

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 del CRAI-Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la CRAI-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.”

**Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación, CRAI-Biblioteca
Universidad Santo Tomás, Bucaramanga**

Evaluación del desempeño del pretratamiento con peróxido de hidrógeno sobre mezclas de
biomasas lignocelulosicas (bagazo de caña panelera y hojarasca)

Soleidy Johanna Suárez Forero

Grupo de Investigación en Nuevos Materiales y Energías Alternativas

GINMEA

Trabajo de grado para optar al título de Profesional en Química Ambiental

Olga Lucia Bayona Ayala, Qca. MSc.

Directora del Proyecto

Angélica Maria Candela Soto, Qca. MSc. Ph.D

Codirectora del Proyecto

Universidad Santo Tomás, Bucaramanga

División de ingenierías y arquitectura

Facultad de química ambiental

2017

Dedicatoria

Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.

MAHATMA GANDHI

Dedico mi trabajo a mi familia y a mis padres Domingo Suárez y Margarita forero por su confianza, apoyo y amor sin ustedes nada sería posible.

Agradecimientos

A Dios por ponerme en este camino y permitirme culminar con satisfacción esta etapa.

A mis padres por creer en mí, por enseñarme humildad, esfuerzo y dedicación, por su apoyo amor y comprensión, son el amor de mi vida por quienes lucho a diario.

A mis hermanas, a mi sobrina Sofia para que nunca dejen de luchar por sus sueños y metas. A mi tío Víctor Suarez por sus consejos enseñanzas y apoyo incondicional durante toda mi vida.

A Diego López por su apoyo y motivación.

A mi directora y codirectora Olga Lucia Bayona y Angélica María Candela por su dedicación, confianza, paciencia, y sobre todo por su motivación y calidad humana. Al grupo de investigación de nuevos materiales y energías alternativas GINMEA por permitirme hacer parte de su trabajo de investigación por su tiempo y confianza.

A la universidad Santo Tomás por permitirme terminar mi formación profesional, adquirir conocimiento y financiar mi trabajo de grado vinculado al proyecto Evaluación del desempeño del pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino sobre residuos lignocelulósicos (bagazo de caña panelera-hojarasca) código del proyecto GIFQCAAMP32016

Así mismo expreso mi agradecimiento a todas aquellas personas que hicieron parte de este proceso y contribuyeron para que terminara esta etapa de mi vida.

Tabla de contenido

Introducción	13
1. Planteamiento del problema.....	18
2. Justificación	19
3. Objetivos	21
Objetivo general	21
Objetivos específicos.....	21
4. Marco referencial	22
4.1 Marco teórico.....	22
4.1.1 Biomasa lignocelulosica.....	22
4.1.2 Composición de la biomasa lignocelulosica.	24
4.1.3 Bagazo de caña de azúcar y hojarasca.	27
4.1.4 Producción de caña de azúcar y bioetanol.	30
4.1.5 Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica.....	33
4.1.6 Tipos de pretratamientos	35
4.1.7 Importancia de la etapa de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.	38
4.1.8 Pretratamiento químico con peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).	38
4.1.9 Métodos de análisis.	40
4.2 Marco de antecedentes	41
5. Diseño metodológico	46
5.1 Aspectos generales	47
5.1.1 Materiales y equipos.	48
5.1.2 Reactivos.....	48
5.2 Ensayo de pretratamiento de mezclas de bagazo de caña de azúcar y hojarasca.	48
5.3 Análisis estadístico del diseño experimental	51
5.4 Caracterización de las mezclas de bagazo de caña de azúcar y hojarasca.....	51

5.4.1 Determinación física de humedad y cenizas en biomasa lignocelulósica.	51
5.4.2 Determinación de lignina soluble, insoluble.	53
5.4.3 Difracción de rayos x (DRX).	55
6. Resultados y discusión.....	57
6.1 Caracterización de las mezclas de bagazo de caña de azúcar y hojarasca.....	57
6.1.1 Determinación física del porcentaje de cenizas y humedad en biomasa lignocelulósica natural. 57	
6.1.2 Determinación del porcentaje de lignina soluble e insoluble a la biomasa lignocelulósica natural. 60	
6.1.3 Determinación del índice de cristalinidad por difracción de rayos x (DRX) en biomasa lignocelulósica natural.....	62
6.2 Pretratamiento químico con peróxido de hidrógeno.....	64
6.3 Caracterización de la biomasa pretratada con peróxido de hidrógeno	66
6.4 Determinación del porcentaje de lignina soluble e insoluble a la biomasa lignocelulósica pretratada con peróxido de hidrógeno.	67
6.5 Análisis estadístico mediante el software <i>STATISTIC 7.0</i> del pretratamiento químico con peróxido de hidrógeno	71
6.6 Determinación del índice de cristalinidad por difracción de rayos x (DRX) a la biomasa lignocelulósica pretratada con peróxido de hidrógeno	87
7. Conclusiones.....	90
8. Divulgación de resultados.....	92
9. Bibliografía	93

Lista de tablas

Tabla 1 <i>Composición química de diferentes tipos de biomasa lignocelulosica. (F. A. Santos, 2013).</i>	23
Tabla 2 <i>Procesos de Pretratamiento</i>	37
Tabla 3 <i>Protocolos de metodología experimental.</i>	47
Tabla 4 <i>Equipos.</i>	48
Tabla 5 <i>Rango de valores estudiados en el diseño experimental factorial completo del pretratamiento con peróxido de hidrogeno alcalino.</i>	50
Tabla 6 <i>VARIABLES del diseño experimental.</i>	50
Tabla 7 <i>Rampa de temperatura</i>	52
Tabla 8 <i>Resultados del contenido de humedad y cenizas de la hojarasca.</i>	57
Tabla 9 <i>Resultados del contenido de humedad y cenizas en la mezcla de bagazo de caña de azúcar y hojarasca en proporción (90:10).</i>	58
Tabla 10 <i>Resultados porcentaje de lignina soluble e insoluble.</i>	60
Tabla 11 <i>Resultados del índice de cristalinidad.</i>	62
Tabla 12 <i>Condiciones de reacción.</i>	64
Tabla 13 <i>Rendimiento de reacción del pretratamiento químico con peróxido de hidrogeno.</i>	65
Tabla 14 <i>Porcentaje (%) de lignina soluble e insoluble después de la etapa de pretratamiento.</i>	68
Tabla 15 <i>Remoción de lignina de la biomasa pretratada con peróxido de hidrógeno.</i>	69
Tabla 16 <i>Remoción de lignina total.</i>	71
Tabla 17 <i>Coefficientes de regresión.</i>	73
Tabla 18 <i>Análisis ANOVA.</i>	77
Tabla 19 <i>Porcentaje de índice de cristalinidad.</i>	88

Lista de figuras

<i>Figura 1</i> Emisiones de Dióxido de Carbono.	14
<i>Figura 2</i> Pretratamiento.....	17
<i>Figura 3</i> Estructura y composición del material lignocelulósico. (Eisenhuber, Krennhuber, Steinmüller, & Jäger, 2013) descripción de La composición de la biomasa lignocelulosica.	23
<i>Figura 4</i> Estructura de la celulosa.	25
<i>Figura 5</i> Monómeros componentes de la hemicelulosa,	26
<i>Figura 6</i> Estructura de la lignina.	27
<i>Figura 7</i> Caña de azúcar.	28
<i>Figura 8</i> Bagazo de caña de azúcar.	29
<i>Figura 9</i> Composición química del bagazo de caña de azúcar.....	29
<i>Figura 10</i> Hojarasca.	30
<i>Figura 11</i> Mapa de producción de caña en América latina. (Furtado, n.d.).....	31
<i>Figura 12</i> Producción de caña de azúcar, caña panelera y elaboración de etanol. (F. A. Santos, 2013)-(C, 2011).....	33
<i>Figura 13</i> Diagrama del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica(Behera et al., 2014)	34
<i>Figura 14</i> Biomasa pretratada.	39
<i>Figura 15</i> Diagrama de metodología.....	46
<i>Figura 16</i> Determinación de humedad.	52
<i>Figura 17</i> Determinación de cenizas	53
<i>Figura 18</i> Determinación de lignina insoluble.	54
<i>Figura 19</i> Determinación de lignina soluble.	55
<i>Figura 20</i> Lignina total.....	55
<i>Figura 21</i> Índice de cristalinidad del material lignocelulósico.	56
<i>Figura 22</i> Difractograma de bagazo de caña de azúcar y hojarasca.....	62
<i>Figura 23</i> Gráfico de Pareto	74
<i>Figura 24</i> Superficie de respuesta del porcentaje de remoción de lignina, manteniendo la concentración en el punto central 3% (a), curva de nivel (b).	81
<i>Figura 25</i> Difractograma de ensayos 4 y 10 después del pretratamiento.....	87

Glosario

Etanol: producto de la descomposición o fermentación de azúcares, altamente utilizado en la industria como combustible o aditivo de la gasolina. (Talebnia, Karakashev, & Angelidaki, 2010)

Bagazo de caña de azúcar: subproducto lignocelulósico de la producción agrícola de la caña de azúcar. (Niño López Lilibeth, Acosta Cardenas Alejandro, 2013)

Biomasa lignocelulósica: constituido por tejidos vegetales que se componen de microfibrillas de celulosa que se encuentran recubiertas de hemicelulosa y son compactadas por la lignina dando estructura a la materia vegetal. (D. Fernandes, S. Pereira, L. Serafim, D. Evtuguin, 2012)

Pretratamiento oxidativo: definido como la adición de un agente oxidante como lo es el peróxido de hidrogeno o ácido peracético, a una biomasa lignocelulosica en presencia de agua. (Sánchez Riaño & Gutiérrez Morales, A. I.; Muñoz Hernández, J. A. y Rivera Barrero, 2010)

Energías alternativas: Son todas aquellas energías que se producen naturalmente y no son agotables a escala humana, son principalmente utilizadas para sustituir las energías tradicionales o provenientes de fuentes fósiles. (Merino, n.d.)

Evaluación del desempeño del pretratamiento con peróxido de hidrógeno sobre mezclas de biomásas lignocelulosicas (bagazo de caña panelera y hojarasca)

Por: Soleidy Suárez Forero

Resumen

En esta investigación se evaluó, los cambios en la mezcla de diferentes biomásas lignocelulósicas, luego de ser sometidas a un pretratamiento químico; implementado para aumentar la exposición de la celulosa para su posterior hidrólisis enzimática. El pretratamiento empleado, es el pretratamiento oxidativo con peróxido de hidrógeno (H_2O_2), sobre la mezcla en proporción (90:10) de biomásas lignocelulósicas, como bagazo de caña de azúcar panelera y hojarasca, se realizó con el fin de evaluar el comportamiento de las biomásas cuando están mezcladas, teniendo como referencias los excelentes resultados, cuando es utilizado el bagazo de caña de azúcar con este pretratamiento químico.

Inicialmente la biomasa fue caracterizada para determinar lignina soluble e insoluble, humedad y cenizas, se realizaron análisis de difracción de rayos x (DRX) para determinar el índice de cristalinidad del material lignocelulosico. Se utilizaron concentraciones diluidas de peróxido de hidrógeno, realizando un diseño experimental 2^3 con triplicado en el punto central en los ensayos (2,5,11) y variaciones en el tiempo, la concentración y la temperatura para obtener un aumento en la exposición de la celulosa y mayor solubilización de la lignina. (De & Isabela, n.d.)

Los resultados obtenidos en la etapa de pretratamiento presentan un buen rendimiento de remoción de lignina insoluble de 88,5% con condiciones de reacción a 80 min, 25°C, 7% de peróxido de hidrógeno y un rendimiento de 79,5% de remoción bajo condiciones a 40 min, 25°C, 3% de peróxido de hidrógeno. Para la lignina soluble con 58,8% de remoción y condiciones a 80

min, 25°C, 7% de peróxido de hidrogeno, y un rendimiento de reacción de 61,67% con condiciones de 40 min, 25°C 7% de peróxido de hidrogeno, considerados con alta solubilización de la lignina. El diseño experimental muestra mediante un análisis estadístico con el software *STATISTIC 7.0*

la optimización del proceso para reducir costos y tiempo, identificando de las variables significativas del modelo que fueron tiempo, temperatura y la interacción 1by3 que corresponde al tiempo y la concentración, con un 95% de confianza, se obtuvieron los análisis de varianza y superficies de respuesta, considerando la concentración como una variable no significativa.

PALABRAS CLAVE: bagazo de caña de azúcar, biomasa lignocelulósica, peróxido de hidrogeno, lignina, etanol

Abstract

In this research, the changes in the mixture of different lignocellulosic biomasses were evaluated after being subjected to a chemical pretreatment, implemented to increase the exposure of the cellulose for its subsequent enzymatic hydrolysis. The pretreatment used is the oxidative pretreatment with hydrogen peroxide (H_2O_2), on the mixture in proportion (90:10) of bagasse of sugarcane and litter respectively. , Lignocellulosic biomass mixed was carried out in order to evaluate the behavior, with excellent results as a reference, when the sugar cane bagasse is used with this chemical pretreatment.

The biomass was characterized initially to determine soluble and insoluble lignin, moisture and ashes and crystallinity index of the lignocellulosic material using x-ray diffraction (XRD).

Experimental design 2^3 was realized using different concentrations of hydrogen peroxide, times and temperature, with triplicate at the center point in the trials (2, 5, and 11) to obtain an increase in the exposure of the Cellulose and greater solubilization of lignin. The results obtained in the pretreatment stage show a good removal of insoluble lignin with a performance of 88.5% with reaction conditions of 80 min, 25 ° C, 7% of hydrogen peroxide and 79.5% % under conditions of 40 min, 25 ° C, 3% of hydrogen peroxide. For soluble lignin with 58.8% removal and conditions of 80 min, 25 ° C, 7% of hydrogen peroxide and 61.67% with conditions of 40 min, 25 ° C, 7% of hydrogen peroxide considered with high solubilization of lignin. The experimental design shows the optimization of the process to reduce costs and time by identifying the significant variables of the model (time, temperature and interaction 1by3) with 95% confidence by means of statistical analysis with the STATISTIC 7.0 software. Analysis of variance and response surfaces, considering the concentration as a non-significant variable

KEYWORDS: sugarcane bagasse, lignocellulosic biomass, hydrogen peroxide, lignin, ethanol

Introducción

En el transcurso de los años la explotación de los combustibles fósiles ha incrementado significativamente, presentando un aumento en la demanda y baja disponibilidad futura de este material energético. (Álvarez, C. (2009). Biocombustibles)

Según la agencia internacional de energía (AIE), las emisiones de CO₂ que se emiten a la atmosfera, son procedentes un 44 % de emisiones de carbón, 36% de petróleo y el 20 % son emisiones de gas natural. (Da & Lignocelulósica, 2012)

El mayor número de emisiones de CO₂ en la atmósfera a nivel mundial son aquellos que se producen de actividades como el transporte y electricidad.(D. En & Qu, 2015) La figura 1 presenta el porcentaje de emisiones de CO₂ a la atmosfera producida por diferentes fuentes de emisión.

La agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA) para el año 2014 reporta una concentración de dióxido de carbono de 81% sobre el total de emisiones de Gases de efecto invernadero.

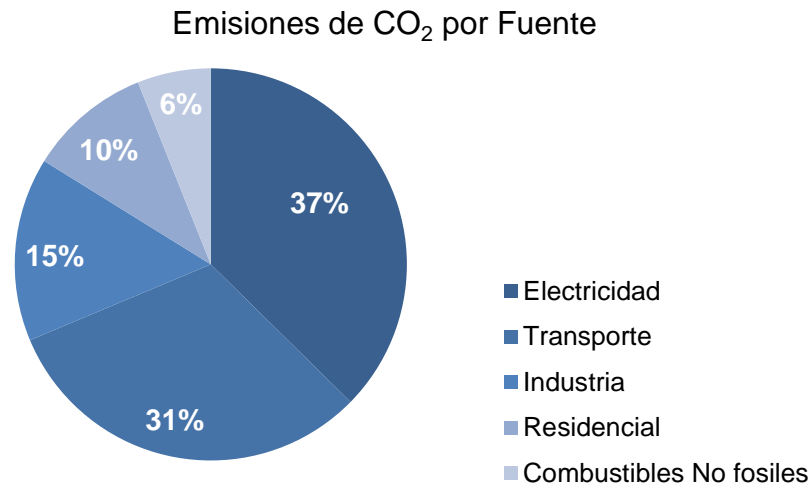


Figura 1 Emisiones de Dióxido de Carbono.

Adaptada de: (Aguilar Rivera, 2008)

Además de esto anualmente se producen numerosas cantidades de residuos agroindustriales y vegetales, que son desechados generando contaminación, en fuentes hídricas, en suelos y pérdida de valor agregado a un residuo sólido. (Aguilar Rivera, 2008)

Como preservación de fuentes energéticas y mitigación del impacto ambiental que generan los combustibles fósiles, se han implementado fuentes alternativas de energía, a partir de las materias primas naturales y renovables, llamadas biocombustibles, como lo es el bioetanol. (Maria & Valencia, 2011)

El bioetanol es generado a partir de material celulósico, pero se busca implementar metodologías de investigación y desarrollo mundial, para la producción de bioetanol, de fuentes vegetales que no generen una competencia con los insumos alimenticios, utilizando como materia prima residuos agroindustriales. (Sánchez Riaño & Gutiérrez Morales, A. I.; Muñoz Hernández, J. A. y Rivera Barrero, 2010)

Existen tres tipos de etanol de primera, segunda y tercera generación dependiendo de su metodología de obtención. El etanol de segunda generación (2G) es un etanol obtenido de los desechos agroindustriales el cual no compite con la producción alimenticia a diferencia del etanol de primera generación (1G), el cual es procedente de plantas y vegetales alimenticios. El etanol de tercera generación (3G), se obtiene de insumos vegetales no alimenticios y de rápido crecimiento como pastos, algas y algunos árboles. (Álvarez, 2009)

Los subproductos agrícolas son también conocidos como biomasa lignocelulósicas, debido a su composición físico química y a su estructura de polímeros celulósicos y hemicelulósicos. (Sánchez Riaño & Gutiérrez Morales, A. I.; Muñoz Hernández, J. A. y Rivera Barrero, 2010)

La biomasa lignocelulosa es el componente mayoritario de la corteza terrestre, se encuentra en materiales vegetales como, el bagazo de caña de azúcar, maderas, cascarilla de café, raquis de palma, cascara de plátano, aserrín, hojarasca, pericarpio de maracuyá, cascara de yuca, y otros residuos vegetales. (D. Fernandes, S. Pereira, L. Serafim, D. Evtuguin, 2012)

La caña de azúcar es una biomasa lignocelulósica abundante, que se compone principalmente de agua y azúcares, es ampliamente utilizada en la industria azucarera, panelera y actualmente en la producción de biocombustibles, además de ser un productor potencial de residuos agroindustriales como el bagazo de caña de azúcar. Las ventajas del bagazo de caña de azúcar como productor de bioetanol, es que es una materia prima previamente molida y procesada, está disponible en grandes cantidades y su costo es mínimo. (Hidrólise, 2010)

En diferentes países de Latinoamérica (Brasil, Argentina, Colombia) se produce bioetanol. Colombia empezó a producir bioetanol en el año 2011, bajo la ley 693 la cual hace obligatoria la adición de etanol a la gasolina, en proporción de un 10% para las ciudades con mayor número de habitantes. (Naik, Goud, Rout, & Dalai, 2010)

Actualmente Colombia cubre un 70% de la demanda en producción de etanol obteniendo 1,1 millones de litros diarios, a partir de la caña de azúcar a nivel nacional. (Maria & Valencia, 2011) La producción de etanol a partir de biomasa lignocelulosica como el bagazo de caña de azúcar panelera, se divide en cinco etapas, la caracterización del material, el pretratamiento, la hidrólisis, la fermentación y finalmente separación del alcohol. (Maria & Valencia, 2011)

La etapa más importante en la producción de bioetanol, es la evaluación de pretratamientos, el cual permite el aumento de la accesibilidad de la celulosa, deslignificación, eliminación de hemicelulosa, y disminución de la cristalinidad de la celulosa, también maximizar el rendimiento de azúcar y disminuir la formación de compuestos inhibidores en la etapa de hidrolisis y fermentación. (Sánchez Riaño & Gutiérrez Morales, A. I.; Muñoz Hernández, J. A. y Rivera Barrero, 2010)

Los pretratamientos pueden ser físicos, químicos, biológicos o una mezcla de ellos. (Taherzadeh & Karimi, 2007) Los pretratamientos oxidativos tienen como objetivo acelerar la hidrolisis enzimática y biodegradación del material, además de disolver los componentes de la matriz lignocelulósica. (Hidrólise, 2010)

Un pretratamiento de bajo costo y alta remoción de lignina, es el pretratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que se implementó en esta investigación, el cual produce el rompimiento de las paredes de lignina que conforman la capa exterior del material lignocelulósico de la biomasa, y produce un aumento de la accesibilidad de celulosa para un posterior ataque enzimático. (Su et al., 2015)

La figura 2 ilustra la estructura del material lignocelulósico antes y después de la etapa de pretratamiento junto con sus componentes.

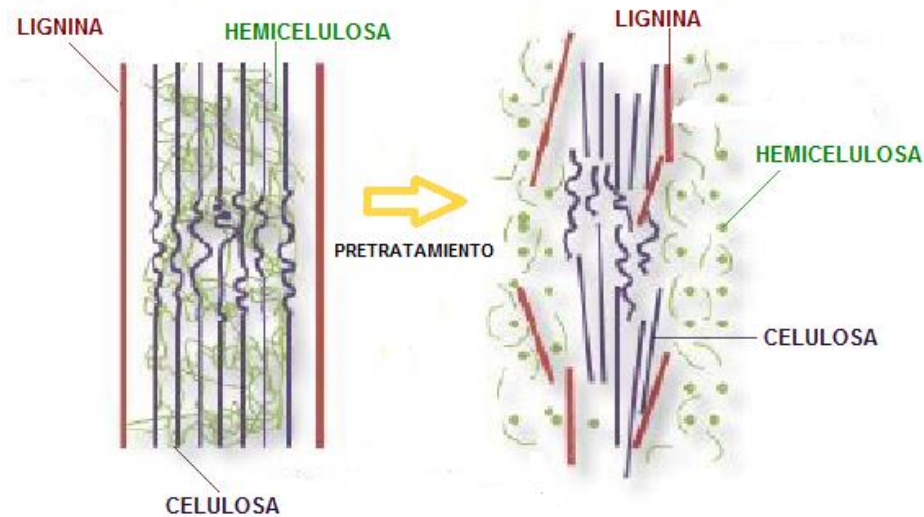


Figura 2 Pretratamiento.

Tomado de: (Sarita Cândido Rabelo, 2007)

En la figura 2 se muestra los cambios morfológicos que sufre el material lignocelulósico después de la etapa de pretratamiento, inicialmente la celulosa se encuentra cubierta de hemicelulosa y la barrera de lignina lo que impide el ataque enzimático, el pretratamiento con peróxido de hidrogeno alcalino (H_2O_2) rompe las paredes de lignina solubilizándola, lo que hace accesible la celulosa.

En este contexto, el objetivo general de esta investigación fue pretratar mediante métodos químicos mezclas de material lignocelulósico que permitieran un mayor rendimiento en la eliminación de la lignina y disminución de la cristalinidad realizando ensayos bajo un diseño experimental 2^3 con triplicado en el punto central. (Niño López Lilibeth, Acosta Cardenas Alejandro, 2013)

1. Planteamiento del problema

La incapacidad que presentan los sistemas energéticos fósiles es reflejada en el costo de la producción de gasolina y extracción de petróleo, se presenta un aumento de demanda y una baja disponibilidad futura de estas materias energéticas. Los combustibles fósiles son fuentes agotables de energía que a futuro su uso será muy limitado, además de la problemática ambiental que conlleva el uso de combustibles como el petróleo y la gasolina; ya que son los principales productores de los agentes contaminantes como los gases de efecto invernadero y además su explotación genera contaminación hídrica y de suelos. (Andrea & Buttiglione, 2012)

La producción de bioetanol otorga beneficios ambientales económicos y sociales como generación de empleos formales, reduce la dependencia y preserva las fuentes energéticas no renovables, mitiga el impacto de las emisiones de CO₂ y gases de efecto invernadero. Estadísticamente se conoce que por cada kilogramo quemado de Petróleo son emitidos a la atmosfera 7,1 kilogramos de CO₂ a diferencia que por cada kilogramo de bioetanol quemado se emiten solo 0,9 kilogramos de CO₂. (Asocaña, 2014)

Esta investigación propone una alternativa de uso energético, como mitigante a la alta producción de combustibles fósiles, evaluando el desempeño de un pretratamiento que permita la obtención de un mayor rendimiento de celulosa a partir de mezclas de biomasa lignocelulósicas como bagazo de caña panelero, y hojarasca, Para aumentar la disponibilidad de la celulosa en la etapa de la hidrólisis enzimática, etapa que no será evaluada en esta investigación. (Aguilar Rivera, 2008)

2. Justificación

Desde el siglo XX se ha buscado la implementación de los residuos agroindustriales en nuevos productos que otorguen un valor agregado al desecho y mitiguen la contaminación que genera su disposición final. Las características de los residuos agroindustriales varían dependiendo de la naturaleza de la materia prima y el tratamiento de la actividad que los genera, están principalmente constituidos de materia orgánica (celulosa, hemicelulosa, lignina, pectinas). (Saval, Ingeniería, & Universitaria, n.d.)

Actualmente se busca implementar tecnologías de desarrollo para el uso de residuos agroindustriales en actividades como, producción de bioenergéticas (bioetanol, biodiesel, biohidrogeno, biogás), producción de compostaje para acondicionadores de suelos y como suplemento alimenticio para animales. (Saval et al., n.d.)

Como una alternativa a fuentes de energía a partir de combustibles fósiles, se puede aprovechar el uso de los residuos agroindustriales en la producción de energías renovables como el bioetanol.

Los estudios realizados en Colombia para la producción de etanol celulósico se basan principalmente en la obtención de etanol a partir de material lignocelulósico, siendo Colombia un país biodiverso permite obtener diferentes biomásas lignocelulósicas como lo son el bagazo de caña de azúcar, cascarilla de café, bagazo de fique, raquis de palma, residuo de banano, cascarilla de arroz, entre otros. Lo que se busca determinar son condiciones favorables que permitan maximizar la producción de etanol a partir de fuentes biodegradables. (Álvarez, 2009)

Los biocombustibles se pueden considerar como una reserva energética que puede ser muy útil en crisis petrolera, la producción de etanol celulósico radica en cinco etapas, la

caracterización del material lignocelulósico, el pretratamiento, la hidrólisis enzimática, la fermentación y la destilación del etanol. La importancia del pretratamiento del material lignocelulósico es buscar la obtención de celulosa para realizar procesos de hidrólisis y fermentación, de esta manera los pretratamientos juegan un papel fundamental en el proceso ya que permiten la remoción de la lignina y hemicelulosa aislando la celulosa que será tratada en el posterior proceso. (Behera, Arora, Nandhagopal, & Kumar, 2014)

Se desea contribuir al campo de la investigación y de la industria dada la necesidad de aumentar el uso de fuentes renovables para la producción de energía, evaluando el desempeño del pretratamiento oxidativo con peróxido de hidrogeno, y utilizando como biomasa el bagazo de caña panelera y la hojarasca.

Se escoge el bagazo de caña panelera debido a la amplia producción en la zona de Santander y la hojarasca de la universidad Santo Tomas, con lo que se busca reducir la disposición de residuos sólidos en la universidad y en el sector panelero otorgando un valor agregado a los desechos y obtener un combustible alternativo a los combustibles fósiles.

3. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el desempeño del pretratamiento con peróxido de hidrógeno sobre la remoción de la lignina aplicada a la mezcla de biombras lignocelulósicas, (Bagazo de caña panelera, y hojarasca) utilizando un diseño experimental 2^3 con triplicado en el punto central.

Objetivos específicos

Evaluar la influencia de variables como tiempo, temperatura y concentración de reactivos del pretratamiento realizando un diseño de experimentos 2^3 con triplicado en el punto central.

Caracterizar las biombras antes y después del pretratamiento determinando la composición de lignina para calcular los porcentajes de remoción de la misma luego de realizar el pretratamiento, en una única mezcla en relación 90:10 (bagazo de caña, hojarasca).

Encontrar las mejores condiciones de pretratamiento para la solubilización de lignina, mediante el análisis estadístico de los resultados utilizando el software *STATISTIC 7.0*

4. Marco referencial

4.1 Marco teórico

Desde mediados de los años 80s se ha buscado implementar biocombustibles que mitiguen el impacto ambiental que genera la combustión de hidrocarburos especialmente las emisiones a la atmósfera, los avances tecnológicos han permitido la investigación e implementación de bioetanol a partir de material lignocelulósico el cual debe sufrir un proceso y transformación previo a su fermentación. (Harmsen, Huigen, López, & Bakker, 2010)

4.1.1 Biomasa lignocelulosica. El termino biomasa lignocelulósica hace referencia a un recurso renovable proveniente de la materia vegetal, elaborado del proceso fotosintético de las plantas, que está constituido principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina en la pared vegetal, como se indica en la figura 3.(Aditiya et al., 2015) Otros compuestos presentes en la biomasa lignocelulósica son los extractivos, cenizas, ácidos grasos, proteínas y almidones.(Ricardo, Oliveira, & Sp, 2012) Dependiendo del tipo de planta se determina la composición química del material lignocelulósico, como se muestra en la tabla 1 (F. A. Santos, 2013)

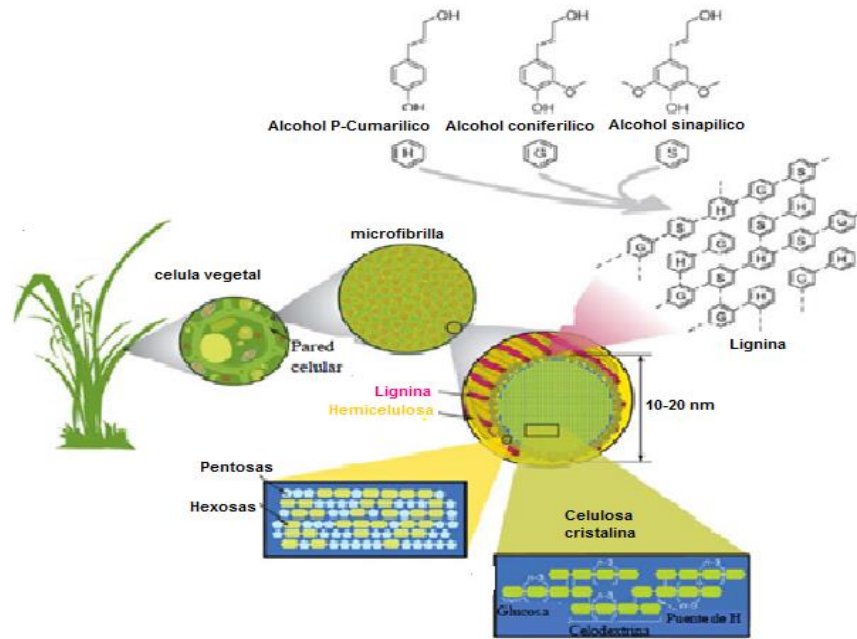


Figura 3 Estructura y composición del material lignocelulósico. (Eisenhuber, Krennhuber, Steinmüller, & Jäger, 2013) descripción de La composición de la biomasa lignocelulosica.

Tabla 1 Composición química de diferentes tipos de biomasa lignocelulosica. (F. A. Santos, 2013).

Biomasa	% Celulosa	% Hemicelulosa	% Lignina
lignocelulosica			
Palma de caña	40-44	30-32	22-25
Bagazo de caña	32-48	19-24	23-32
Madera dura	43-47	25-35	16-24

Tabla 2 (Continuación)

Madera blanda	40-44	25-29	25-31
Tallo de maíz	35	25	35
Espiga de maíz	45	35	15
Algodón	95	2	0,3
Palma de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palma de arroz	43,3	26,4	16,3
Forraje de maíz	38-40	28	7-21
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Palma bananera	60-65	6-8	5-10
Palma de cebada	31-45	27-38	14-19

La biomasa lignocelulósica ha sido utilizada en la elaboración de papel, telas y actualmente se emplea como materia prima en la producción de biocombustibles. (Ricardo et al., 2012)

4.1.2 Composición de la biomasa lignocelulosica.

4.1.2.1 Celulosa. La celulosa es el polisacárido más abundante de la corteza terrestre, el cual consta de un polímero formado por monómeros de glucosa unido por enlaces en el carbono 1 y en el carbono 4 por medio de una unión β , estas microfibrillas se encuentran cubiertas por hemicelulosa y lignina. (“Producción de etanol de segunda generación a partir de paja de trigo : hongos , enzimas fúngicas y aplicaciones Tesis Doctoral Davinia Salvachúa Rodríguez,” 2013)

La figura 4 presenta la estructura de la celulosa con sus monómeros de glucosa.

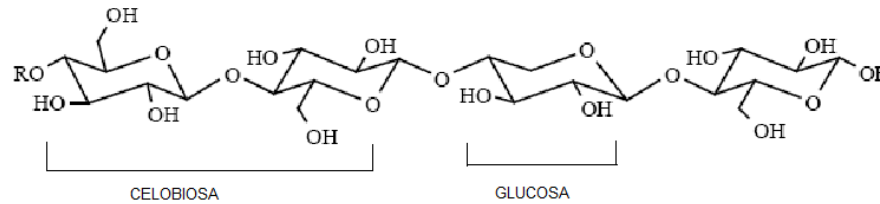


Figura 4 Estructura de la celulosa.

Tomado de: (Para, Enzimática, & Etanol, 2012)

La celulosa se encuentra en estado cristalino y amorfo. (“Producción de etanol de segunda generación a partir de paja de trigo : hongos , enzimas fúngicas y aplicaciones Tesis Doctoral Davinia Salvachúa Rodríguez,” 2013) La mayor parte de la celulosa se encuentra en estado amorfo en forma de cadenas, expuestas en la parte superficial de la estructura y la celulosa cristalina se encuentra en el núcleo en menor cantidad. (M. En & Energética, 2015).

La degradación de la celulosa cristalina es mucho más lenta que la celulosa amorfa debido a que su empaquetamiento no permite una mayor exposición a agentes químicos. (“Producción de etanol de segunda generación ,Tesis Doctoral Davinia Salvachúa Rodríguez,” 2013)

Hemicelulosa. La hemicelulosa es un polisacárido estructural con grupos heterogéneos formado por la unión de diferentes polímeros como las pentosas (xilosa, arabinosa) hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y los ácidos uránicos (ácido glucouránico, ácido galactouránico) como se observan en la figura 5.

La hemicelulosa presenta una estructura de ramificaciones la cual le permite acoplarse a la celulosa y a la lignina produciendo la rigidez del material vegetal. (Production, n.d.)

La hemicelulosa también está presente en la pared vegetal.(Sarita C. Rabelo, Andrade, Maciel Filho, & Costa, 2014) Dependiendo del tipo de material lignocelulósico se obtiene el contenido de hemicelulosa, para material vegetal como la paja y cereales presentan un contenido de 30-

40% de hemicelulosa y para residuos agrícolas como el bagazo de caña de azúcar contienen entre 40 y 50 % de hemicelulosa. (Prinsen, n.d.)

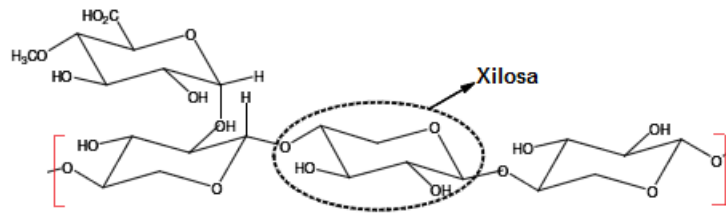


Figura 5 Monómeros componentes de la hemicelulosa,

Tomado de: (F. A. Santos, 2013)

4.1.2.3 Lignina. La lignina es una macromolécula aromática constituida por fenilpropano, amorfa y globular que constituye un 20-35% del contenido de biomasa lignocelulosa. La lignina está formada principalmente de alcoholes cumarílicos (alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico, alcohol sinapílico). La figura 6 presenta la estructura de la lignina. (Sarita C. Rabelo et al., 2014)

Según la taxonomía de la planta se presentan lignina de de tipo ginospermas tipo G (guayacilpropanos), angiospermas leñosas tipo GS (sinrigilpropano), angiospermas herbáceas tipo HGS (P Hidroxifenil propano). (E. En & Marco, 2010). La función de la lignina es darle estructura impermeabilidad y defensa de ataques microbianos a las plantas y mantener unidas las fibras celulósicas. (Sarita C. Rabelo et al., 2014)

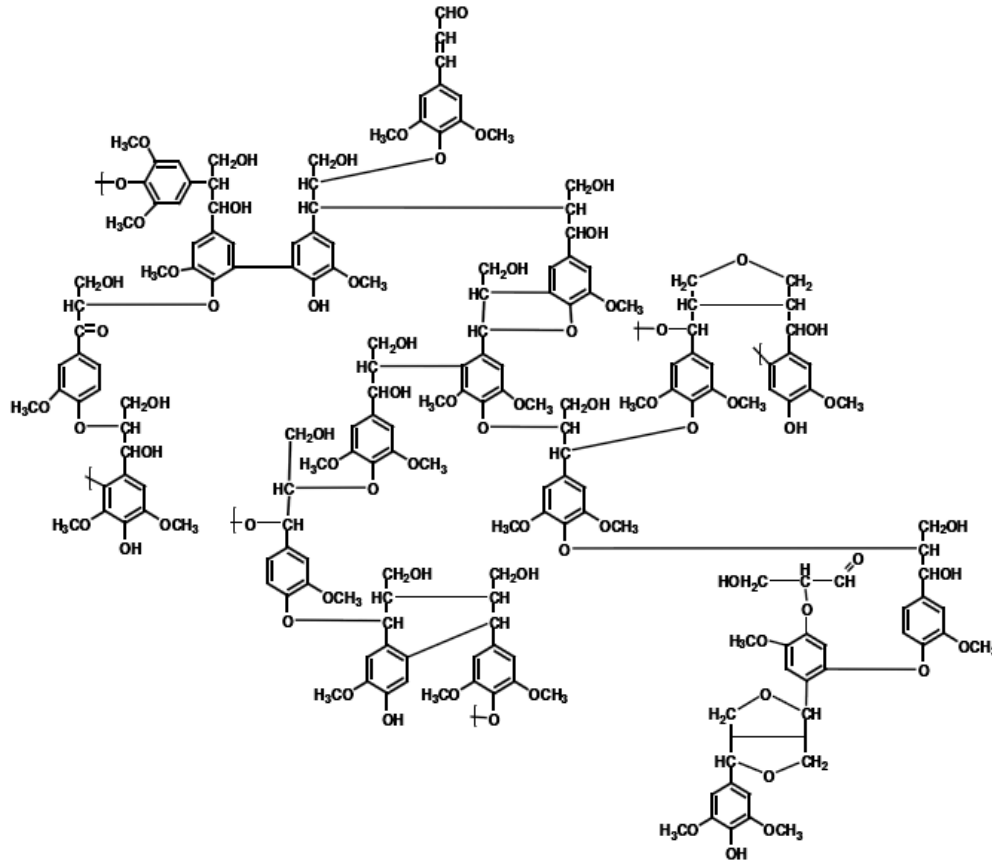


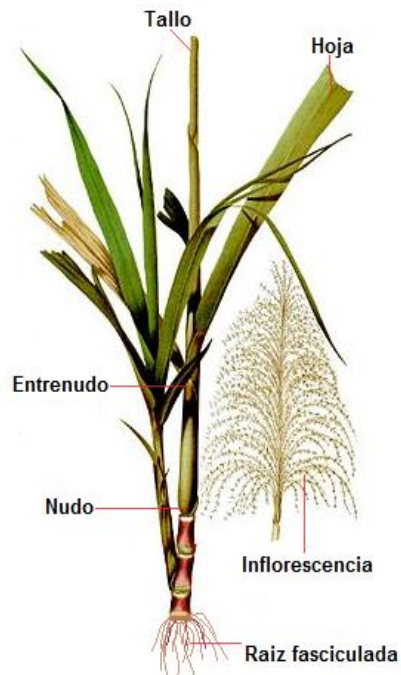
Figura 6 Estructura de la lignina.

Tomado de: (F. A. Santos, 2013)

4.1.3 Bagazo de caña de azúcar y hojarasca.

La planta de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es perteneciente a la familia de las angiospermas, Poaceae, está compuesta de doce especies gramínea tropical, conocida como un pasto gigante, de tallo grueso en el cual se acumula un jugo con alta concentración de sacarosa. (Lizandro & Montejó, 2002)

La caña de azúcar es utilizada en su totalidad para elaboración de licores, alimento de animales y obtención de azúcar, sus desechos agroindustriales se utilizan en obtención de biocombustibles y alimento de animales. (Las, Ambiental, Ambiental, Aut, & El, n.d.)



La figura 7 presenta la estructura taxonómica de la planta de caña de azúcar.

Figura 7 Caña de azúcar.

Tomado de: (Sarita Cândido Rabelo, 2007)

Anualmente se generan grandes cantidades de desechos sólidos, de las actividades agrícolas, como lo es el bagazo de caña de azúcar, estos desechos ocasionan pérdidas de fuentes potenciales de alto valor agregado, y generan contaminación ambiental. La figura 8 muestra bagazo de caña de azúcar.

(“Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’ Aspectos da emergência, crescimento inicial e suscetibilidade a herbicidas utilizados em cana-de-açúcar de,” 2011)



Figura 8 Bagazo de caña de azúcar.

Tomado de: (“Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’ Aspectos da emergência, crescimento inicial e suscetibilidade a herbicidas utilizados em cana-de-açúcar de,” 2011)

El bagazo de caña de azúcar representa un 25% del material procesado, el cual se usa como materia prima en la obtención del etanol, debido a su alto contenido de celulosa.(Maria & Valencia, 2011)

En la figura 9 se presenta en contenido químico del material lignocelulósico del bagazo de caña de azúcar.

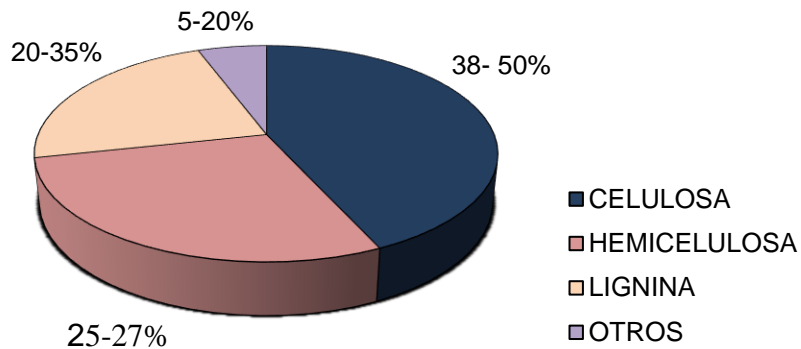


Figura 9 Composición química del bagazo de caña de azúcar.

Tomado de: (Sarita Cândido Rabelo, 2007)

La hojarasca se obtendrá de los desechos naturales que producen los árboles en su proceso fotosintético, las hojas se tomarán de caída natural después de cumplir su ciclo y antes de su

descomposición, lo que permite evaluar la capacidad de producción del residuo sólido y otorgar un valor agregado al mismo.



Figura 10 Hojarasca.

La figura 10 presenta el lugar de disposición final y almacenamiento de la hojarasca en la universidad Santo Tomas y la muestra recolectada para la investigación antes de la etapa de pretratamiento y molienda.

4.1.4 Producción de caña de azúcar y bioetanol.

La caña de azúcar como un cultivo tropical, es el insumo potencialmente más alto para la producción de bioetanol. (“Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar FICHA TÉCNICA DEL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L .) Publicación Enero 2015,” 2015) En América latina se presenta una alta producción de caña de azúcar principalmente en Brasil quien actualmente dispone estos cultivos para la producción de biocombustibles, en la figura 11 se muestran los porcentajes de producción de caña de azúcar en América latina. (Furtado, n.d.)

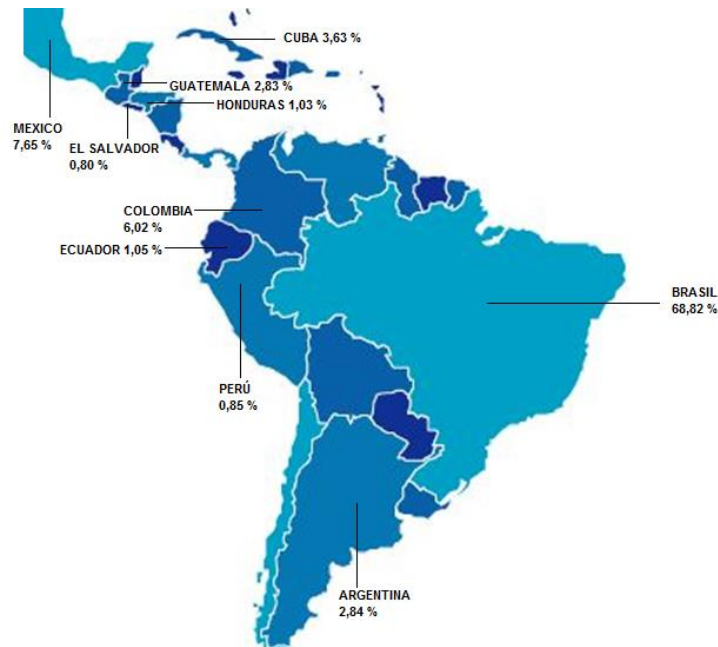


Figura 11 Mapa de producción de caña en América latina. (Furtado, n.d.)

Adaptado de: Raciél Pérez Martínez <http://granmenses.blogspot.com.co/2012/06/ideario-independentista-de-america.html>.

En Colombia el cultivo de caña se produce en 25 departamentos y 511 municipios del país, siendo la segunda actividad económica más importante después del cultivo de café.¹² En la región del valle del cauca, se encuentran sembradas 225.560 hectáreas de caña y se producen al año aproximadamente 21,56 millones de toneladas de caña. Del total de cultivos de caña de azúcar el 61% es destinado para la elaboración de panela, el 32% para azúcar y el 7% para producción de mieles y forrajes.¹² en la figura 12 se ilustra los departamentos productores de caña de azúcar, caña panela en Colombia. (F. A. Santos, 2013)

El departamento de Santander es el tercer productor de caña de azúcar después de Cundinamarca y Antioquia, en la hoya del río Suárez se estima una producción anual de 45.000 y 60.000 hectáreas de caña. (Cultivo & Ca, 2004)

Actualmente en los países de América latina y Caribe se están implementando programas de producción de biocombustibles, los principales productores de biocombustibles son Brasil, Argentina y Colombia, según la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL) en América latina se producen cerca de 2,3 billones de litros de bioetanol. (*América Latina y el Caribe*, n.d.)

En Colombia se produce alcohol carburante, proveniente de los cultivos de caña de azúcar principalmente, se estima que al día se producen 1,1 millones de litros de etanol los cuales cubren el 70% de la demanda nacional. (C, 2011) En el año 2012 se produjeron 365 millones de litros de etanol provenientes de cultivos de caña de azúcar. (Energ & Residual, n.d.)

Los principales productores de etanol son los ingenios azucareros como; Incauca, ingenio Providencia, Manuelita, Mayagüez, ingenio Risaralda y GPC en la figura 12 se presenta un mapa con las regiones productoras de etanol y los litros producidos al día. (C, 2011)

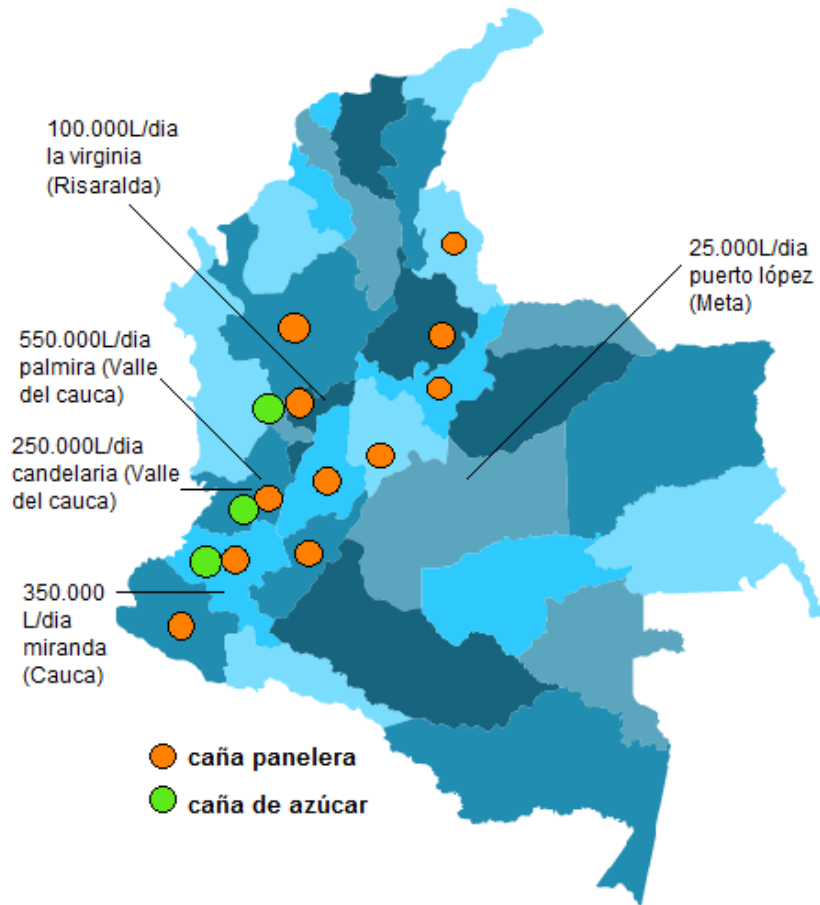


Figura 12 Producción de caña de azúcar, caña panelera y elaboración de etanol. (F. A. Santos, 2013)(C, 2011)

Adaptado de: Mauricio Hernández <http://www.uxabilidad.com/recursos/mapa-politico-de-colombia-en-vectores.html>.

4.1.5 Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica. Existen múltiples pretratamientos que se han realizado al material lignocelulósico a través de los años, con el objetivo de separar el componente principal que es la celulosa de la lignina y la hemicelulosa, y romper la estructura cristalina de la celulosa. los pretratamientos son de diferente naturaleza químicos, físicos, físicos-químicos y biológicos. (Eisenhuber et al., 2013).

En la figura 13 se presenta el proceso de transformación que sufre el material lignocelulósico al ser pretratado y la deformación de su estructura básica debido a los diferentes pretratamientos mencionados anteriormente. (Behera et al., 2014)

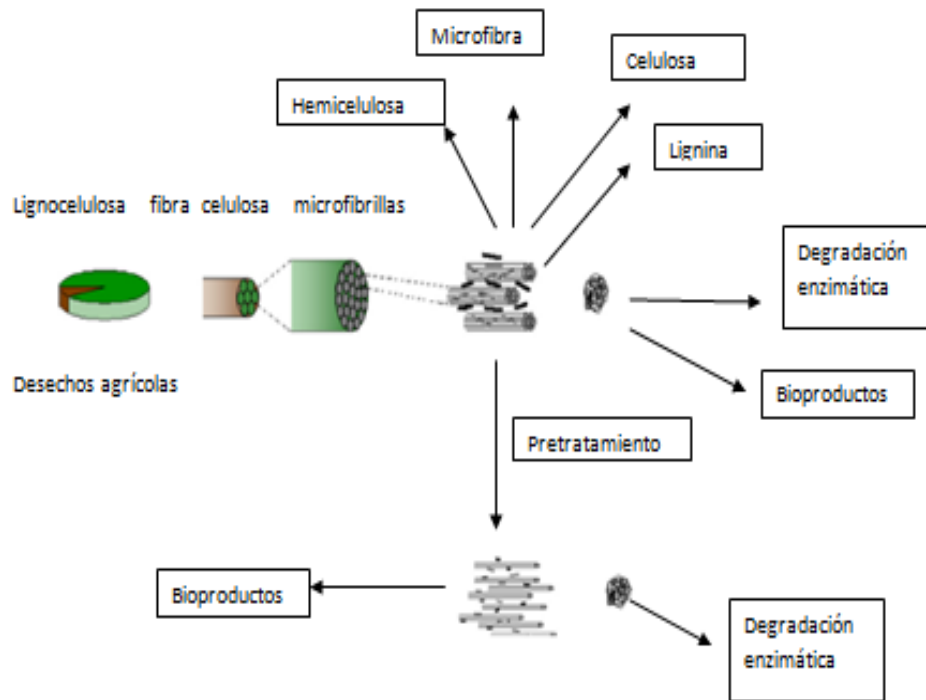


Figura 13 Diagrama del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica(Behera et al., 2014)

Tomado de: Importance of Chemical Pretreatment for Bioconversion of Lignocellulosic Biomass. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2014, 36, 91–106.

Como se observa en la figura 13 la biomasa sufre una fragmentación de la lignina y hemicelulosa después de la etapa de pretratamiento, también se presentan bioproductos o subproductos formados por la deslignificación del material lignoceluloso.

4.1.6 Tipos de pretratamientos

4.1.6.1 Pretratamientos físicos. Los pretratamientos físicos se utilizan principalmente para la disminución del tamaño de partícula por medio de la fragmentación trituración y molienda buscando una mayor digestibilidad del material. Son mecánicos y son de gran utilidad en la remoción de lignina pero; estos requieren mucha más energía aunque no es necesario el uso de agentes químicos, algunos de los pretratamientos físicos son la molienda de la biomasa, explosión a vapor, irradiación de rayos Gamma, microondas, ultrasonido, plasma. (Roberto & Boscolo, 2013)

4.1.6.2 Pretratamientos químicos. Los pretratamientos químicos consisten en la biodegradabilidad de la celulosa a partir de la eliminación de la lignina y la hemicelulosa, son pretratamientos mucho más invasivos debido a que pueden degradar totalmente el material lignoceluloso, estos pretratamientos emplean el uso de agentes químicos como los alcalinos (Hidróxido de sodio NaOH, hidróxido de calcio, Ca(OH)_2 , hidróxido de potasio KOH, amoníaco acuoso, Amonio, sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), los ácidos (ácido sulfúrico H_2SO_4 , ácido clorhídrico HCL, ácido fosfórico H_3PO_4 .) los agentes oxidantes (peróxido de hidrógeno H_2O_2 , ozonólisis O_2), algunos solventes (etanol $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, benceno C_6H_6 , etilenglicol $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$). (Schneiderman, Johnson, Menkhaus, & Gilcrease, 2015)

4.1.6.3 Pretratamientos fisicoquímicos. Los pretratamientos físico-químicos buscan la solubilización de los componentes de la biomasa con variaciones de temperatura, concentraciones, pH y contenido de humedad. (“Producción de etanol de segunda generación a partir de paja de trigo: hongos , enzimas fúngicas y aplicaciones Tesis Doctoral Davinia Salvachúa Rodríguez,” 2013). Algunos de los pretratamientos son; explosión de fibra de amoníaco o AFEX, explosión por CO₂, explosión por SO₂, un pretratamiento hidrotérmico el cual utiliza agua a altas presiones y altas temperaturas .(Tahezadeh & Karimi, 2007)

4.1.6.4 Pretratamientos biológicos. El pretratamiento biológico es muy útil requiere poca energía, reduce la formación de agentes tóxicos, pero es un método muy costoso, en el pretratamiento biológico se incluyen microorganismos como los hongos, bacterias y algunos biosolventes orgánicos. Este pretratamiento es muy lento y se puede degradar material

lignocelulósico como la celulosa y hemicelulosa obteniendo un bajo rendimiento en la celulosa fermentable. (S.C. Rabelo, Amezquita Fonseca, Andrade, Maciel Filho, & Costa, 2011)

La tabla 2 presenta un resumen de los tipos de pretratamiento sobre biomasa lignocelulósica, ventajas y desventajas del proceso de pretratamiento (F. A. Santos, 2013) (Eisenhuber et al., 2013)

Tabla 2 *Procesos de Pretratamiento.*

PRETRATAMIENTOS FISICOS			
METODO	PROCESO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Molienda	Por bolas	Aumentan el área	Requiere de un alto
	Coloidal	superficial accesible y	consumo energético,
Irradiación	Por compresión	tamaño de poros.	remueven poca biomasa,
	Vibratoria	Disminución de la	no son métodos
	Rayos gama	crystalinidad de la	indicados para
	Electrones	celulosa, disminución de	aplicaciones
	Ultrasonido	la polimerización,	industriales,
	Microondas	deslignificación.	económicamente no son viables.
PRETRATAMIENTOS FISICO-QUIMICOS			
METODO	PROCESO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Explosión o craqueo	AFEX	Estos métodos son entre	Generan inhibidores que
	CO ₂	los más efectivos y	afectan el proceso de
	SO ₂	presentan procesos más aplicables a la industria.	fermentación, solo es aplicable en materiales
		Generalmente producen un tratamiento rápido.	con un contenido de lignina de 15%,
		Necesitan condiciones óptimas y utilización de reactivos químicos.	requieren la recuperación de amoniaco.
PRETRATAMIENTOS QUIMICOS			
METODO	PROCESO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Alcalino	Hidróxido de sodio	Aumenta el área	Los ácidos presentan
	Amoniaco	superficial accesible.	efectos corrosivos, se
Ácido	Sulfito de amonio	Deslignificación parcial o	debe realizar
	Sulfúrico	completa. Disminuye la	neutralización antes de
	Fosfórico	crystalinidad de la	la etapa fermentativa, se
Gas	Dióxido de cloro	celulosa. Disminuye la	generan compuestos
	Dióxido de nitrógeno	polimerización. Hidroliza	inhibidores.
	Dióxido de azufre	parcial o completamente	
Oxidativos	Peróxido de hidrogeno	la celulosa.	
	Ozonolisis		

Tabla 2 (Continuación)

Solventes	Etanol-Agua		
	Etilenglicol		
PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS			
METODO	PROCESO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Biológico	Hongos	Requieren condiciones ambientales, no se generan subproductos, no requiere consumo energético.	La hidrólisis del material es muy lenta.

Nota: Tomado de: (F. A. Santos, 2013) (Eisenhuber et al., 2013)

4.1.7 Importancia de la etapa de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica. Son de gran utilidad en el proceso de obtención de etanol debido a que facilitan la hidrólisis enzimática, los pretratamientos alteran la estructura cristalina de la biomasa lignocelulósica, permiten el aumento del área superficial y porosidad de la biomasa, la eliminación de la lignina, polimerizan y eliminan la hemicelulosa, Investigaciones recientes han demostrado claramente que hay una correlación directa entre la eliminación de la lignina y la digestibilidad de la celulosa, planteado bajo diseños experimentales de los cuales se obtienen resultados de deslignificación, bajo condiciones de temperatura concentración del agente químico y tiempo. (da Costa, Marques Jr, Gonçalves, & Rocha, 2015)

4.1.8 Pretratamiento químico con peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Uno de los pretratamientos químicos más utilizados en la industria de biocombustibles son los agentes oxidantes con peróxido de hidrógeno, el cual es usado como un agente blanqueador, su rendimiento es óptimo sin generar desechos ya que estos son descompuestos en oxígeno y agua,

no se reporta la formación de productos secundarios tóxicos y se obtiene una alta remoción de la lignina del material lignocelulósico. (Behera et al., 2014)

Para evaluar los pretratamientos con peróxido de hidrógeno es necesario tener en cuenta factores como la concentración, el tiempo, el pH y la temperatura.(Cárdenas-lailhacar et al., 2012) Múltiples investigaciones realizadas en el mundo en la etapa del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, se realizan mediante un planteamiento factorial con diferentes variables de estudio, en las que se evidencian altos porcentajes de deslignificación.(Sulaiman, Ajit, Yunus, & Chisti, 2011) Los pretratamientos con peróxido de hidrógeno permiten una alta digestibilidad de la celulosa, producen cantidades insignificantes de subproductos derivados de lignina, tienen baja demanda energética y bajos costos. (Para et al., 2012)

La figura 14 muestra la biomasa lignocelulosica del bagazo de caña panelera y hojarasca durante el proceso de pretratamiento con peróxido de hidrogeno.



Figura 14 Biomasa pretratada.

Lo que se busca evaluar e innovar en esta investigación es la deslignificación del material lignocelulósico y así permitir el aumento de la celulosa a partir de mezclas de material (bagazo de caña de azúcar panelera y hojarasca), mediante un pretratamiento oxidativo con peróxido de hidrógeno.

4.1.9 Métodos de análisis.

4.1.9.1 Difracción de rayos x (DRX). Los métodos de difracción de rayos X, permiten conocer sobre el orden espacial de los átomos, propiedades físicas de metales, de polímeros y diferenciación cuántica de compuestos cristalinos. Para realizar el análisis de difracción las muestras se deben moler previamente hasta obtener un polvo homogéneo, las muestras se disponen en tubos capilares, este método determina que los compuestos presentan una estructura cristalina de forma única. Un haz de rayos X atraviesa la muestra determinando su índice de cristalinidad. El diagrama de difracción de rayos X se presenta median un barrido con alta precisión en la intensidad de las medidas mediante esta técnica determinamos el índice de cristalinidad de la biomasa lignocelulosica, bagazo de caña de azúcar y hojarasca en una mezcla (90:10).

(“Principios de Análisis Instrumental - Skoog, Holler, Nieman (5ta Edición).pdf,” n.d.)

4.1.9.2 Normativa para caracterización de biomosas lignocelulósicas national renewable energy laboratory (NREL). Se realizó la metodología de caracterización estructural físico química fundamentada en la norma de caracterización de biomosas lignocelulósicas NREL, en donde se determinan parámetros de humedad, cenizas, lignina soluble en ácido y lignina insoluble en ácido, estos métodos analíticos estándar de biomasa son proporcionados por el laboratorio nacional de energía renovable de los Estados Unidos.

4.1.9.3 Espectrofotometría de ultravioleta visible (UV-VIS). La espectrofotometría UV-visible permite determinar la concentración de un compuesto o una mezcla en solución, a través

de la absorción de radiaciones electromagnéticas, considerando que la luz absorbida por el compuesto es proporcional a la concentración del mismo. La radiación electromagnética se determina mediante un espectro de alta y baja frecuencia, la luz de onda visible es una pequeña parte del espectro electromagnético que abarca longitudes de onda de 780-380nm, las radiaciones se emiten de sustancias bajo condiciones de excitación. Para la realización de una curva de calibración de un compuesto se deben hacer diluciones en diferentes concentraciones, determinando la absorbancia para cada concentración (λ_{\max}) lo que permite analizar que el incremento de la concentración es lineal a la absorbancia cumpliendo la ley de (Lambert-beer). Se empleó la espectrofotometría de UV-VIS para el análisis y determinación de lignina en las muestras de biomasa lignocelulósica mediante una curva de calibración con estándar certificado.

(“Principios de Análisis Instrumental - Skoog, Holler, Nieman (5ta Edición).pdf,” n.d.)

4.2 Marco de antecedentes

Durante los últimos años se han realizado investigaciones para crear biocombustibles como alternativa energética que mitiguen el impacto ambiental y reduzcan las emisiones de gases de efecto invernadero por el uso de combustibles fósiles, los cuales se han deteriorado por la explotación indiscriminada, entidades encargadas de la producción de biocombustibles en Brasil estiman que a mediados del 2040 y 2050 el uso de biocombustibles predominará en actividades de transporte e industria. Existe una amplia información de pretratamiento de material lignocelulósico, los métodos aplicables dependen de las características físicas químicas y de la composición del material lignocelulósico que se pretratará. (A. Guimarães et al., 2014)

Se ha buscado la implementación de métodos menos invasivos que separen los componentes del material lignocelulósico principalmente la celulosa, los pretratamientos químicos

implementados han demostrado altos rendimientos y eficiencia pero generan sustancias contaminantes y degradan todo el material lignocelulósico, las investigaciones realizadas han demostrado que el pretratamiento con irradiación de ultrasonido permite obtener un mayor porcentaje en la remoción de la celulosa y es un método que no genera efectos contaminantes. Las pruebas realizadas para la deslignificación de materiales lignocelulósicos como bagazo de caña de azúcar, con pretratamientos oxidativos como peróxido de hidrógeno presentan eficiencia en la remoción de la lignina y hemicelulosa aumentando la accesibilidad de la celulosa para la hidrólisis enzimática y disminuyendo representativamente la cristalinidad de la celulosa.

Los pretratamientos con peróxido de hidrógeno se realizan en disolución en condiciones más moderadas que los pretratamientos ácidos, en algunas reacciones se realiza la deslignificación a temperatura ambiente pero esto implica días o semanas de reacción aumentando los costos. (Da & Lignocelulósica, 2012)

Gonzalves *et al.*, (2009) agentes oxidantes en el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar y su influencia en la sacarificación de la celulosa. En esta investigación se determinó el porcentaje de remoción de lignina a partir peróxido de hidrogeno alcalino en bagazo de caña de azúcar, se realizó un diseño experimental con concentraciones de peróxido de 1,3 a 5 % con pH 11,5 durante 6, 8,15, 24, 48 horas con temperaturas de 20,40, y 60 °C, determinando que el mejor rendimiento fue con concentración de 5 % de peróxido de hidrógeno a 20°C durante 24 horas. (Gonçalves, Gonçalves, & Celulose, 2009)

Curiel dos santos *et al.*, (2012) Brasil optimización de pretratamientos con peróxido alcalino con una alta concentración de sólidos para la hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar. Este trabajo de igual manera se desempeñó bajo un planteamiento factorial 2^3 con variables como concentración temperatura y tiempo además se determinó la actividad enzimática en el

proceso de hidrólisis. Se realizaron análisis como determinación química del bagazo de caña de azúcar, determinación de la humedad, cenizas, determinación de extractivos, determinación de carbohidratos, lignina soluble e insoluble. Los resultados analizados permiten identificar un alto porcentaje de celulosa en ensayos de temperatura 55°C en 7% v/v de peróxido de hidrógeno en los cuales se usaron 0,49 mL de peróxido de hidrógeno en 0,69 g de bagazo de caña de azúcar lo que hace posible la disminución del agente oxidante para proporciones mayores de bagazo de caña. (Campinas, 2012)

Siqueira, *et al.*, (2012), utilización Del planteamiento experimental en un pretratamiento oxidativo en medio alcalino sobre bagazo de caña. En la cual se pretrato biomasa lignocelulósica de bagazo de caña de azúcar con peróxido de hidrógeno en un diseño experimental 2³ variando temperatura, concentración y tiempo. Inicialmente el bagazo de caña de azúcar fue secado en estufa a 45°C durante 48 horas y triturado en molienda. Los experimentos se realizaron en proporciones de 4%(masa de bagazo/ volumen de solución) a un pH de 11,5. Los resultados óptimos de remoción de lignina y hemicelulosa y mayor porcentaje de celulosa fueron en condiciones de temperatura de 30°C, concentración de 6% de peróxido de hidrógeno y 75 min de reacción. (De & Isabela, n.d.)

Guerra *et al.*, (2014), Brasil realizó una investigación denominada *avaliação da hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino considerando altas cargas de sólidos*, la cual consistió en el pretratamiento con peróxido de hidrógeno e hidrólisis enzimática sobre bagazo de caña de azúcar, elaborando un planteamiento factorial 2² con variables de concentración (4%, 6%, 8%) y temperatura (25°C, 50°C, 75°C). Se obtuvo un mayor rendimiento de 72,57% en la remoción de celulosa con un total de 55,15 g/L en condiciones de temperatura 50°C y concentración 8%. (Chemical, Proceedings, & Sombra, 2014)

Vera *et al.*, (2014) en Colombia se realizó un proyecto denominado modificación superficial de celulosa obtenidas a partir de bagazo de caña de azúcar usando silanización, en esta investigación se realizaron tres ensayos con diferentes materiales oxidativos sobre bagazo de caña de azúcar, evaluando el porcentaje de remoción de lignina y hemicelulosa y el rendimiento de celulosa en la hidrólisis enzimática, el pretratamiento oxidativo con peróxido de hidrógeno e irradiación de ultrasonido presento exposición del área superficial de la celulosa realizando una mezcla de peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio, en proporciones de (0,5% y 0,34%). Se obtuvo una alta remoción del material lignocelulósico. Se realizaron análisis de FTIR, SEM, caracterización mediante análisis termogravimétrico TGA y análisis térmico diferencial DTA.(Vera, Arturo, Cortes, Murcia, & Galvis, 2014)

Dantas *et al.*, (2014) En esta investigación se evaluaron diferentes tipos de pretratamiento químico sobre bagazo de caña de azúcar como oxidación con peróxido de hidrogeno para la deslignificación, se sumergió bagazo de caña en una solución de peróxido de hidrogeno 7.35%(v/v) a temperatura de 80°C, se obtuvo eliminación de lignina y hemicelulosa, reducción del grado de cristalinidad y recuperación de xilosa fermentable. (E. S. D. O. S. Santos, Fernandes, & Macedo, 2009)

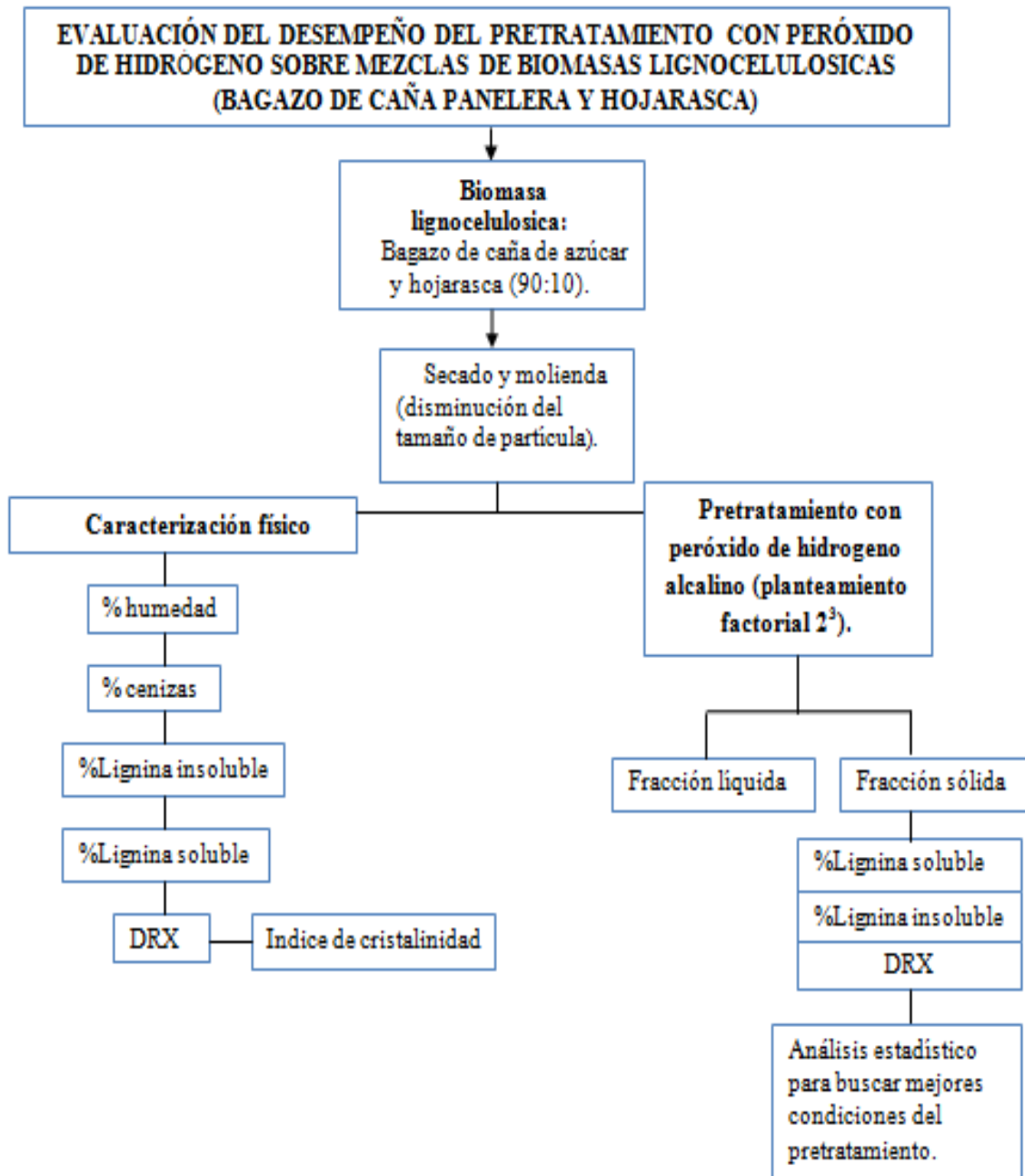
Vieira *et al.*, (2014) realizó una etapa de pretratamientos químicos sobre biomasa lignocelulósica de bagazo de caña de azúcar para generar etanol de segunda generación (2G), con agentes oxidantes como hidróxido de sodio, ácido sulfúrico y peróxido de hidrogeno. Para 100 gramos de bagazo de caña una solución 1%(v/v) de peróxido de hidrogeno en agitación durante 25 horas, obteniendo un rendimiento de 60%. (Alagoas & Tecnologia, 2007)

Supranto *et al.*, (2015) Concluyo que el pretratamiento con peróxido de hidrogeno y una mezcla de pretratamientos químicos (NaOH, HNO₃, H₂O₂) permite obtener un 90% de contenido celulosa, se llevaron a cabo en tres pasos de un proceso de deslignificación de fibra de caña de azúcar y bagazo de caña de azúcar a 80°C durante 5 horas, se obtuvo resultados óptimos en la extracción de celulosa y se generaron subproductos como acetato de celulosa, carboxi metil celulosa, viscosa de celulosa y otros derivados de celulosa. (Supranto, Tawfieurrahman, & Yunanto, 2015)

5. Diseño metodológico

La metodología realizada en este trabajo de investigación se describe en el siguiente diagrama de la figura 15.

Figura 15 Diagrama de metodología



En el anterior diagrama se plantea la metodología realizada en la caracterización y pretratamiento de muestras de biomasa lignocelulosica (bagazo de caña de azúcar y hojarasca mezcla 90:10) realizado bajo la protocolo NREL descrita a continuación:

Tabla 3 *Protocolos de metodología experimental.*

ANÁLISIS	PROTOCOLO
NREL determinación de humedad.	NREL TP-510-42621
NREL determinación de cenizas.	NREL TP-510-42622
NREL determinación de lignina soluble.	NREL TP-150-42618
NREL determinación de lignina insoluble.	NREL TP-150-42618
Pretratamiento químico bajo diseño experimental 2^3 con triplicado en el punto central.	AYALA(2012)

5.1 Aspectos generales

Se recolectaron las muestras, bagazo de caña panelera de Piedecuesta Santander y hojarasca de la Universidad Santo Tomás, posteriormente se realizó el secado de las biomásas al sol durante dos días, las muestras fueron molidas para reducir su tamaño y depositadas en bolsas herméticamente cerradas.

5.1.1 Materiales y equipos. Pipetas graduadas y aforadas; vasos de precipitados, pipetas pasteur, balones aforados; vidrios de reloj; viales; balanza analítica; pH-metro.

En la tabla 4 se muestran los equipos implementados en el desarrollo de la investigación.

Tabla 4 *Equipos.*

EQUIPO	REFERENCIA
Balanza	OHAUS, PIONEER (capacidad máxima: 210 g; desviación estándar: 0,0001 g).
Mufla	E&Q, mufla (temperatura constante: 50 a 1100°C).
Estufa	<i>ThermoScientific.</i>
UV-VIS	<i>Agilent Technologies Carry 60 UV-Vis.</i>
DRX	Difractometro de polvo <i>Bruker –D8 ADVANCE geometríDaVinci.</i>

5.1.2 Reactivos. Se implementaron reactivos químicos oxidativos y básicos durante la experimentación para llevar a cabo el pretratamiento como, Peróxido de Hidrógeno, (H₂O₂) al 96% de pureza e hidróxido de sodio (NaOH) al 98% de pureza para el control de pH.

5.2 Ensayo de pretratamiento de mezclas de bagazo de caña de azúcar y hojarasca.

Se realizaron las pruebas de pretratamiento del material lignocelulósico sobre muestras secas, previamente preparadas y caracterizadas, con condiciones de reacción controladas como agitación temperatura y concentración del disolvente, seguidamente se realizaron mezclas de las materias lignocelulósicas como el bagazo de caña de azúcar y hojarasca variando las proporciones de cada material en una única proporción de 90:10, se realizaron disoluciones con peróxido de hidrógeno a un pH de 11.5, y temperaturas variables de 25 a 65 °C, se adicionaron

15 g de material lignocelulósico en 100 ml de solución de peróxido de hidrógeno a 11(v / v) se mantuvo el pH a 11-12 con NaOH. (Raele, Boaventura, Fischmann, & Sarturi, 2014) la figura 16 muestra el montaje experimental



Figura 16 Montaje experimental del pretratamiento

Posteriormente al terminar la reacción, las muestras se lavaron con abundante agua en un tamiz como se observa en la figura 17, hasta tener un pH neutro, se exprimieron manualmente para eliminar restos del peróxido de hidrogeno y exceso de agua, finalmente se secaron a 105° durante 2 horas hasta peso constante y se almacenaron en bolsas herméticas para conservar el material para la posterior hidrólisis ácida (determinación de lignina).



Figura 17 Lavado de biomasa pretratada

Los desechos líquidos obtenidos del pretratamiento oxidativo se depositaron en un frasco rotulado para su posterior neutralización y disposición final siguiendo los protocolos de manejo de residuos para el laboratorio.

Los valores codificados de los niveles de cada una de las variables a estudiar en el diseño experimental se presentan en la tabla 5

Tabla 5 *Rango de valores estudiados en el diseño experimental factorial completo del pretratamiento con peróxido de hidrogeno alcalino.*

Variables independientes	Niveles		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	25	45	65
Concentración de reactivo (%)	3	5	7
tiempo (min)	40	60	80

Para la realización de un total de 11 experimentos según el diseño experimental 2^3 con triplicado en el punto central, que se observa en la siguiente tabla.

En el diseño experimental se controlaron variables de temperatura concentración y tiempo. Según la metodología planteada por (AYALA 2012), las condiciones de reacción del diseño se presentan a continuación en la tabla 6.

Tabla 6 *Variables del diseño experimental.*

Ensayo	Tiempo (min)	Temperatura (°c)	Concentración (%)
1	80	65	3
2*	60	45	5
3	40	65	7
4	80	25	7

Tabla 6 (Continuación)

5*	60	45	5
6	40	25	7
7	40	65	3
8	80	25	3
9	80	65	7
10	40	25	3
11*	60	45	5

5.3 Análisis estadístico del diseño experimental

El análisis estadístico para mostrar los efectos principales de las variables considerando el error puro se realizó a través de Software estadístico *STATISTIC 7.0* en un nivel de confianza referenciados para este tipo de análisis entre el 90 y 95% de confianza.

5.4 Caracterización de las mezclas de bagazo de caña de azúcar y hojarasca

5.4.1 Determinación física de humedad y cenizas en biomasa lignocelulósica. Contenido de humedad: el material lignocelulósico se analizó mediante la técnica de NREL/TP-510-42621 la cual permite el análisis del contenido de humedad de un material, se pesó la muestra inicialmente de 0,5 a 3g, los cuales se pasaron de 3 a 5 horas en la mufla a 105 °C posteriormente a un desecador durante una hora y nuevamente a la mufla durante dos horas hasta un peso contante. (Sluiter, Hames, Ruiz, Scarlata, Sluiter, & Templeton, 2008)

Finalmente se pesaron las muestras y se aplicó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ humedad} = \frac{(M - Ps)}{M} * 100$$

Figura 16 Determinación de humedad.

Donde:

M: peso inicial de la muestra.

Ps: peso seco de la muestra.

Contenido de cenizas: se realizó mediante la metodología de NREL/TP-510-42622 “*Standard Method For the determination of the Ash in Biomass*” aplicando la siguiente ecuación. Este método se realizó partiendo del material lignocelulósico previamente seco, y determinada su humedad, se pesaron 2g de muestra en crisoles los cuales se introdujeron en una mufla para realizar una rampa de temperatura como la tabla 7.(Sluiter, Hames, Ruiz, Scarlata, Sluiter, & Templeton, 2008)

Tabla 7 Rampa de temperatura.

TEMPERATURA	TIEMPO
105 °c	12 min
250 °c	30 min
575 °c	180 min
105 ° c	240 min
desecador	60 min

Finalmente se determinó el porcentaje de cenizas mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ ceniza} = \left(\frac{M_c - M_a}{M_b - M_a} \right) * 100$$

Figura 17 Determinación de cenizas

Donde:

Ma: masa del crisol vacío calcinado en g.

Mb: masa del crisol más peso del material seco en g.

Mc: crisol con la masa de cenizas en g.

Como se evidencia en la figura se pesaron 2 gramos de la mezcla (90:10) bagazo de caña de azúcar y hojarasca.



Figura 18 Cenizas de biomasa lignocelulósica natural.

5.4.2 Determinación de lignina soluble, insoluble. Se realizó el tratamiento previo a las muestras, pesando 300 mg de muestra y se añadieron 4 ml de ácido sulfúrico a 72% mezclados durante un minuto, posteriormente las muestras se colocaron en un baño térmico durante 60 min y se agitaron cada 5 min para asegurar la penetración del ácido en el material lignocelulósico.

Posteriormente las muestras se diluyeron con 84 ml de agua destilada. Finalmente las muestras se pasan por una autoclave durante 60 min a 121°C como se indica en la figura 19.



Figura 19 Biomasa natural sometida a hidrólisis ácida

Para el análisis de lignina soluble e insoluble se filtraron las muestras, posteriormente se tomó alícuotas de 50 ml en un frasco de almacenamiento de muestras filtrando las soluciones al vacío, y se tomaron los sólidos suspendidos después de enjugados con 50 ml de agua desionizada.

Finalmente se secaron los crisoles a 105 °C hasta alcanzar un peso constante, se retiraron las muestras y se dejaron en el desecador. La cantidad de ceniza insoluble en ácido no es igual al total de ceniza de biomasa, se aplicó el siguiente cálculo (Sluiter, Hames, Ruiz, Scarlata, Sluiter, Templeton, et al., 2008)

$$\text{Lig Insoluble} = \left(\frac{MKla - MP}{Mb} \right) * 100 - \% \text{ cenizas}$$

Figura 18 Determinación de lignina insoluble.

Donde:

Mb= masa del material seco g.

Mp= masa del papel filtro pesado g.

MKla= masa del papel filtro mas masa de lignina insoluble g.

Las muestras de lignina soluble en ácido se analizaron por espectrofotómetro UV-VIS, usando la alícuota de disolución de ácido de hidrólisis se determinó la absorbancia de 0,7 a 1 nm de las muestras realizando disoluciones con el siguiente cálculo:

$$\text{Lig Soluble} = \left(\frac{\text{Abs} * \text{Factor de dilución}}{\text{absorbatividad} * \text{masa}} \right) * 100$$

Figura 19 Determinación de lignina soluble.

Donde:

Masa = concentración de lignina soluble en el hidrolizado (gL)

Abs = absorbancia del hidrolizado en 270 nm

Finalmente se realizó la determinación de lignina total con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ LIGNINA} = \% \text{ LIGA} + \% \text{ LIGSA}$$

Figura 20 Lignina total.

5.4.3 Difracción de rayos x (DRX). Los análisis de difracción de rayos x (DRX) mediante el equipo Difractómetro de polvo *BRUKER - D8 ADVANCE Geometría DaVinci*, para determinar el índice de cristalinidad se desarrollaron según la metodología indicada por AYALA (2012). (Lucia, Ayala, Química, Antonio, & Doctor, 2015) En las muestras antes y después de ser sometidas a la etapa de pretratamiento. El análisis se realizó en la Universidad Industrial de Santander sede Guatiguará.

Para la determinación del índice de cristalinidad se utilizó la siguiente ecuación.

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

Figura 21 Índice de cristalinidad del material lignocelulósico.

Tomado de: (Lucia et al., 2015)

Donde:

I_c = Índice de cristalinidad (%)

I_{002} = Intensidad máxima en el plano de cristal de 002 ($2\theta = 22,6^\circ$)

I_{am} = Intensidad del pico en la fase amorfa ($2\theta = 19,0^\circ$).

6. Resultados y discusión

Los materiales lignocelulósicos como, el bagazo de caña de azúcar fueron obtenidos de la finca Bore Sur, ubicada en el municipio de Piedecuesta, Santander y la hojarasca es proveniente de Universidad Santo Tomás campus Floridablanca Santander. Los residuos lignocelulósicos se mezclaron con proporciones (90:10) de bagazo de caña de azúcar y hojarasca respectivamente para su caracterización y pretratamiento.

6.1 Caracterización de las mezclas de bagazo de caña de azúcar y hojarasca.

6.1.1 Determinación física del porcentaje de cenizas y humedad en biomasa lignocelulósica natural. La determinación del contenido de humedad y cenizas se realizó al material en base seco como lo indica la normativa de NREL TP-510-42621 y NREL TP-510-42622 la tabla 8 y 9 muestra los resultados obtenidos. (Mas, 2014)

Inicialmente se evaluó el contenido de humedad y cenizas de la hojarasca natural como se indica en la tabla 8.

Tabla 8 *Resultados del contenido de humedad y cenizas de la hojarasca.*

Hojarasca	
Parámetro	%
Humedad	9,67 % ± 0,22
Cenizas	16,38% ± 0.42

Tabla 9 *Resultados del contenido de humedad y cenizas en la mezcla de bagazo de caña de azúcar y hojarasca en proporción (90:10).*

Parámetro	%
Humedad	8,92% ± 0,59
Cenizas	3,40% ± 0,32

Para la determinación de la humedad se evalúa la pérdida de masa por evaporación de agua. Inicialmente se determino el porcentaje de humedad y cenizas de la hojarasca debido a que no se reporta caracterización de esta biomasa.

En los resultados obtenidos en la tabla 8, se presenta un alto contenido de humedad de 9,67% y de cenizas de 16,38% el contenido de cenizas excede el porcentaje permitido de 10% para biomasa en la producción de energía combustible, por lo que se empleo una baja proporción de hojarasca para que no afectara el proceso de deslignificación del material pero para aumentar el contenido de celulosa.

En los resultados obtenidos de la mezcla (90:10) presentados en la tabla 9, el porcentaje de humedad es de un 8,92% , pero se debe tener en cuenta la humedad presente en la hojarasca para la cual no hay reportes de caracterización del material, aunque los resultados experimentales presentan un contenido de humedad mayor que el obtenido en la mezcla 90:10.(Mas, 2014)

La humedad teórica del bagazo de caña de azúcar es de 49-52% en base húmeda la cual se encuentra directamente ligada al poder calorífico del material. (“Muñoz 2012,” n.d.)

El porcentaje (%) de humedad en base seca del bagazo de caña de azúcar reportado en la literatura oscila entre 7,5-9,43%. (Mas, 2014) se considera que la humedad obtenida en el

experimento para la mezcla (90:10) de bagazo de caña de azúcar y hojarasca se encuentra en el rango reportado por la literatura

Para la determinación del porcentaje de cenizas se realizó en base seca, los resultados del porcentaje (%) de cenizas obtenidos para la mezcla (90:10) de bagazo de caña de azúcar y hojarasca son de 3,40%, este valor es más alto comparado con los valores que reporta la literatura para el bagazo de caña ya que se reportan valores de azúcar de 1,5-2,5% de cenizas. (“No Title,” 2012) los resultados obtenidos de cenizas para la hojarasca son altos y exceden el límite permitido por la que generan una mayor influencia en el porcentaje de cenizas de la mezcla de proporción 90:10, esto es debido a la naturaleza de las biomásas lignocelulosicas. Respecto al contenido de cenizas se conoce como el material inorgánico presente en la biomasa lignocelulósica en el cual se presentan algunos componentes como el magnesio, hierro, calcio, silicio, sodio y potasio. (Industria, La, Risaralda, Viviana, & Silva, n.d.)

Los materiales lignocelulosicos que reportan alto contenido de cenizas presentan algunos inconvenientes en la hidrólisis y fermentación del material, ya que impiden la deslignificación así mismo disminuye la producción de etanol; las biomásas con alto contenido de cenizas pueden aumentar la formación de desechos orgánicos los cuales no son viables para la producción de combustibles de tipo líquidos. (Menezes, Jackson, Rocha, & Maciel, 2016)

Los elementos que componen la cenizas están unidos como sales a la estructura de carbón se pueden componer como partículas minerales de la tierra donde fueron cultivadas las biomásas o agregadas a través de transporte y exposición. (Behaviour, 2012).

Esto indica que debido a la exposición mineral que sufre la hojarasca al caer naturalmente de los árboles y el contacto que tiene con el suelo y rocas, pueden influir en su contenido de cenizas

además se debe tener en cuenta el proceso de colecta del bagazo de caña de azúcar, transporte y la exposición de la biomasa a los elementos de la naturaleza, en los resultados obtenidos la mezcla de la biomasa no supera el nivel máximo de cenizas de 10%. (Behaviour, 2012)

6.1.2 Determinación del porcentaje de lignina soluble e insoluble a la biomasa lignocelulósica natural. Para la determinación del porcentaje de lignina insoluble se empleó la ecuación 3 y para la lignina soluble la ecuación 4, a partir de la determinación de lignina soluble e insoluble se halló el porcentaje de lignina total empleando la ecuación 5. La siguiente tabla presenta los resultados obtenidos al material lignocelulósico natural, antes de la etapa de pretratamiento.

Tabla 10 *Resultados porcentaje de lignina soluble e insoluble.*

parámetro	%
Lignina soluble en ácido.	10,72 % ± 0,36
Lignina insoluble en ácido.	22,11% ± 0,78
Lignina total.	32.83% ± 0,60

Como estudios lo comprueban la lignina es un material lignocelulosico que otorga rigidez a las plantas pero impide el ataque enzimático en la producción de etanol además de esto la lignina produce compuestos fenolicos como la vainillina los cresoles y el guayacol en el proceso de fermentación lo que hace que el producto final el etanol presente impurezas. (“CELULOSE Neumara Luci Conceição Silva,” 2010), (Aromatic, Of, & Interest, 2013)

En la tabla 9 se presentan los resultados obtenidos del porcentaje de lignina para la mezcla de bagazo de caña de azúcar y hojarasca en donde se obtuvo un resultado de 32,83% para la lignina total, debido a la influencia de la hojarasca como biomasa leñosa, aunque el resultado obtenido se encuentra en el rango de porcentaje de lignina se presenta un elevado contenido debido a la naturaleza del material lignocelulósico especialmente a la hojarasca.

El bagazo de caña de azúcar reporta un porcentaje de lignina de 20-35%. (“CELULOSE Neumara Luci Conceição Silva,” 2010) En otras investigaciones se reporta el contenido de lignina en el bagazo de caña de azúcar de 25,2%, 23,38%, 14%, 25,82% respectivamente. (“CELULOSE Neumara Luci Conceição Silva,” 2010), (Aromatic et al., 2013) (Of, Sugar, In, Second, & Ethanol, n.d.) (Sánchez Riaño & Gutiérrez Morales, A. I.; Muñoz Hernández, J. A. y Rivera Barrero, 2010)

Se considera que la mezcla 90:10 de bagazo de caña de azúcar y hojarasca cumple con el porcentaje de lignina reportado en la literatura para la conversión de etanol para transporte. Pero se debe tener presente que la lignina que compone las maderas duras y blandas, se presenta en la literatura en un rango de 20 - 40%. (La, P, & Producción, 2011) las maderas duras son mucho más fáciles de deslignificar que las maderas blandas, las maderas duras generalmente son más implementadas en la conversión de la biomasa para la producción de energía debido a que tienen mayor accesibilidad a los carbohidratos y menor contenido de cenizas, en el caso del bagazo de caña de azúcar es considerado una madera dura y la hojarasca madera blanda con un alto contenido de cenizas, por lo que se utiliza en menor proporción para maximizar la cantidad de celulosa y carbohidratos sin alterar el proceso de fermentación y conversión de etanol. (L et al., n.d.)-(Investigaciones, 1994)

6.1.3 Determinación del índice de cristalinidad por difracción de rayos x (DRX) en biomasa lignocelulósica natural. Los resultados obtenidos del índice de cristalinidad mediante la técnica de difracción de rayos X (DRX) en la mezcla de bagazo de caña de azúcar y hojarasca en proporción 90:10 se obtuvieron empleando la ecuación 6, los cuales se presentan en la tabla 11, estos resultados se evidencian en la figura 20 la que presenta el difractograma de la biomasa.

Tabla 11 *Resultados del índice de cristalinidad.*

Muestra	Índice de cristalinidad (%)
Bagazo de caña de azúcar y hojarasca mezcla (90:10)	34,05

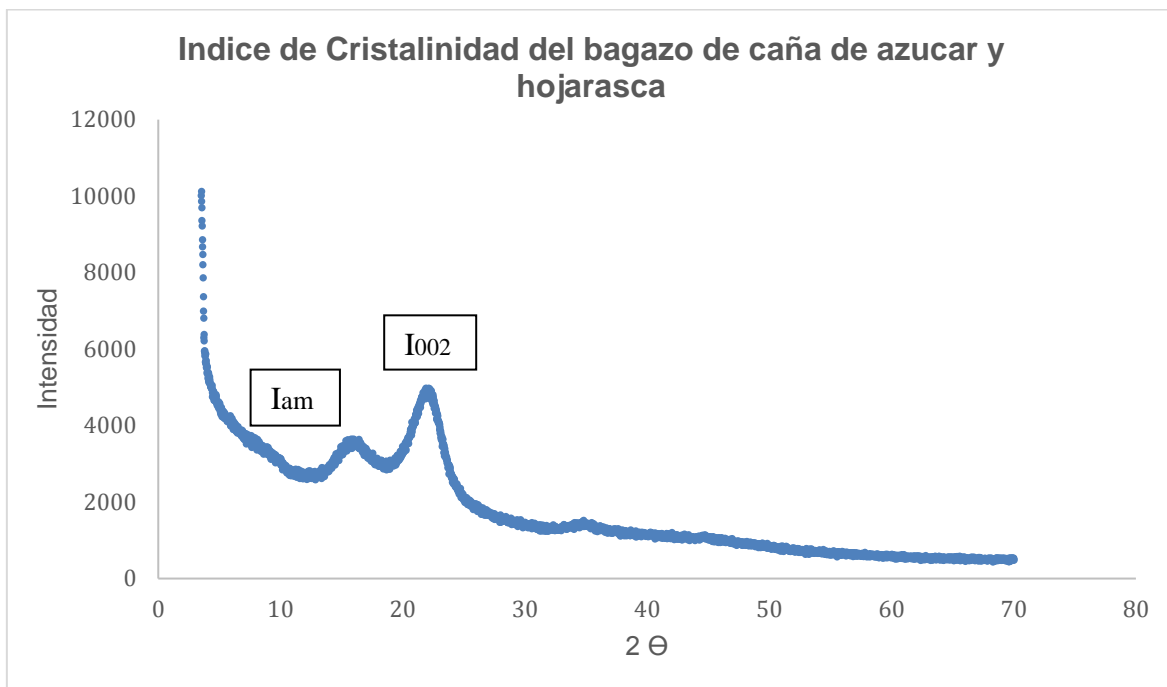


Figura 22 Difractograma de bagazo de caña de azúcar y hojarasca.

El parámetro del índice de cristalinidad es utilizado para determinar el porcentaje relativo del material cristalino de la celulosa, las señales se presentan en forma cristalina o amorfa. El índice de cristalinidad es muy útil para determinar los cambios que sufre el material lignocelulósico después de pretratamientos físicos químicos o biológicos. (Chandel et al., 2014)

Como se observa en el figura 18, para el bagazo de caña de azúcar y hojarasca natural, la señal de la celulosa cristalina se encuentra en el rango de 2θ en $22,6^\circ$ y la señal de la celulosa amorfa se encuentra en el rango de 2θ en $19,0^\circ$ obteniendo un índice de cristalinidad para la mezcla (90:10) de bagazo de caña y hojarasca de 34,05%. La señal de la celulosa amorfa es más pequeña y ancha en comparación con la celulosa cristalina la cual presenta un pico con mayor intensidad.

El índice de cristalinidad del bagazo de caña de azúcar es reportado en la literatura entre el 49–59%. (J. L. Guimarães, Frollini, Silva, Wypych, & Satyanarayana, 2009) y otras investigaciones reportan un índice de cristalinidad del 41%. (L et al., n.d.)

Se presenta en la tabla 10, un índice menor al reportado en la literatura de 34,05%, lo que beneficia la etapa de pretratamiento e hidrólisis posteriores.

Los materiales altamente cristalinos se forman por enlaces intermoleculares e intramoleculares, como los enlaces de hidrogeno, otorgando una protección a la celulosa y creando un impedimento estérico a la irrupción de los reactivos esto no permite que se realice una hidrolisis ni fermentación completa de la biomasa lo que disminuye la producción de etanol. (“Capítulo 12 Determinación de la Cristalinidad y de la Accesibilidad de las Fibras de Celulosa Mediante Diferentes Técnicas,” n.d.)

La mayoría de los materiales lignocelulósicos se encuentran en estado cristalino, los pretratamientos químicos permiten disminuir el área cristalina del material para aumentar el ataque enzimático. (Lucia et al., 2015)

6.2 Pretratamiento químico con peróxido de hidrógeno

Para la etapa de pretratamiento se implementó un diseño factorial 2^3 con triplicado en el punto central en los ensayos (2, 5, 11) con el objetivo de evaluar las variables significativas (tiempo, temperatura, concentración) para el diseño.

La tabla 12 presenta las condiciones de reacción del diseño experimental.

Tabla 12 *Condiciones de reacción.*

ENSAYO	TIEMPO (MIN)	TEMPERATURA (°C)	CONCENTRACIÓN (%)
1	80	65	3
2*	60	45	5
3	40	65	7
4	80	25	7
5*	60	45	5
6	40	25	7
7	40	65	3
8	80	25	3
9	80	65	7
10	40	25	3
11*	60	45	5

Habitualmente en las investigaciones realizadas para diferentes variables de estudio se emplea un diseño experimental, que permite evaluar múltiples propiedades al mismo tiempo y con menos ensayos, reduciendo el tiempo experimental y el costo de los análisis, además obteniendo resultados basados en probabilidades estadísticas. El diseño experimental tiene como objeto identificar las variables significativas y las interacciones entre ellas que intervienen en el estudio. (Sarita Cândido Rabelo, 2007)

Este procedimiento se realizó en condiciones controladas de temperatura, concentración de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y tiempo con el objetivo de remover la lignina presente en la biomasa lignocelulosica.

Finalmente se determinó el porcentaje de rendimiento de la reacción de oxidación con peróxido de hidrogeno alcalino, obteniendo los resultados que se presentan en la tabla 14.

Tabla 13 *Rendimiento de reacción del pretratamiento químico con peróxido de hidrogeno.*

PRETRATAMIENTO				
Ensayo	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Concentración (%)	% Rendimiento
1	80	65	3	31.21
2*	60	45	5	21.81
3	40	65	7	26.13
4	80	25	7	25.38
5*	60	45	5	22.28
6	40	25	7	23.75
7	40	65	3	25.94
8	80	25	3	22.81
9	80	65	7	24.48
10	40	25	3	26.28
11*	60	45	5	22.04

Los pretratamientos químicos con peróxido de hidrogeno solubilizan más de la mitad de la lignina presente en la biomasa lignocelulosica. (Sarita Cândido Rabelo, 2007).

En la tabla 13 se puede observar diferentes resultados en los que varía el rendimiento debido a las variables de reacción como temperatura concentración y tiempo, se determina el porcentaje de rendimiento de reacción a partir de pérdida de masa inicial y final, considerando la remoción de la lignina en la reacción de oxidación.

Los resultados obtenidos en el rendimiento de la reacción de peróxido de hidrogeno sobre la mezcla de bagazo de caña de azúcar y hojarasca nos indican que se llevo a cabo una remoción parcial del material en donde no se evidencia la remoción total de celulosa, beneficiando la producción de etanol sin la perdida azucares, los pretratamientos oxidativos con peróxido de hidrogeno reportan en la literatura una alta remoción de lignina sin descomponer completamente el material celulósico.

6.3 Caracterización de la biomasa pretratada con peróxido de hidrógeno

Al finalizar la etapa de pretratamiento químico con peróxido de hidrógeno se caracterizó la biomasa para determinar el contenido de lignina y la modificación estructural que sufrió el material en esta etapa.

6.4 Determinación del porcentaje de lignina soluble e insoluble a la biomasa lignocelulósica pretratada con peróxido de hidrógeno.

Para el porcentaje de lignina soluble e insoluble determinado después de la etapa de pretratamiento también se implementó la norma NREL TP-150-42618 en las mismas condiciones que para la biomasa natural. A partir del total de lignina presente después del pretratamiento se determinó el porcentaje de remoción de lignina soluble e insoluble.

Se observó el cambio de color en la hidrólisis ácida, después de la etapa de pretratamiento en comparación con la hidrólisis ácida al material natural, debido a la remoción de lignina que presentaba el material lignocelulósico durante la etapa del pretratamiento y se evidencia en la siguiente figura. (Sluiter, Hames, Ruiz, Scarlata, Sluiter, Templeton, et al., 2008)

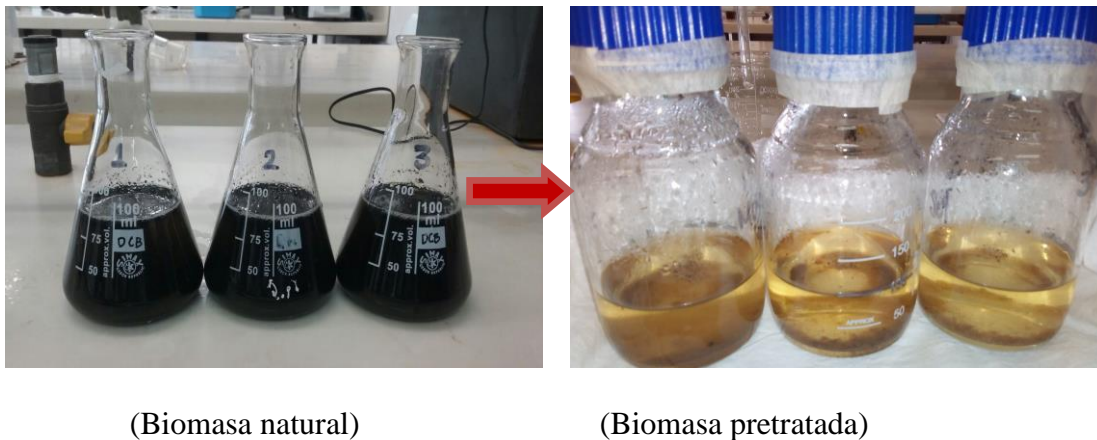


Figura 21 Biomasa pretratada sometida a hidrólisis ácida

Los resultados presentados en la tabla 14 indican el contenido de lignina presente en el material después de realizar el pretratamiento y corregidos con el rendimiento de reacción.

Tabla 14 *Porcentaje (%) de lignina soluble e insoluble después de la etapa de pretratamiento.*

Condiciones de reacción				Resultados del pretratamiento	
Ensayo	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Concentración (%)	%lignina soluble corregida	% lignina insoluble corregida
1	80	65	3	6.04	5.99
2*	60	45	5	4.00	6.04
3	40	65	7	4.73	13.87
4	80	25	7	4.41	2.53
5*	60	45	5	4.26	5.55
6	40	25	7	4.11	8.69
7	40	65	3	4.88	4.71
8	80	25	3	4.94	4.74
9	80	65	7	5.23	6.01
10	40	25	3	5.84	4.53
11*	60	45	5	5.05	5.62

El porcentaje (%) de lignina total inicial de la biomasa natural de bagazo de caña de azúcar y hojarasca mezcla (90:10) fue de 32,83%, la lignina soluble 10,72% y la insoluble 22,11% respectivamente como se indica en la tabla 10. En los resultados presentados en la tabla 14 se observa la solubilización de la lignina mediante el pretratamiento, el contenido disminuyó para

cada ensayo respecto al porcentaje de lignina del material natural. Se evidencia en los ensayos 4 y 10 que fueron los de mayor porcentaje de remoción, que el contenido de lignina insoluble es mínimo de 2,53% y 4,53% respectivamente en comparación con la lignina insoluble inicial de 22,11%. Para el contenido de lignina soluble el menor contenido después de la etapa de pretratamiento se presenta en los ensayos 4, 6 con 4,41% y 4,11% y en el triplicado en el punto central.

La solubilización del contenido de lignina, facilita la hidrólisis enzimática y disminuye el índice de cristalinidad como se evidencia en la caracterización del material pretratado. (Sarita Cândido Rabelo, 2007)

Después del pretratamiento con peróxido de hidrógeno se determinó el contenido de lignina presente en las muestras mediante una hidrólisis ácida para evidenciar el porcentaje de remoción de la lignina y la eficiencia del diseño experimental, la siguiente tabla presenta los resultados de remoción de lignina soluble e insoluble en los 11 ensayos con el triplicado en el punto central.

Tabla 15 *Remoción de lignina de la biomasa pretratada con peróxido de hidrógeno.*

Condiciones de reacción				Resultados del pretratamiento	
Ensayo	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Concentración (%)	% Remoción lignina soluble	% Remoción lignina insoluble
1	80	65	3	43.63	72.91
2*	60	45	5	62.66	72.69

Tabla 15 (Continuación)

3	40	65	7	55.83	37.26
4	80	25	7	58.83	88.55
5*	60	45	5	60.28	74.88
6	40	25	7	61.67	60.71
7	40	65	3	54.50	78.69
8	80	25	3	53.95	78.55
9	80	65	7	51.194	72.82
10	40	25	3	45.50	79.51
11*	60	45	5	52.91	74.57

Según los resultados obtenidos en la remoción de la lignina presente en el material lignocelulósico después de la etapa de pretratamiento químico, se obtuvo un alto porcentaje de remoción de la lignina insoluble en ácido, en el ensayo 4 una remoción de (88,5%) con condiciones de reacción a 80 min, 25°C, 7% de peróxido de hidrogeno y en el ensayo 10 una remoción del (79,5%) con condiciones de reacción a 40 min, 25°C, 3% de peróxido de hidrogeno.

Respecto a la lignina soluble en la tabla15 se evidencia una alta remoción para el triplicado en el punto central además de los ensayos 4 con una remoción de (58,83%) y el ensayo 6 una remoción de (61.67%) con condiciones de reacción a 40 min, 25°C, 7% de peróxido de hidrogeno.

En los ensayos 4 y 10 para el porcentaje de remoción de lignina insoluble se puede observar la concentración más alta y baja de peróxido de hidrógeno alcalino de (7 y 3%) respectivamente y a su vez los más altos niveles de remoción de lignina lo que indicaría que la concentración podría no ser una variable significativa en el diseño experimental ya que los valores de remoción más altos se presentan en la menor concentración de peróxido de hidrogeno de 3% lo cual se evidenciaría bajo el análisis estadístico.

6.5 Análisis estadístico mediante el software *STATISTIC 7.0* del pretratamiento químico con peróxido de hidrógeno

Para realizar el análisis estadístico se determinó el porcentaje de remoción de lignina total el cual permitió evidenciar la eficiencia del pretratamiento, teniendo presente el contenido de lignina total inicial de 32,83% como se indica en la (Tabla 9), la tabla 16 presenta los resultados del porcentaje de remoción de lignina total para los 11 ensayos corregidos con el valor del rendimiento de reacción del pretratamiento químico.

Tabla 16 *Remoción de lignina total.*

Condiciones de reacción				Resultados del pretratamiento	
Ensayo	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Concentración (%)	Remoción de la lignina total	% Remoción lignina total
1	80	65	3	12.03	63.35
2*	60	45	5	10.04	69.42

Tabla 16 (Continuación)

3	40	65	7	18.61	43.32
4	80	25	7	6.94	78.85
5*	60	45	5	9.81	70.11
6	40	25	7	12.79	61.02
7	40	65	3	9.59	70.79
8	80	25	3	9.68	70.51
9	80	65	7	11.24	65.75
10	40	25	3	10.37	68.40
11*	60	45	5	10.67	67.50

Como se indica en la tabla 16 se solubilizo más del 50% del material lignocelulósico en la etapa de pretratamiento.

El análisis estadístico permitió identificar las variables significativas y los efectos principales que se presentan en el diseño experimental para la optimización del proceso y mejora de los resultados, teniendo en cuenta el nivel de confianza de 95% a través del software STATISTIC 7.0. (Lucia et al., 2015)

La tabla 17 indica los coeficientes de regresión para la remoción de la lignina después de realizar el pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino con 95% de confianza.

Tabla 17 *Coefficientes de regresión.*

Factor	Efecto	Error	T(4)	P	Coefficiente
Media	6,63E+0	1,16E	5,70E+0	5,68E-	6,63E+01
	1	+00	1	07	
1.Tiempo	8,73E+0	2,73E	3,20E+0	3,29E-	4,37E+00
(min)	0	+00	0	02	
2. Temperatura	-	2,73E	-	3,11E-	-4,45E+00
(°C)	8,89E+00	+00	3,26E+00	02	
3. Concentración	-	2,73E	-	9,17E-	-3,01E+00
(%)	6,03E+00	+00	2,21E+00	02	
1*2	-	2,73E	-4,53E-	6,74E-	-6,18E-01
	1,24E+00	+00	01	01	
1*3	1,14E+0	2,73E	4,18E+0	1,40E-	5,70E+00
	1	+00	0	02	
2*3	-	2,73E	-	7,57E-	-3,25E+00
	6,50E+00	+00	2,38E+00	02	

Se presentan las variables de reacción 1 tiempo, 2 temperatura, 3 concentración, y los niveles significativos que se encuentran resaltados como: tiempo, temperatura y la interacción (1*3) tiempo y concentración. A partir de esta tabla se puede realizar la hipótesis de significancia estadística de las variables resaltadas.

En donde se evidencia si los valores son significativos para el modelo estadístico a partir de un $P < 0,05$.

Antes de realizar los análisis de Anova se debe hacer una preselección de las variables e interacciones significativas para el diseño a través de un diagrama de Pareto o también un gráfico de probabilidades para descartar las variables que no se consideran estadísticamente significativas a 95% de confianza. (Ismael, n.d.)

La figura 22 muestra el diagrama de Pareto con efectos estandarizados, la línea roja punteada indica la magnitud que el efecto debe tener para ser considerado significativo $p < 0,05$ considerando un nivel de confianza del 95% para análisis de pretratamiento.

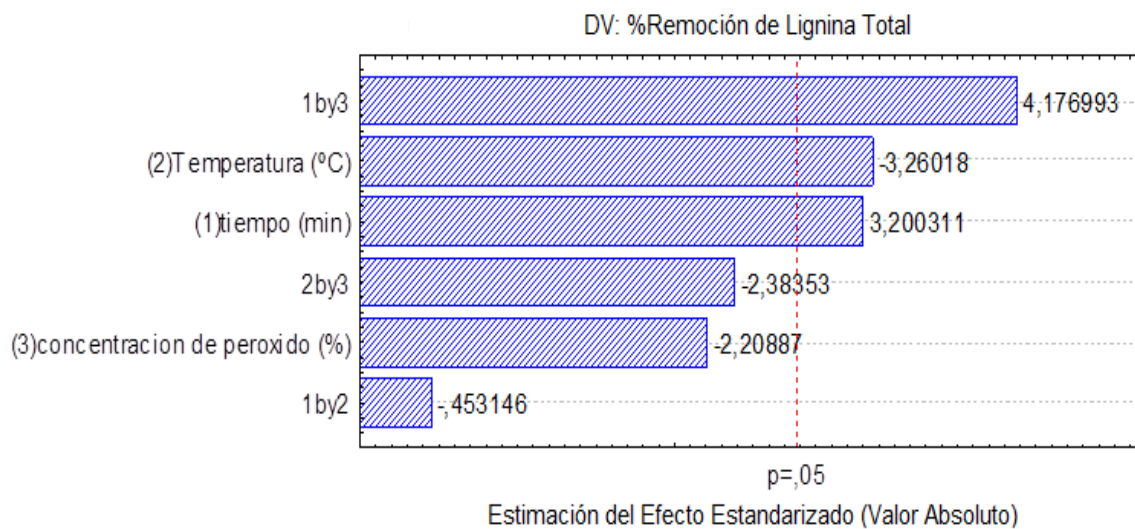


Figura 23 Gráfico de Pareto

Al analizar la figura 22 El diagrama de Pareto presenta cada uno de los efectos del modelo estadístico en orden decreciente de magnitud y significancia, la longitud de cada barra corresponde al efecto estandarizado, es decir el efecto estimado dividido entre el error estándar estadístico.(2010)

Las variables estadísticamente significativas que sobrepasan la línea de magnitud $p=0,05$ con un nivel de confianza de 95% son las variables como temperatura, tiempo y la interacción (1by3) que corresponde a el tiempo y la concentración siendo este el mayor efecto significativo del diagrama estas mismas variables se identificaron en la tabla 16 como variables estadísticamente significativas.

Se puede considerar que la concentración de peróxido de hidrógeno alcalino no es directamente una variable significativa, ni la interacción de la variable (2by3) que corresponde a la temperatura y concentración, también se presenta la interacción menos significativa estadísticamente de (1by2) que corresponde a tiempo y temperatura. Estas interacciones se pueden descartar del modelo como errores aleatorios. (Eletrônicas, Na, Digital, & Ufg, 2016)

Otra herramienta estadística útil es el grafico de probabilístico normal que permite identificar las variables significativas mediante la hipótesis de que la variable respuesta es normal, se estimarían combinaciones normales. El grafico de probabilidades tiene una escala en el eje de coordenadas para así tener la alineación de los efectos no significativos. (Ismael, n.d.)

En la figura 23 se presentan el gráfico de probabilidades para los análisis del planteamiento factorial 2^3 con triplicado en el punto central del pretratamiento oxidativo con peróxido de hidrógeno alcalino.

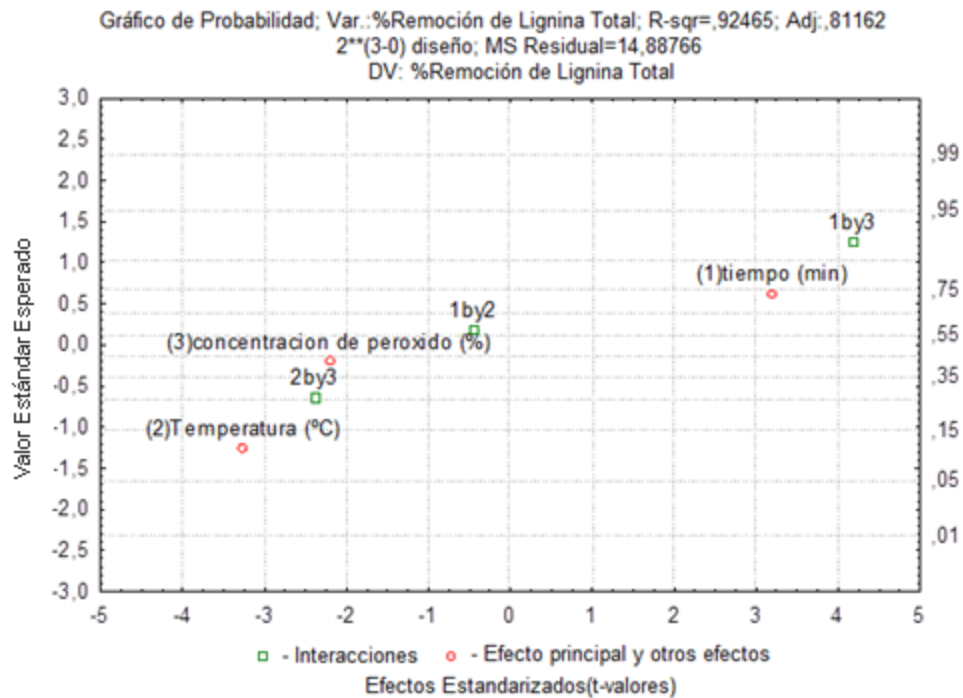


Figura 23 Gráfico de probabilidades

En la figura 23 se presenta el gráfico de probabilidades en el que se observa la influencia de las variables significativas (Tiempo, Temperatura, (1by3) concentración y tiempo), al alinear los datos de respuesta trazando una recta perpendicular, se evidencia que los datos no significativos corresponden a la concentración, y las interacciones 1by2, 2by3 como se indicaba en el análisis de la gráfica de Pareto, al determinar los valores significativos del diseño se puede realizar los análisis de varianza para el ajuste del diseño como se presenta a continuación.

Para determinar si el modelo experimental es estadísticamente significativo se emplean los análisis de varianza que se presentan en la siguiente tabla.

La tabla 18 presenta el análisis de varianza (ANOVA) para el ajuste del modelo al diseño experimental 2^3 para el análisis del porcentaje de remoción de lignina total de la mezcla de

F^2 : F calculado para verificar la falta de ajuste del modelo.

F^1 tabulado 5,5: 5,05 en el nivel del 95% de regresión

F^2 tabulado 1,4: 7,70 en el nivel del 95% para la falta de ajuste

La tabla Anova prueba la significancia estadística de cada variable comparándola con el cuadrado medio y la estimación del error experimental. ("No Title," 2010)

En la tabla 18 el valor F calculado para verificar la regresión fue 4,483 siendo menor para el F tabulado y un F de ajuste de 5,681 menor que el F para verificar la falta de ajuste tabulado de 7,70 lo que indica que no se podría considerar el modelo para fines predictivos debido a los datos obtenidos en la regresión, pero se puede decir que la falta de ajuste del modelo cumple con las condiciones requeridas por lo que el modelo se considera bueno. Para que un modelo sea estadísticamente significativo y se considere bueno debe cumplir las condiciones de el valor F calculado para la regresión debe ser mayor que el tabulado y el valor F calculado para verificar la falta de ajuste debe ser menor que el valor tabulado.

(Sarita Cândido Rabelo, 2007), ("Universidade Federal do Rio de Janeiro Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza - CCMN Instituto de Química – IQ Departamento de Bioquímica Ayla Sant ' Ana da Silva PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM LÍQUIDOS IÔNICOS : EFEITO NA DESESTRUTU," 2013), (Quadri, 2013).

El modelo no permite identificar si las variables significativas se consideran siempre las mismas, se presenta una variación en la repetibilidad del modelo estadístico debido a la falta de datos en la regresión.

La figura 24 muestra el análisis de las superficies de respuesta del porcentaje de remoción de lignina total del diseño experimental 2^3 con triplicado en el punto central manteniendo el tiempo se en su punto central de 60 min

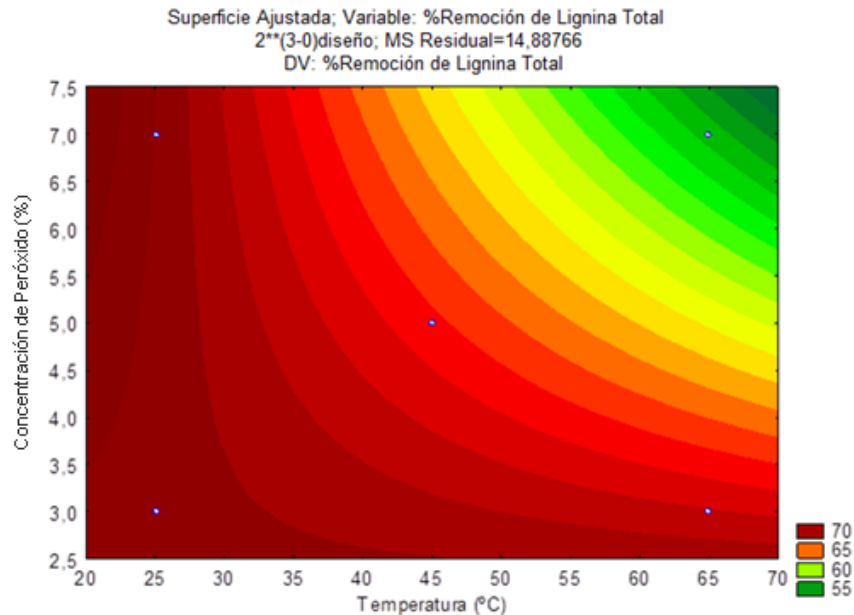


Figura 24 Superficie de respuesta del % de remoción de lignina, manteniendo el tiempo en el punto central 60 min.

Como indican en estudios estadístico en donde se emplean las superficies de respuestas estas permiten la optimización y eficiencia del proceso combinando las variables y manteniendo una variable constante como se realizó en el modelo experimental evaluando el porcentaje de remoción de lignina. (Biotecnología, Pachuca, & Sahagún, 2014)

En la figura 24 se presentan los niveles significativos a partir del ajuste de varianza, la superficie anterior se realizó con variables de concentración vs temperatura y con punto central en el tiempo (60 min), las zonas de coloración rojas representan los valores más significativos

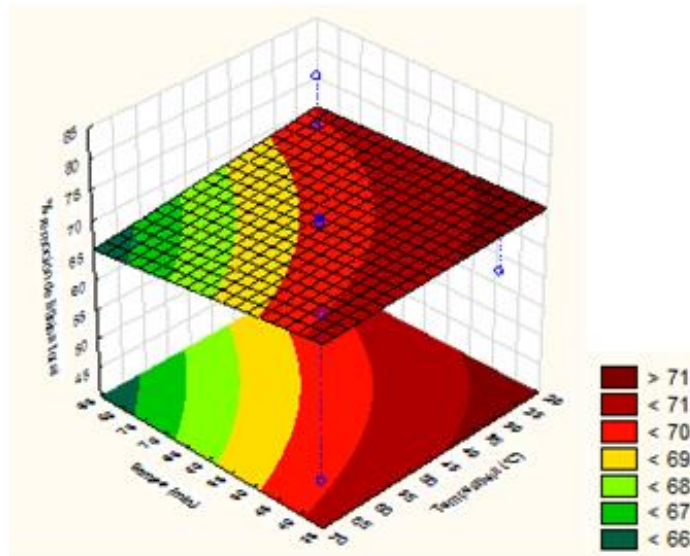
del modelo, mientras que la zona verde y amarilla los valores no significativos de poca relevancia en el diseño experimental.

Según la superficie de respuesta del porcentaje de remoción de lignina, en el modelo se experimenta una remoción óptima a partir de temperatura de 40°C y una concentración mínima de 3% de peróxido de hidrógeno alcalino, los valores más significativos que se observan en la parte superior izquierda de la superficie, se presentan en una temperatura de 25°C y 5 % de concentración lo que indica un proceso favorable para la remoción de lignina disminuyendo la concentración del agente químico la temperatura y el tiempo central de 40 min, lo que a su vez beneficia los costos , el tiempo del pretratamiento y la energía disminuida a temperatura ambiente. (Lucia et al., 2015)

Según los resultados obtenidos por el modelo estadístico se consideraron variables estadísticamente significativas a la temperatura, tiempo y la interacción (1by3) que corresponde a la concentración y tiempo, para el estudio de las siguientes superficies de respuesta se evaluaron las interacciones entre las variables temperatura y tiempo manteniendo la concentración en los tres valores utilizados en el pretratamiento químico de (5%, 3%, 7%) con el fin de comparar la influencia que ejerce la concentración en la remoción de la lignina y tiempo de reacción.

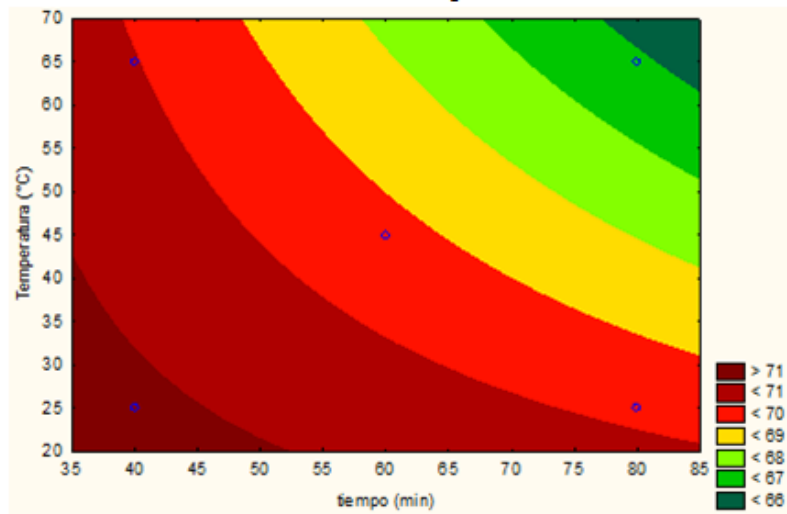
La figura 25 a-b muestra el análisis de las superficies de respuesta del porcentaje de remoción de lignina total del diseño experimental 2^3 con triplicado en el punto central manteniendo la concentración en 3 %

Superficie Ajustada; Variable: %Remoción de Lignina Total
 $2^{**}(3-0)$ diseño; MS Residual=14,89045
 DV: %Remoción de Lignina Total



(a)

Superficie Ajustada; Variable: %Remoción de Lignina Total
 $2^{**}(3-0)$ diseño; MS Residual=14,89045
 DV: %Remoción de Lignina Total



(b)

Figura 24 Superficie de respuesta del porcentaje de remoción de lignina, manteniendo la concentración en el punto central 3%(a), curva de nivel (b).

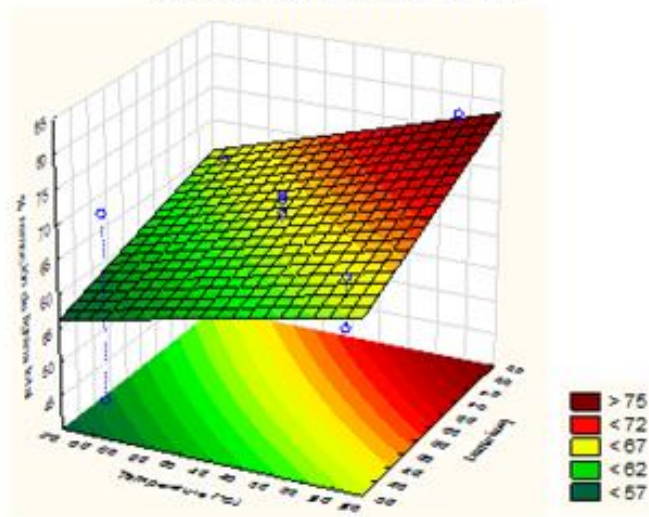
La figura 25-a presenta la superficie de respuesta tridimensional del porcentaje de remoción de lignina en donde se puede observar las condiciones óptimas de temperatura y tiempo para obtener un mayor porcentaje de remoción que corresponden a las regiones sombreadas de color rojo, siendo las más significativas del modelo estadístico.

En la superficie de respuesta se presentan buenos niveles de remoción de lignina para los valores experimentales de 60°C y 45 min con un porcentaje de remoción de lignina de 60%, pero las condiciones en las que se obtuvo un mayor porcentaje de remoción de lignina fueron de 20°C, 35 min estas son las condiciones leves del diseño experimental, las cuales presentan un porcentaje de remoción de 75-80% .

En condiciones severas como 70°C y 85 min de reacción solo se presenta una mínima remoción de lignina como se observa en la región de color verde. La figura 25-b de curvatura permite observar las interacciones entre la temperatura y el tiempo óptimas para el modelo, desde 60 min y 30°C hasta 40 min y 25°C sin presentar ninguna influencia por la concentración mínima del diseño de 3%.

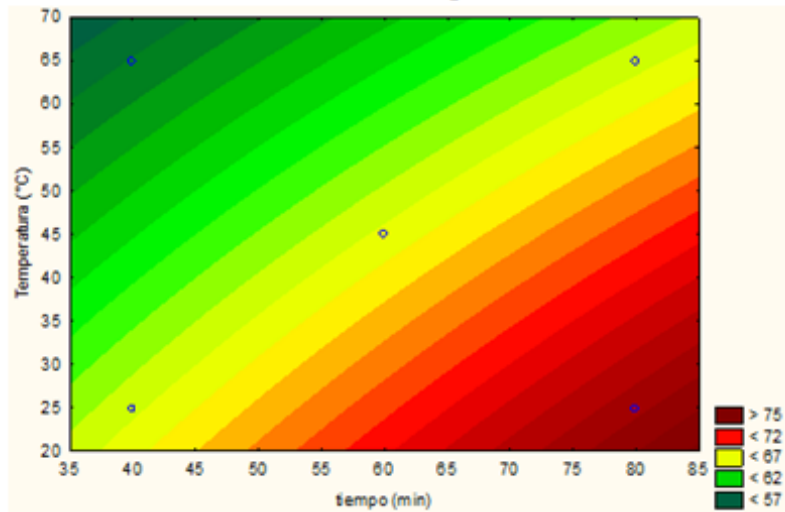
La figura 26 a-b presenta el análisis de las superficies de respuesta del porcentaje de remoción de lignina total del diseño experimental manteniendo la concentración en 5%

Superficie Ajustada; Variable: %Remoción de Lignina Total
2^{**}(3-0)diseño; MS Residual=14,89045
DV: %Remoción de Lignina Total



(a)

Superficie Ajustada; Variable: %Remoción de Lignina Total
2^{**}(3-0)diseño; MS Residual=14,89045
DV: %Remoción de Lignina Total



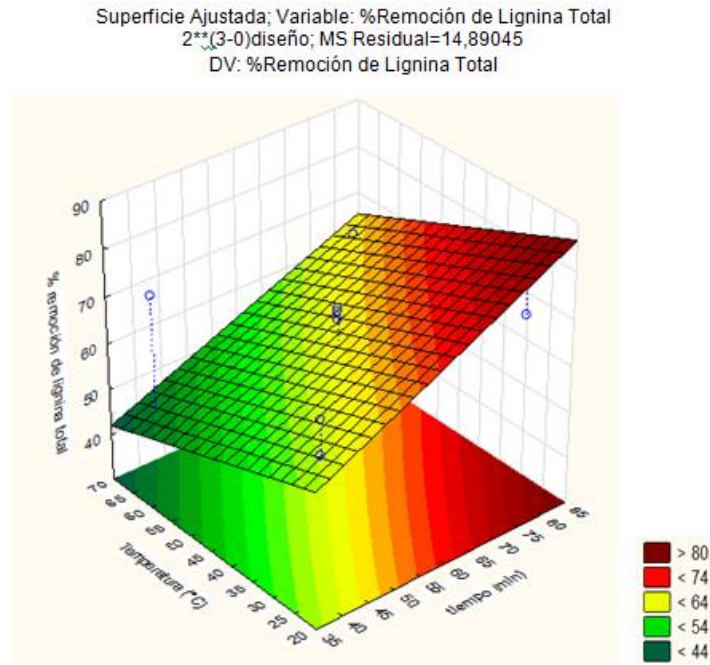
(b)

Figura 26 Superficie de respuesta del porcentaje de remoción de lignina, manteniendo la concentración en el punto central 5% representado por una curva de nivel.

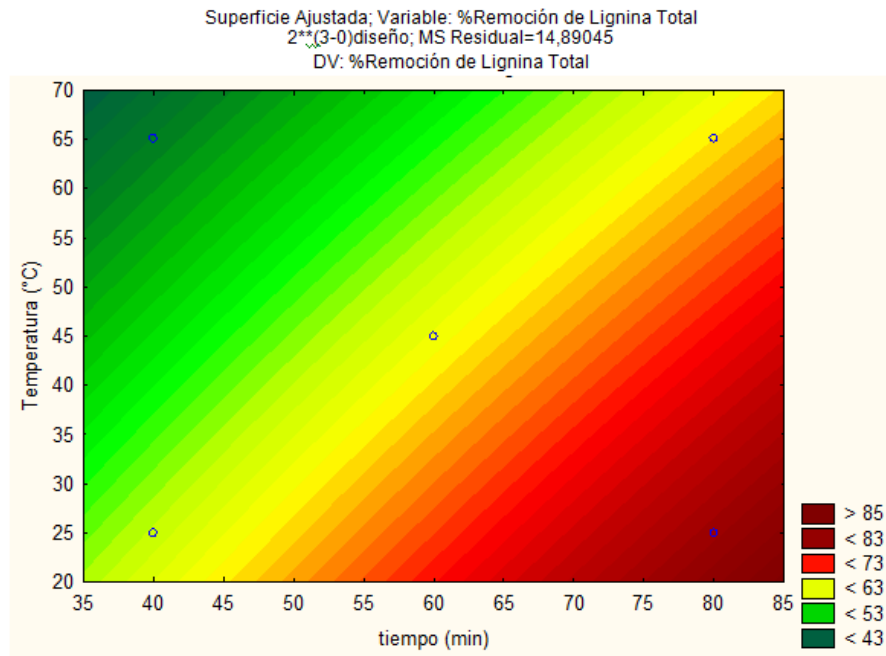
En la superficie de respuesta manteniendo la concentración de peróxido de hidrogeno en 5% se presenta una mayor influencia en el tiempo de reacción.

En la figura 26-a se presenta la superficie de respuesta tridimensional con valores significativos desde 70 min y 25°C con porcentajes de remoción de lignina total de 65%, pero el mejor porcentaje de remoción de 80% corresponde a valores de 80 min de reacción y 22°C, en comparación con la superficie anterior analizada manteniendo la concentración en 3% la influencia del tiempo de reacción con una concentración del punto central 5% aumento significativamente, lo que nos indica la influencia que presenta la concentración en la variable de interés tiempo y temperatura. La figura 26-b presentada en forma dimensional permite evidenciar claramente la influencia de la concentración 5% en los niveles óptimos de tiempo para el modelo estadístico, en un tiempo de 80-85 min y 20-24°C lo que nos permite concluir que existe una relación directa entre la concentración y el tiempo de reacción como se presentaba en la interacción (1by3) siendo esta una variable significativa para el ensayo.

La figura 27 a-b presenta el análisis de las superficies de respuesta del porcentaje de remoción de lignina total del diseño experimental manteniendo la concentración en 7%



(a)



(b)

Figura 27 Superficie de respuesta del porcentaje de remoción de lignina, manteniendo la concentración en 7%(a) y curva de nivel (b).

Finalmente se determinó la relación existente en la superficie de respuesta de temperatura y tiempo manteniendo la concentración en su valor más alto de 7% según el pretratamiento químico.

La figura 27 a-b presentan las regiones significativas del modelo estadístico, reconocidas por los diferentes colores como en los ensayos anteriores, en donde la región de color rojo representa las variables e interacciones significativas y el color verde y amarillo las menos significativas.

En la figura 27-a se presentan valores significativos desde 80 min y 25°C con un porcentaje de remoción de lignina de 80-90% en condiciones menos significativas en 60 min a 25°C una remoción del 50% y las variables que no son significativas para el modelo estadístico se presentan desde valores de 35-50 min y 40-70°C con porcentajes de remoción bajos de 10-40%.

La figura 27-b dimensional permite observar la relación directa entre la temperatura y el tiempo como en condiciones de mayor tiempo y menor temperatura se obtiene la región sombreada en rojo la que presenta mayor significancia para el modelo, según los resultados obtenidos en las interacciones de las superficies de respuesta variando la concentración de peróxido de hidrogeno utilizado en el pretratamiento químico se puede concluir que existe una relación directa entre la concentración y el tiempo, ya que las mejores condiciones de reacción se presentaron con una concentración mínima de 3% disminuyendo el tiempo y la temperatura, lo que a su vez beneficia los costos y tiempo de reacción, finalmente se puede considerar que las condiciones óptimas para el modelo son una temperatura de 25°C de 35-40 min y una concentración mínima de peróxido de hidrogeno de 3%.

6.6 Determinación del índice de cristalinidad por difracción de rayos x (DRX) a la biomasa lignocelulósica pretratada con peróxido de hidrógeno

En la figura 28 se presenta los resultados de difracción de rayos x (DRX) de las muestras que presentaron mayor remoción de lignina después de la etapa de pretratamiento para los ensayos 4 y 10 de lignina insoluble, como se indica en la tabla 16 y el comparativo con el índice de cristalinidad en la biomasa natural.

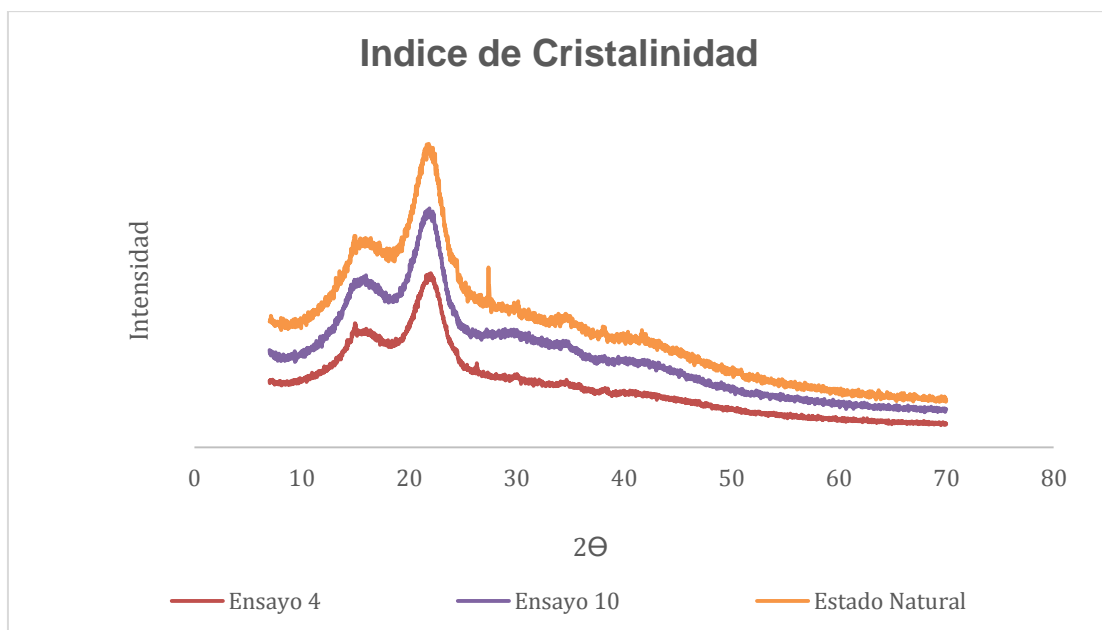


Figura 25 Difractograma de ensayos 4 y 10 después del pretratamiento

La tabla 19 presenta los porcentajes obtenidos del índice de cristalinidad para el ensayo 4 y 10 del pretratamiento químico con peróxido de hidrogeno y el porcentaje de índice de cristalinidad determinado inicialmente a la biomasa natural, mezcla 90:10 Bagazo de caña de azúcar y hojarasca.

Tabla 19 *Porcentaje de índice de cristalinidad.*

MUESTRA	INDICE DE CRISTALINIDAD (%)
Biomasa natural mezcla (90:10)	34,05
Ensayo 4 (80min, 25°C, 7%)	24,57
Ensayo 10 (40min, 25°C, 3%)	20,77

En el Difractograma que se presenta en la figura 28 se observan las señales para la celulosa cristalina que se encuentra en el rango de 2θ en $22,6^\circ$ y para la celulosa amorfa que se encuentra en el rango de 2θ en $19,0^\circ$. Para la determinación del índice de cristalinidad se empleó la ecuación 6 igualmente que para la biomasa natural. El Difractograma presenta tres bandas, la primera banda en color rojo corresponde al ensayo 4 del pretratamiento químico en el que se obtuvo un porcentaje de remoción de lignina de 88,55% en condiciones de reacción de 80 min, 25°C , 7%, la banda lila indica los resultados de cristalinidad del ensayo 10 del pretratamiento para el cual se obtuvo un 79,51% de remoción de lignina en condiciones de 40 min, 25°C , 3%, finalmente se presenta la banda naranjada la cual corresponde a la mezcla 90:10 de bagazo de caña de azúcar y hojarasca natural, antes de la etapa de pretratamiento.

El difractograma permite observar una reducción en la intensidad de la señal de la celulosa cristalina para los ensayos 4 y 10 en comparación con la biomasa en estado natural, lo que indica la disminución del porcentaje de la celulosa cristalina después de la etapa de pretratamiento químico con peróxido de hidrogeno.

En la tabla 19 se presentan los resultados determinados para el índice de cristalinidad, para el ensayo 4 se obtuvo un índice de cristalinidad 24,57% y para el ensayo 10 un índice de 20,77%

los resultados permiten corroborar las señales del difractograma y presentan la disminución del índice de cristalinidad después de la etapa de pretratamiento.

7. Conclusiones

1. Se determinó la composición inicial de la mezcla de la biomasa lignocelulosica bagazo de caña de azúcar y hojarasca en proporción (90:10) determinando el contenido de lignina soluble de 10,72% y de lignina insoluble de 22,11% las cuales están en los rangos reportados en la literatura

2. Se evaluaron la variables temperatura, concentración y tiempo del diseño experimental 2^3 con triplicado en el punto central, determinando según el análisis estadístico que la variables más significativas fueron, temperatura, tiempo y la interacción (1by3) que corresponde al tiempo y la concentración, se concluyó que la concentración no es una variable directamente significativa debido a que los mayores porcentajes de remoción de lignina se encuentran en los ensayos 4 y 10 con concentraciones de (3% y 7%).

3. Se evaluó el pretratamiento con peróxido de hidrogeno el cual removió un alto contenido de biomasa lignocelulosica, se cuantifico el porcentaje de lignina antes y después del pretratamiento para evaluar la efectividad de la remoción en los ensayos 4 y 10 de lignina insoluble con una remoción de (88,55% y 79,51%) y para la lignina soluble los ensayos 4 y 6 de (58,83% y 61,67%), lo que evidencia la efectividad el pretratamiento químico con peróxido de hidrogeno.

4. Al realizar los análisis físicos antes y después del pretratamiento químico se observa una reducción en el índice de cristalinidad pasando de un porcentaje de 34,05% de la biomasa en estado natural a 24,57% y 20,77% en los ensayos 4 y 10 respectivamente, se evidencia una disminución de la celulosa cristalina principalmente en el ensayo 4 con concentración de eróxido de hidrogeno de 7%.

5. Se determinaron las mejores condiciones de pretratamiento para la solubilización de lignina, mediante el análisis estadístico comparando las superficies de respuestas y manteniendo la concentración del pretratamiento químico (3%, 5%, 7%) considerando una interacción directa entre la concentración y el tiempo de reacción, en donde las condiciones optimas de reacción fueron de temperatura de 25°C y tiempo de 40 min la concentración mínima en la que se obtuvo mayor remoción fue de 3% reduciendo los costos del pretratamiento, tiempo de reacción y energía empleada.

8. Divulgación de resultados

Los resultados de este trabajo serán presentados en la modalidad de poster en el XXVI *International Materials Research Congress*, que se llevara a cabo del 20 al 25 de Agosto de 2017, en la ciudad de Cancún.

9. Bibliografía

- Aditiya, H. B., Chong, W. T., Mahlia, T. M. I., Sebayang, a. H., Berawi, M. a., & Nur, H. (2015). Second generation bioethanol potential from selected Malaysia's biodiversity biomasses: A review. *Waste Management*. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.07.031>
- Aguilar Rivera, N. (2008). Bioetanol de la caña de azúcar, *11*(3), 25–39.
- Alagoas, U. F. De, & Tecnologia, C. De. (2007). AÇÚCAR VISANDO A DESLIGNIFICAÇÃO PARA PRODUÇÃO, 1–8.
- Álvarez, C. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economía Informa*, (359), 63–89.
- América Latina y el Caribe*. (n.d.).
- Andrea, S., & Buttiglione, B. (2012). Bagazo De Caña De Azúcar Para Su Uso En La Producción De.
- Aromatic, O., Of, D., & Interest, I. (2013). LIGNINA , ESTRUCTURA Y APLICACIONES : MÉTODOS DE DESPOLIMERIZACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE DERIVADOS AROMÁTICOS DE INTERÉS INDUSTRIAL LIGNIN , STRUCTURE AND APPLICATIONS : DEPOLYMERIZATION METHODS FOR, *4*(4), 15–46.
- Asocaña. (2014). El Sector Azucarero Colombiano , más que azúcar , una fuente de energía renovable para el país, 13.
- Behaviour, B. A. (2012). Comportamiento de Cenizas y su Impacto en Sistemas de Combustión de Biomasa, *10*, 69–82.
- Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., & Kumar, S. (2014). Importance of chemical

pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 36, 91–106. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047>

Biotecnología, D. De, Pachuca, U. P. De, & Sahagún, C. P. (2014). (Recibido agosto 2013, aceptado abril 2014), 30(2), 213–227.

C, J. A. O. (2011). Potencial de producción de Bioetanol a partir de Caña Panelera : dinámica entre contaminación , seguridad alimentaria y uso del suelo Potential production bioethanol from pollution , food safety and land use, 16(1), 6–26.

Campinas, U. E. D. E. (2012). OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE- Autora : Christiane Curiel dos Santos de Oliveira Orientadora : Profa . Dra . Aline Carvalho da Costa Campinas – São Paulo Fevereiro de 2012.

Capítulo 12 Determinación de la Cristalinidad y de la Accesibilidad de las Fibras de Celulosa Mediante Diferentes Técnicas. (n.d.), 1–26.

Cárdenas-lailhacar, C., Giachello, G., Paus, P., Louge, S., Cordero, M. C., Aldasoro, R., ... Monti, A. (2012). Número 26 • 2012.

CELULOSE Neumara Luci Conceição Silva. (2010).

Chandel, A. K., Antunes, F. A. F., Anjos, V., Bell, M. J. V, Rodrigues, L. N., Polikarpov, I., ... Silva, S. S. (2014). Multi-scale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process of sequential acid – base pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*, 1–17.

Chemical, B., Proceedings, E., & Sombra, U. S. (2014). X Congresso Brasileiro de Engenharia

Química Iniciação Científica “, I.

Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar FICHA TÉCNICA DEL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L .) Publicación Enero 2015. (2015).

Cultivo, E. L., & Ca, D. E. L. A. (2004). CENTRO REGIONAL DE ESTUDIOS, (7).

D. Fernandes, S. Pereira, L. Serafim, D. Evtuguin, a. X. (2012). *Bioethanol*. *Bioethanol*, 124–152. <http://doi.org/10.5772/850>

Da, D., & Lignocelulósica, B. (2012). AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS PARA.

da Costa, J. A., Marques Jr, J. E., Gonçalves, L. R. B., & Rocha, M. V. P. (2015). Enhanced enzymatic hydrolysis and ethanol production from cashew apple bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide. *Bioresource Technology*, 179(0), 249–259. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.010>

De, E. M. G. R., & Isabela, G. (n.d.). Utilização de planejamento experimental no pré-tratamento oxidativo em meio alcalino do bagaço de cana-de-açúcar.

Eisenhuber, K., Krennhuber, K., Steinmüller, V., & Jäger, A. (2013). Comparison of Different Pre-treatment Methods for Separating Hemicellulose from Straw During Lignocellulose Bioethanol Production. *Energy Procedia*, 40, 172–181. <http://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.08.021>

Eletrônicas, D., Na, T., Digital, B., & Ufg, D. A. (2016). INSTITUTO DE QUÍMICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA ESTUDO DA

EFICIÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE ABACAXI COM PERÓXIDO DE GRANULOMETRIAS NA OBTENÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS
LORENA COSTA VASCONCELOS MACEDO.

En, D., & Qu, C. (2015). Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos.

En, E., & Marco, E. L. (2010). Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería.

En, M., & Energética, I. (2015). “ ETANOL LIGNOCELULÓSICO , A PARTIR DE CASCARILLA DE CAFÉ , POR MEDIO DE HIDRÓLISIS QUIMICA-ENZIMÁTICA Y FERMENTACIÓN .”

Energ, P., & Residual, B. (n.d.). *No Title*.

Furtado, A. (n.d.). Biocombustibles y comercio internacional : una perspectiva latinoamericana.

Gonçalves, C., Gonçalves, C., & Celulose, S. D. A. (2009). Aplicação De Agentes Oxidantes No Pré-Tratamento Do Bagaço De Cana-De-Açúcar E Sua Influência Na Aplicação De Agentes Oxidantes No Pré-Tratamento Do Bagaço De Cana-De-Açúcar E Sua Influência Na Sacarificação Da Celulose, 74.

Guimarães, A., Francisca, C., Cavalcante, G., Gleycielle, P., Pinheiro, C., Bezerra, A., ... Leitão, C. (2014). Geração de metano a partir de resíduos lignocelulósicos oriundos da produção do biocombustível : revisão, 55(85), 36–51.

Guimarães, J. L., Frollini, E., Silva, C. G., Wypych, F., & Satyanarayana, K. G. (2009). Characterization of banana , sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil, 30, 407–

415. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.07.013>

Harmsen, P. F. H., Huigen, W. J. J., López, L. M. B., & Bakker, R. R. C. (2010). Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass, (September).

Hidrólise, A. E. O. D. E. P. E. (2010). No Title.

Industria, L. A., La, A. D. E., Risaralda, Z. D. E., Viviana, S., & Silva, M. (n.d.). No Title, 1–57.

Investigaciones, C. D. E. (1994). *Centro de investigaciones energéticas, medioambientales y tecnológicas madrid, 1994.*

Ismael, P. (n.d.). Diseño de experimentos factoriales a dos niveles, 1–23.

L, C. D. E. A. S., Alejandra, M., Martínez, L., Bolio-lópez, G. I., Veleza, L., López-, A., ... Ant, C. (n.d.). 1 obtención de celulosa a partir de residuos agroindustriales de caña de azúcar, 1–7.

La, U. D. E., P, M. D. E., & Producción, P. (2011). UTILIZACIÓN DE LA MADERA DE P . radiata PARA PRODUCCIÓN.

Las, S. A. C., Ambiental, S. N., Ambiental, S. N., Aut, C., & El, A. (n.d.). Guía Ambiental para el Subsector de Caña de Azúcar versión final Guía Ambiental para el Subsector de Caña de Azúcar versión final.

Lizandro, L., & Montejo, D. (2002). Manual de Producción de Caña de Azúcar (Saccharum officinarum L .) Manual de producción de caña de azúcar (Saccharum officinarum L .).

Lucia, O., Ayala, B., Química, I., Antonio, J., & Doctor, H. (2015). Evaluación del pretratamiento y la hidrólisis enzimática de residuos agrícolas (bagazo de caña de azúcar

panelera y hojas de árboles presentes en la Universidad Santo Tomas) para la producción de etanol de segunda generación Investigador principal : Uni, 1–26.

Maria, D., & Valencia, A. (2011). Producción de etanol a partir de bagazo de caña panelera mediante un sistema híbrido de fermentación y pervaporación.

Mas, J. L. (2014). bagazo de caña de azúcar como, (53), 57–62.

Menezes, F. F. De, Jackson, G., Rocha, D. M., & Maciel, R. (2016). Obtainment and Characterization of Lignin from Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse of 2G Ethanol Process in Pilot Scale, *50*, 397–402. <http://doi.org/10.3303/CET1650067>

Merino, L. (n.d.). Las energías renovables.

Muñoz 2012. (n.d.).

Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(2), 578–597. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>

Niño López Lilibeth, Acosta Cardenas Alejandro, G. Z. R. (2013). Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Facultad de Ingenierias de La Universidad de Antioquia [Online]*, *69*(0120–6230), 317–326. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-62302013000400025&lng=en&nrm=iso&tlng=es

No Title. (2010).

No Title. (2012).

Of, C., Sugar, C., In, H., Second, F. O. R., & Ethanol, G. (n.d.). CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR IN NATURA E PRÉ-TRATADO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO, (1), 1–6.

Para, A. D. E. P., Enzimática, A. H., & Etanol, C. C. A. P. D. E. (2012). No Title.

Principios de Análisis Instrumental - Skoog, Holler, Nieman (5ta Edición).pdf. (n.d.).

Prinsen, P. (n.d.). Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas.

Producción de etanol de segunda generación a partir de paja de trigo : hongos , enzimas fúngicas y aplicaciones Tesis Doctoral Davinia Salvachúa Rodríguez. (2013).

Production, B. (n.d.). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos Bioethanol Production from agroindustrial lignocellulosic byproducts, 61–91.

Quadri, N. (2013). Estácio Jussie Odisi SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DA CANA-DE- AÇÚCAR PRÉ-TRATADO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO Florianópolis.

Rabelo, S. C. (2007). Avaliação de Desempenho de Pré-Tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino para a Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-Açúcar., 180.

Rabelo, S. C., Amezquita Fonseca, N. a., Andrade, R. R., Maciel Filho, R., & Costa, a. C. (2011). Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and Bioenergy*, 35(7), 2600–2607. <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.042>

- Rabelo, S. C., Andrade, R. R., Maciel Filho, R., & Costa, A. C. (2014). Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. *Fuel*, *136*, 349–357. <http://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.07.033>
- Raele, R., Boaventura, J. M. G., Fischmann, A. A., & Sarturi, G. (2014). Scenarios for the second generation ethanol in Brazil. *Technological Forecasting and Social Change*, *87*, 205–223. <http://doi.org/10.1016/j.techfore.2013.12.010>
- Ricardo, L., Oliveira, M., & Sp, L. (2012). Universidade de são paulo.
- Roberto, P., & Boscolo, P. M. (2013). Avaliação térmica e estrutural do bagaço de cana de açúcar pré-tratado com ozônio , ultrassom e micro-ondas para produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática Aluno : Orientador : Coorientador : Olavo Micali Perrone.
- Sánchez Riaño, a. M. ., & Gutiérrez Morales, A. I.; Muñoz Hernández, J. A. y Rivera Barrero, C. a. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos Bioethanol Production from agroindustrial lignocellulosic byproducts. *Tumbaga*, *5*, 61–91. Retrieved from <http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/194/163>
- Santos, E. S. D. O. S., Fernandes, N., & Macedo, G. R. D. E. (2009). 1. introdução, 1–9.
- Santos, F. A. (2013). Fernando Almeida Santos Avaliação Do Pré-Tratamento Hidrotérmico De Palhas De Cana-De-Açúcar Para Produção De.
- Saval, S., Ingeniería, I. De, & Universitaria, C. (n.d.). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales : Pasado , Presente y Futuro, *16*(2), 14–46.
- Schneiderman, S. J., Johnson, R. W., Menkhaus, T. J., & Gilcrease, P. C. (2015). Quantifying

- second generation ethanol inhibition: Design of Experiments approach and kinetic model development. *Bioresource Technology*, 179, 219–226.
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.087>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). Determination of Ash in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 7 / 17 / 2005 Determination of Ash in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP), (January).
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Nrel, D. C. (2008). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, (April).
- Su, Y., Du, R., Guo, H., Cao, M., Wu, Q., Su, R., ... He, Z. (2015). Fractional pretreatment of lignocellulose by alkaline hydrogen peroxide: Characterization of its major components. *Food and Bioproducts Processing*, 94(April), 322–330.
<http://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.04.001>
- Sulaiman, A. Z., Ajit, A., Yunus, R. M., & Chisti, Y. (2011). Ultrasound-assisted fermentation enhances bioethanol productivity. *Biochemical Engineering Journal*, 54(3), 141–150.
<http://doi.org/10.1016/j.bej.2011.01.006>
- Supranto, S., Tawfiequrrahman, A., & Yunanto, D. E. (2015). SUGARCANE BAGASSE CONVERSION TO HIGH REFINED CELLULOSE USING NITRIC ACID , SODIUM HYDROXIDE AND HYDROGEN PEROXIDE AS THE DELIGNIFICATING AGENTS, 35–46.
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2007). *Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. BioResources* (Vol. 2).

<http://doi.org/10.15376/biores.2.4.707-738>

Talebna, F., Karakashev, D., & Angelidaki, I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, *101*(13), 4744–4753. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.080>

Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Aspectos da emergência, crescimento inicial e suscetibilidade a herbicidas utilizados em cana-de-açúcar de. (2011).

Universidade Federal do Rio de Janeiro Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza - CCMN Instituto de Química – IQ Departamento de Bioquímica Ayla Sant ’ Ana da Silva PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM LÍQUIDOS IÔNICOS : EFEITO NA DESESTRUTU. (2013).

Vera, F. L., Arturo, H., Cortes, M., Murcia, C. V., & Galvis, I. C. (2014). Modificación superficial de micro fibras de celulosa obtenidas a partir de bagazo de caña de azúcar usando silanización.