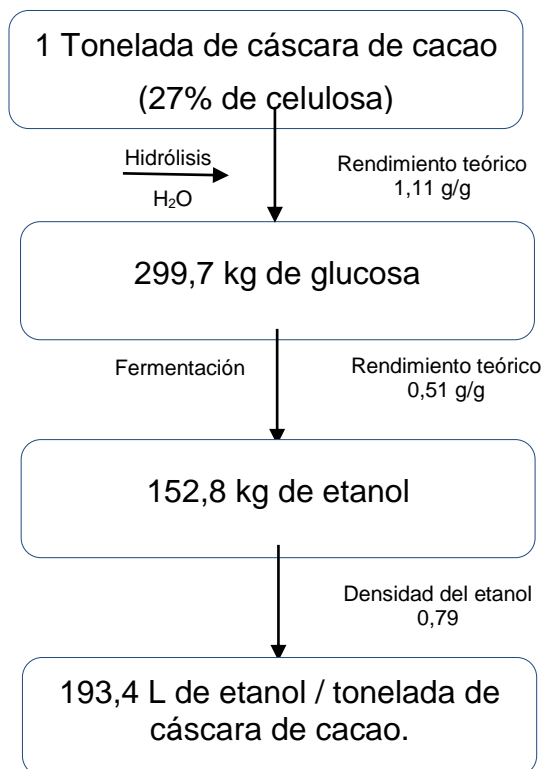
Para calcular el potencial energético de la biomasa fue necesario realizar un modelo matemático en donde se exponen que la energía contenida en el material es proporcional a su masa seca.⁴⁵

Cuadro 14. Potencial energético de la biomasa

Masa del residuo seco [t/año]	Energía del residuo por unidad de masa [TJ/t]	Potencial energético de la biomasa [TJ/año]
48000	$1,835 \times 10^{-5}$	0,881036

En la Figura 19 se presenta el potencial en litros de etanol calculado según el porcentaje de celulosa obtenida en la durante la caracterización de la cáscara de cacao. Si tenemos una tonelada de la cáscara de cacao obtendremos 194,1 L de etanol.⁴⁶

Figura 19. Potencial en la producción de etanol



7. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos, la cáscara de cacao presenta un óptimo potencial para la producción de etanol de segunda generación por presentar porcentajes de celulosa y hemicelulosa (27,04% y 2,97%) llegando a producir (193,4 L) por tonelada de biomasa.

El contenido de lignina de esta biomasa es (45,39%), se recomienda el uso de pre tratamientos adecuados para removerla, y de esta manera poder acceder fácilmente a la celulosa.

El análisis granulométrico de la cáscara de cacao permite concluir que el material obtenido de la malla 80 (0,22 mm) es el más promisorio para la obtención de etanol de segunda generación ya que su tamaño de partícula permite una mayor penetración de los reactivos utilizados. Sin embargo las diferencias de los tamaños de partícula evaluados no son significativos con lo cual no es necesario el proceso de separación granulométrica si se proyecta a un escalado a nivel industrial.

La etapa de la caracterización fisicoquímica del material lignocelulósico es la etapa primordial de evaluación, ya que de ésta depende la continuación del uso del material en la obtención de etanol de segunda generación.

8. RECOMENDACIONES

En un próximo estudio se podrían cuantificar el contenido de furfural y el hidroximetilfurfural producidos en los hidrolizados con ácido sulfúrico, para de esta manera obtener porcentajes mayores de celulosa y hemicelulosa.

Ya que el porcentaje de lignina es alto se puede utilizar el material para la obtención de nuevos compuestos como combustible debido a que el poder calorífico que posee es más elevado que el de la madera.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Eichler, P.; Santos, F.; Toledo, M.; Zerbin, P.; Schmitz, G.; Alves, C.; Ries, L. & Gómez, F. Biomethanol production via gasification of lignocellulosic biomass. *Química Nova* **2015**, *38*, 828-835.
2. Hamelinck, C.; Hooijdonk, G. & Faaij, A. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long term. *Biomass & Bioenergy* **2005**, *28*, 384-410.
3. Stichonothé, H.; Azapagic, A. Bioethanol from waste: Life cycle estimation of the greenhouse gas saving potential. *Resources, Conservation and Recycling* **2009**, *53*, 624-630.
4. Jaimes, Y. & Aranzazu, F. Manejo de las enfermedades del cacao en Colombia, con énfasis en monilia. *Corpoica* **2010**, 25-27.
5. Lin, C.; Luque, R. & Kraus, G. Renewable Resources for Biorefineries. . *Royal Society of Chemistry* **2014**, *27*, 116-120.
6. Douglas, K. Potential Soil Quality Impact of Harvesting Crop Residues for Biofuels. *Agrociencia* **2011**, *15*, 120-127.
7. Lynd, L.; Cushman, J.; Nichols, R. & Wyman, C. *Fuel Ethanol from Cellulosic Biomass.. Science* **1991**, *251*, 1318-1323.
8. Martínez, H. & Espinal, C. La cadena de cacao en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica. *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural* **2005**, *92*, 18-20.
9. Ragauskas, A. *Materials for Biofuels. World Scientific Publishing Company* **2014**, *4*, 7.
10. Amarasekara, A. Handbook of Cellulosic Ethanol. In *Introduction to Cellulosic Ethanol*/Somerset NJ: **2013**; pp 4-8.
11. Babu, V.; Thapliyal, A. & Patel, G. Biofuels Production. In *Advances in Biofuel Production*/Somerset NJ: **2013**; pp 23-26.
12. Patel, M. & Kumar, A. Production of renewable diesel through the hydroprocessing of lignocellulosic biomass-derived bio-oil: A review. . *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2016**, *58*, 1293-1307.

13. Fukuda, H. Factors controlling Plant Cell wall Patterning. In *Plant Cell Wall Patterning and Cell Shape* Somerset NJ: **2014**; Vol. 3, pp 66.
14. Golan, A. Cellulase: Types and Action, Mechanism, and Uses. *Biotechnology in Agriculture, Industry and Medicine* **2011**, 214.
15. Fillat, U. Aplicación de biotecnología para la obtención de pastas de alta calidad. Estudio de sistemas enzimáticos en secuencias de blanqueo respetuosas con el medio ambiente. Universitat Politècnica de Catalunya. Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera, Terrassa, **2008**.
16. Sanghi, R. & Singh, V. Lignocellulosics as a Renewable Feedstock for Chemical Industry. Chemical Hydrolysis and Pretreatment Processes. In *Green Chemistry for Environmental Remediation*. Somerset NJ: **2012**; pp 112-116.
17. Mukhrajee, A. *Cell Biology: Fundamentals and Applications*. ; Oxford Book Company: **2008**; , pp 18.
18. Stokke, D.; Wu, Q. & Han, G. Wood as a Lignocellulose Exemplar. In *Introduction to Wood and Natural Fiber Composites*. John Wiley & Sons: **2013**; pp 57.
19. Tejado, A.; Peña, C.; Labidi, J.; Echeverria, J. M.; Mondragon, I. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol formaldehyde resin synthesis. *Bioresour. Technol.* **2007**, 98, 1655-1663.
20. Rojas, F. & Sacristán, E. Guía ambiental para el cultivo del cacao. . *Federación Nacional de cacoteros* **2013**, 73-80.
21. Arciniegas, A. Caracterización de árboles superiores de cacao (*Theobroma cacao L.*) seleccionados por el programa de mejoramiento genético del Catie, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica, **2015**.
22. Capareda, S. *Introduction to biomass energy conversions*; **2014**; Vol. 1, pp 580.
23. Gismera, G.; Quintana, M. & Da, S. Introducción a la cromatografía líquida de alta resolución. *Universidad Autónoma de Madrid* **2009**, 17-21.
24. Gil, O.; Martínez, B. & Barón, A. Estudio del equipo de difracción de rayos X TEL-X-OMETER. *Revista Colombiana de física* **2006**, 38, 786-789.
25. Delgado, D. & Martínez, A. Producción de un material adsorbente a partir de la cáscara de la mazorca de cacao para la remoción de colorante azul de metileno

contenido en aguas residuales, Escuela de Ingeniera química: Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **2015**.

26. Chen, Y.; Zou, C.; Martalerz, M.; Hu, S.; Gasaway, C. & Tao, X. Applications of Micro-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) in the Geological Sciences. *International Journal of Molecular Sciences*. **2015**, *16*, 30223-30250.

27. Ribeiro, E.; Trajano, R. & Souto, A. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova* **2009**, *32*, 1500-1503.

28. Hindi, S.; Bakhshwain, A. & El-Feel, A. Physico-Chemical characterization of Some Saudi lignocellulosic natural resources and their suitability for fiber production. *Department of Arid Land Agriculture*. **2010**, *21*, 45-55.

29. Gómez, E.; Ríos, L. & Peña, J. Efecto del Pretratamiento de Biomasa Maderera en el Rendimiento a Etanol. *Información Tecnológica* **2013**, *24*, 113-122.

30. Pereira, S.; Maehara, L.; Monteiro, M. & Sánchez, C. 2G etanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. *Biotechnology for Biofuels* **2015**, *8*, 1-17.

31. Barazarte, H.; Sangronis, E. & Unai, E. La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L): una posible fuente comercial de pectinas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* **2008**, *58*, 64.

32. Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, A.; Sluiter, J. & Templeton, D. Preparation of Samples for Compositional Analysis. *Laboratory Analytical Procedure NREL* **2008**, *NREL/TP-510-42620*, 1-12.

33. Sluiter, A.; Hames, B.; Hyman, D.; Payne, C.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. & W., J. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. *Laboratory Analytical Procedure NREL* **2008**, *NREL/TP-510-42621*, 1-9.

34. Martínez, J.; Narros, A.; Fuente, M.; Pozas, F. & Díaz, V. *Experimentación en química general*; Paraninfo: Madrid, **2006**; pp 218-56.

35. Róz, A.; Ricardo, J.; Nakashima, G.; Santos, L. & Yamaji, F. Maximização do teor de carbono fixo em biocarvão aplicado ao sequestro de carbono. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* **2015**, *19*, 810-814.

36. Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J. & Templeton, D. Determination of Ash in Biomass. *Laboratory Analytical Procedure NREL* **2008**, *NREL/TP-510-42622*, 1-5.

37. Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. & Crocker, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *Laboratory Analytical Procedure NREL* **2008**, NREL/TP-510-42618, 3-17.
38. Rabelo, S. C. Evaluación y optimizaçãõ de pretratamiento y la hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar parágrafo etanol de Segunda Geraçãõ, Escuela de Ingeniería Química. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, **2010**.
39. Sánchez, J. P. Evaluación energética de cáscaras de cacao nacional y CCN-51, Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador, **2013**.
40. Rabelo, S. C. Avaliacao de desempenho do pré- tratamento com peróxido de hidrogenio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar , Universidade Estadual de Campinas, Campinas-São Paulo, **2007**.
41. Baena, L. & García, N. Obtención y caracterización de fiebra dietaría a partir de cacarilla de las semillas tostadas de Theobroma cacao L. de una industria chocolatera colombiana. , Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, **2012**.
42. Salcedo, J.; Rios, M.; Ferrer, A.; López, J.; Pardo, L. & Aiello, C. Efecto del pretratamientos deslignificantes sobre la cristalinidad, hidrólisis enzimática y ultraestructura de residuos de la cosecha de la caña de azúcar. . *Acta Microscopica* **2013**, 22, 142-151.
43. Mateus Fontecha, L. Evaluación de los pretratamientos con ácido sulfúrico diluido y AFEX en la biomasa lignocelulósica del tipo pasto gigante "Pennisetum Sp", Universidad Nacional de Colombia, Bogotá., **2011**.
44. Namazi, A.; Jia, C. & Allen, D. Production and characterization of lignocellulosic biomass-derived activated carbon. *Water Science & Technology* **2010**, 62.11, 2637-2646.
45. Escalante, H.; Orduz, J.; Zapata, H.; Cardona, M. & Duarte, M. Atlas del Potencial Energético de la Biomasa Residual en Colombia. *Ministerio de Minas y Energía* **2008**, 978-958-8504-59-9, 1-182.
46. Santos, F.; Queiróz, J.; Colodette, J.; Fernandes, S.; Guimaraes, V. & Sebastiao, T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produçãõ de etanol. *Quim. Nova*. **2012**, 35, 1004-1010.